



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS
FACULTAD DE QUÍMICA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**ESTUDIO TEÓRICO DE LOS EQUILIBRIOS EN SOLUCIÓN DE
FÁRMACOS DE LA FAMILIA DE LOS OXICAMS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**P R E S E N T A:
JOSÉ MARCO ANTONIO FRANCO PÉREZ**

**TUTOR:
Dr. RODOLFO GÓMEZ BALDERAS
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán**

MÉXICO, D. F., NOVIEMBRE DE 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 10 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, bajo la supervisión del Dr. Rodolfo Gómez Balderas.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primera instancia, a cada uno de los miembros familia, por el enorme apoyo que me han brindado en esta etapa tan maravillosa de mi vida.

Así mismo, le agradezco a toda la gente e instituciones que contribuyeron sustancialmente a la finalización de esta tesis:

Al Dr. Rodolfo Gómez Balderas, por todas las enseñanzas y conocimientos que me transmitió y que me permitió desarrollar, tanto en el ámbito de la química teórica como en la vida misma.

Al conjunto de Doctores que amablemente realizaron la revisión de la presente tesis, enriqueciendo sustancialmente tanto su enfoque como su contenido: Dra. Annia Galano Jiménez, Dr. J Jesús Hernández Trujillo, Dr. Francisco Miguel Castro Martínez, Dr. Enrique Ángeles Anguiano y Dr. Fernando Cortés Guzmán.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT, por haberme otorgado una beca (207880) para realizar estudio de Doctorado.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de seguir creciendo personal y profesionalmente.

DEDICATORIAS

A mis padres *Lidia Pérez Vargas* y *José Marco Antonio Franco Hernández*, a todos mis hermanos, a mi pequeña Natalia, con profundo y sincero amor.

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS EN REVISTAS ARBITRADAS, DE PRESTIGIO INTERNACIONAL, DERIVADAS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRESENTE TESIS.

- "UV-Visible Properties of Oxicams in Solution: A TD-DFT and Experimental Study" Marco Franco-Pérez, Luis I. Reyes-García, Rosario Moya-Hernández, and Rodolfo Gómez-Balderas, *International Journal of Quantum Chemistry*, 2012, DOI: 10.1002/qua.24298.
- "Tautomeric Ratio and Prototropic Equilibrium Constants of Tenoxicam, a ^1H and ^{13}C NMR Theoretical and Experimental Study" Marco Franco-Pérez, Rosario Moya-Hernández, Alberto Rojas-Hernández, Atilano Gutiérrez, Rodolfo Gómez-Balderas, *Journal of Physical Chemistry B*, 2011, 115, 13593-13598.
- "First-Principles Prediction of the pK_a 's of Anti-inflammatory Oxicams" Junming Ho, Marco Franco-Pérez, Michelle L. Coote and Rodolfo Gómez-Balderas, *Journal of Physical Chemistry A*, 2010, 114, 11992-12003.

TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES.

- "Cálculo de los coeficientes de reparto heptano/agua de fármacos de la familia de los oxicams a partir de energías libres de solvatación" *XI Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica*, celebrada en la ciudad de Toluca del 8 al 10 de noviembre del 2012.
- "Estudio RMN teórico-experimental de la tautomerización del fármaco tenoxicam" *XXXVII Congreso de Químicos Teóricos de Expresión Latina (QUITEL)* celebrado en la Riviera Maya del 4 al 9 de diciembre del 2011.
- "Propiedades de absorción UV-visible de fármacos de la familia de los oxicams" *QUIMIUNAM*, celebrado en Ciudad Universitaria, Distrito Federal, celebrado del 16 al 18 de noviembre del 2011.
- "Propiedades de absorción UV-visible de los fármacos antiinflamatorios Piroxicam e Isoxicam" *46º Congreso Mexicano de Química*, celebrado en la ciudad de Querétaro del 10 al 14 de septiembre del 2011.
- "Aplicación de la espectroscopia NMR ^1H teórica y experimental en la determinación de las constantes de disociación ácido-base del tenoxicam" *Simposium Interno de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán* llevado a cabo los días 17 y 18 de mayo en el marco de la celebración del año internacional de la química del 2011.
- "Estudio NMR ^1H y ^{13}C del comportamiento prototrópica del fármaco tenoxicam apoyado con cálculos teóricos" *Simposium Interno de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán* llevado a cabo los días 17 y 18 de mayo en el marco de la celebración del año internacional de la química del 2011.

- “Estudio Teórico de los coeficientes de partición de los oxicams” *IX Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica*, celebrada en la ciudad de Pachuca del 11 al 13 de noviembre del 2010.
- “Estudio NMR ^1H y ^{13}C del comportamiento tautomérico del fármaco tenoxicam apoyado con cálculos teóricos” *45° Congreso Mexicano de Química* celebrado en la Riviera Maya del 18 al 22 de septiembre del 2010.
- “Aplicación de la espectroscopia RMN ^1H teórica y experimental en la determinación de las constantes de disociación ácido base del tenoxicam” *45° Congreso Mexicano de Química* celebrado en la Riviera Maya del 18 al 22 de septiembre del 2010.
- “Determinación de las constantes de acidez de fármacos antiinflamatorios utilizando la Teoría de Funcionales de la Densidad” *VIII Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica*, celebrada en la ciudad de Colima del 12 al 14 de noviembre del 2009.
- “Estudio Teórico de las propiedades electrónicas y estructurales de la familia de los Oxycams” Seminario presentado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México, el 9 de julio del 2009.

Resumen ..	1
Abstract	3
Objetivos	5
CAPITULO 1: <i>Fármacos de la familia de los oxicams</i>	6
1.1 Mecanismo farmacológico de acción de los oxicams	8
1.2 Equilibrios químicos en solución acuosa	9
1.2.1 Constantes de equilibrio macroscópicas y macro-especies de los oxicams	11
1.2.2 Constantes de equilibrio microscópicas y micro-especies de los oxicams	12
1.2.3 Relación entre los macro y micro equilibrios químicos	13
1.3 Métodos para la determinación de constantes de equilibrio	15
1.3.1 Métodos para la determinación de constantes de equilibrio macroscópicas	15
1.3.2 Métodos para la determinación de constantes de equilibrio microscópicas	15
1.3.1 Detección selectiva	16
1.3.1.1 Determinación de la constante de tautomerización mediante Resonancia Magnética Nuclear a bajas temperaturas	16
1.3.2 Determinación de las micro-constantes de acidez mediante al método deductivo ..	17
1.3.3 Determinación espectrofotométrica de la constante de tautomerización manipulando la polaridad del medio	17
1.4 Estudios previos de las macro y micro constantes de los oxicams	18
CAPITULO 2: <i>Fundamentos teóricos de los métodos de la química cuántica</i>	23
2.1 La mecánica cuántica	24
2.1.1 La ecuación de Schrodinger para muchos cuerpos interactuantes	25
2.2 Soluciones aproximadas al problema de muchos cuerpos	27
2.2.1 El principio variacional de la mecánica cuántica	27

2.2.2 El método Hartree-Fock	28
2.2.3 La Teoría de Funcionales de la Densidad (TFD)	34
2.2.3.1 El método de Kohn-Sham	38
2.2.3.2 Aproximaciones locales al potencial de intercambio y correlación, el método LDA	41
2.2.3.3 Aproximaciones semi-locales al potencial de intercambio y correlación, el método GGA	42
2.2.3.4 Los funcionales de la densidad PBE0, B3LYP y O3LYP	44
2.3 Programas computacionales	45

CAPITULO 3: *Propiedades UV-visible de los oxicams en solución; detección de las especies microscópicas de los 5 oxicams* 46

3.1 Metodologías	50
3.1.1 Métodos teóricos	50
3.1.2 Procedimiento experimental	51
3.2 Resultados	53
3.2.1 Evaluación del protocolo teórico	53
3.2.2 Comportamiento de absorción UV-Visible y microespecies de los oxicams en 1,4-dioxano	55
3.2.3 Comportamiento de absorción UV-Visible y microespecies de los oxicams en etanol	57
3.2.4 Comportamiento de absorción UV-Visible y microespecies de los oxicams en solución acuosa	60
3.2.5 Comportamiento de absorción UV-Visible y microespecies de los oxicams en formamida	64
3.2.6 Especies absorbentes de los 5 oxicams	66

CAPITULO 4: <i>Cálculo de las micro-constantes de acidez de los oxicams a primeros principios</i>	69
4.1 Ciclos termodinámicos para el cálculo de los pK_a 's de los oxicams	70
4.2 Metodologías	73
4.2.1 Métodos teóricos	73
4.3 Resultados	75
4.3.1 Evaluación de los funcionales de prueba	75
4.3.2 Acidez de los oxicams en fase gas	76
4.3.3 Acidez de los oxicams en solución acuosa	77
4.3.4 Cálculo de las constantes de acidez de nuevos derivados de los oxicams	80
CAPITULO 5: <i>Determinación de la constante de tautomerización del tenoxicam mediante un modelo RMN teórico-experimental</i>	84
5.1 Determinación de las poblaciones tautoméricas del tenoxicam	87
5.2 Metodología	88
5.2.1 Métodos teóricos	88
5.2.2 Procedimiento experimental	89
5.3 Resultados	89
5.3.1 Equilibrios de tautomerización del tenoxicam en diferentes medios	89
5.3.2 Calculo de las constantes microscópicas del tenoxicam en solución, a partir de su constante de tautomerización	94
CAPITULO 6: <i>Discusión</i>	98
CONCLUSIONES	103

APÉNDICES	104
Apéndice 1: El modelo del continuo polarizable	105
Apéndice 2: La teoría de funcionales de la densidad dependiente del tiempo	110
Apéndice 3: Marco teórico de los desplazamientos químicos de resonancia magnética nuclear	120
BIBLIOGRAFÍA	131
PUBLICACIONES	140

Resumen

Caracterizar los equilibrios químicos en solución es de gran importancia en compuestos químicos con actividad biológica. Conocer el conjunto completo de equilibrios y especies químicas de un fármaco es indispensable, tanto para evaluar su capacidad de atravesar los tejidos y membranas, como para determinar su estado de ionización en la sangre y otros fluidos corporales. Adicionalmente, la determinación de los sitios moleculares de protonación/desprotonación de un fármaco puede revelar las regiones de interacción de éste con enzimas receptoras.

Es común la presencia de varios grupos funcionales en los fármacos, lo que dificulta la caracterización de los equilibrios químicos que pudieran establecerse en solución. Con frecuencia, las especies ácido-base de los fármacos están asociadas a diferentes grupos funcionales. La identificación del grupo funcional responsable de un equilibrio químico específico es en general una tarea experimental compleja. Así mismo, la presencia de varios grupos funcionales puede dar origen a estructuras tautoméricas, generando además de equilibrios ácido-base, equilibrios de tautomerización. En conjunto, estos equilibrios son denominados micro-equilibrios químicos o equilibrios microscópicos.

Los métodos experimentales para determinar los valores de las constantes asociadas a micro-equilibrios son muy escasos y están diseñados con base en diversas suposiciones, lo que limita su aplicabilidad. El principal inconveniente que enfrentan estos métodos es la alta velocidad de interconversión entre las especies, dificultando la determinación aislada de propiedades para su posterior cuantificación. En este contexto la química teórica constituye una alternativa viable en la determinación de las micro-constantes de compuestos químicos, debido a que con esta herramienta es posible obtener propiedades moleculares para una especie en particular, con precisión semejante a los métodos experimentales [1].

El presente trabajo está enfocado en la caracterización del conjunto completo de equilibrios químicos en solución de 5 fármacos de la familia de los oxicams: isoxicam, piroxicam, meloxicam, tenoxicam y lornoxicam, mediante métodos de la química teórica.

En el capítulo uno explicamos, de forma general, la importancia de los oxicams a nivel farmacológico. Así mismo, exponemos el conjunto de micro-constantes y micro-especies químicas previamente reportados para estos fármacos, así como algunas inconsistencias en estos reportes. El capítulo dos aborda generalidades de la química cuántica, enfocándonos principalmente en la Teoría de Funcionales de la Densidad. El capítulo tres explica la metodología empleada para caracterizar el conjunto completo de micro-especies de cada uno de los cinco oxicams estudiados, para lo cual, se utilizaron las transiciones electrónicas obtenidas a partir de la Teoría de Funcionales de la Densidad Dependiente del Tiempo como propiedad molecular para identificar a cada especie. En el capítulo cuatro realizamos el cálculo de las micro-constantes asociadas a todos los micro-equilibrios ácido-base de los oxicams, mediante ciclos termodinámicos comúnmente utilizados en la química teórica para el cálculo de pK_a 's. Finalmente en el capítulo cinco presentamos un modelo estadístico para el cálculo de las constantes de tautomerización, el cual hace uso de desplazamientos químicos experimentales, así como los obtenidos en el marco de la Teoría de Funcionales de la Densidad. Subsecuentemente realizamos una discusión general de los resultados obtenidos, para posteriormente dar las conclusiones finales de esta tesis.

Abstract

Characterize the chemical equilibria in solution is of great importance in chemical compounds with biological activity. The Knowledge of the full set of equilibria and chemical species of a drug is essential, both to evaluate their ability to cross membranes and tissues, as well as, to determine their state of ionization in the blood and other body fluids. Additionally, the determination of molecular sites of protonation / deprotonation of a drug may reveal regions of interaction of this compound with host enzymes.

It is common the presence of various functional groups on drugs, making difficult the characterization of the chemical equilibria in solution. Often, acid-base species of the drugs are associated with different functional groups. The identification of functional group responsible for a specific chemical equilibrium is in general a complex experimental task. Also, the presence of various functional groups can give rise to tautomeric structures, generating also tautomerization equilibria. Together these equilibria (acid-base and tautomeric) are called chemical micro-equilibria or microscopic equilibria.

Available experimental methods for determining the values of the constants associated with micro-equilibria are scarce and are designed based on several assumptions, which limits its applicability. The main problem facing these methods is the high rate of interconversion between species, hindering the determination of properties, for its subsequent quantification. In this context, theoretical chemistry is a viable alternative in the determination of micro-chemical constants, because with this tool it is possible to obtain molecular properties for a particular species, with accuracy similar to the experimental methods [1].

This work focuses on the characterization of the complete set of chemical equilibria in solution of five drugs of the oxicams family: isoxicam, piroxicam, meloxicam, tenoxicam and lornoxicam, by methods of theoretical chemistry. In chapter one, we expose the importance of oxicams at pharmacological level; also, we present the set of micro-constants and micro-species previously reported for these drugs as well as some inconsistencies in these reports. Chapter two deals with generalities of quantum chemistry, focusing primarily

on the Density Functional Theory. Chapter three explains the methodology used to characterize the complete set of micro-species of each of the five oxicams under study, for which, electronic transitions obtained from the Functional Theory of Time-Dependent Density were used as property to identify molecular species. In chapter four we make the calculation of the micro-constants associated to all acid-base micro-equilibria of oxicams, through thermodynamic cycles commonly used in theoretical chemistry for calculating pKa's. Finally in chapter five we present a statistical model for calculating the tautomerization constant, which makes use of experimental chemical shifts and those obtained in the framework of the Density Functional Theory. Subsequently we conducted a general discussion of the results, later giving the final conclusions of this thesis.

OBJETIVOS

Caracterizar los micro y macro equilibrios en solución acuosa de 5 fármacos de la familia de los oxicams, con el fin de revelar las especies más importantes involucradas, así como el valor de las constantes termodinámicas asociadas a dichos equilibrios, mediante la aplicación de métodos teóricos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar las especies microscópicas a partir de métodos teóricos en conjunto con mediciones de espectros de absorción UV-visible.
- Determinar la estructura de mínima energía que reproduce el espectro electrónico de cada especie microscópica.
- Determinar las micro y macro constantes de los oxicams aplicando ciclos termodinámicos basados en cálculos termoquímicos.
- Determinar las micro y macro constantes de tenoxicam mediante un análisis estadístico basado en desplazamientos químicos obtenidos a partir de cálculos teóricos y a partir de mediciones experimentales

CAPITULO 1

“Fármacos de la familia de los oxicams”

Los oxicams son una familia de potentes fármacos antiinflamatorios, ampliamente utilizados en padecimientos crónicos como la artritis y en inflamaciones post-operatorias [2]. Desde el descubrimiento del piroxicam (figura 1.1) en la década de los 80's [3], se han diseñado varios derivados (mediante un método denominado síntesis isostérica), los cuales poseen características farmacológicas similares al piroxicam, con algunos beneficios adicionales. A este conjunto de fármacos se les conoce como oxicams y pertenecen al grupo de Anti-Inflamatorios No Esteroidales (AINEs). Un aspecto estructural relevante en las propiedades farmacológicas de los oxicams, corresponde a la existencia de un grupo enólico ácido (C3-C4-O17, figura 1.1), cuya función es la de sustituir al grupo carboxilato presente en otros fármacos no esteroidales (como los derivados del ácido acetilsalicílico). Esta característica se traduce en vidas medias mucho más largas, pues en contraste con fármacos que presentan el grupo carboxilato, aquellos con el grupo enol no son metabolizados rápidamente por el cuerpo debido a su alta lipofilidad, lo cual incrementa su tiempo de residencia dentro del organismo. Esto origina que la dosis suministrada en un tratamiento crónico sea mucho menor a la de otros AINEs; lo que origina que los efectos secundarios como ulceración gastrointestinal o insuficiencia renal, comúnmente relacionados con otros antiinflamatorios, sean menos frecuentes [4]. En este estudio consideramos 5 miembros de esta familia de fármacos: isoxicam, piroxicam, meloxicam, tenoxicam y lornoxicam (figura 1.1). Aunque los 5 oxicams pertenecen a la clase de antiinflamatorios no esteroidales, tienen indicaciones bastante específicas, así, mientras el piroxicam es prescrito como un potente anti-inflamatorio, el lornoxicam es preferentemente antihiperalgésico y el tenoxicam antiartrítico [5,6,7].

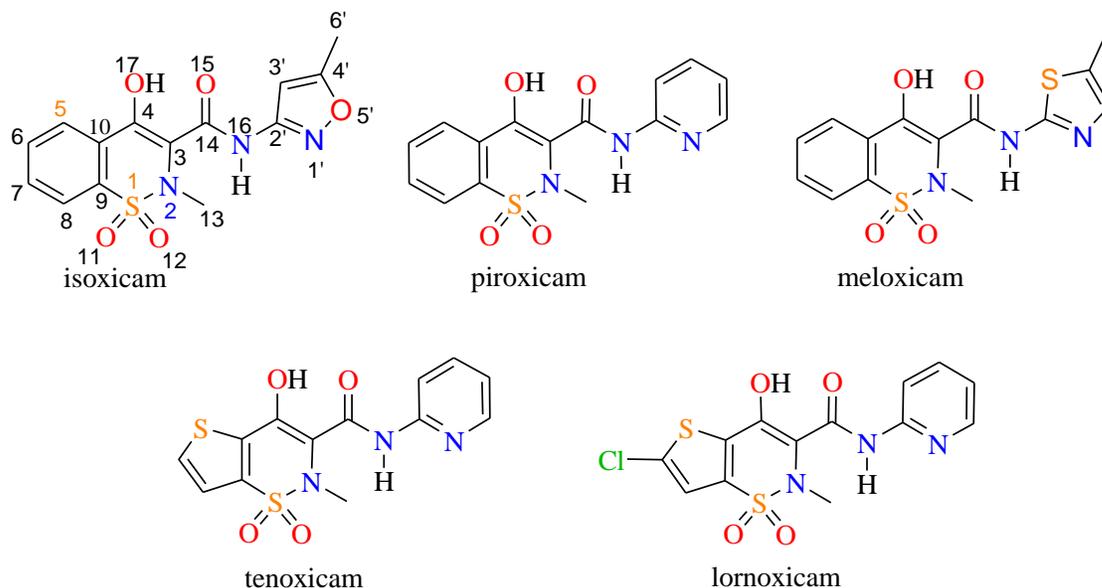


Figura 1.1 Estructura química de los oxicams estudiados en el presente proyecto.

1.1 Mecanismo farmacológico de acción de los oxicams.

La actividad farmacológica de los oxicams consiste principalmente en disminuir los efectos indeseables de la inflamación. En la inflamación existe una gran dilatación de los vasos sanguíneos como respuesta a algún tipo de estímulo interno o externo nocivo para el organismo. En consecuencia, se observa un aumento en el volumen de los vasos sanguíneos debido a que acumulan una gran cantidad de sangre en la zona. La sangre acumulada contiene tanto los anticuerpos como los metabolitos necesarios para combatir al agente nocivo, así como las plaquetas y células necesarias para regenerar los tejidos dañados. No obstante, la inflamación puede llegar a ser un factor agravante para el organismo ya que en este proceso se liberan radicales libres (como hipoclorito $\bullet\text{OCl}$, hidroxilo $\bullet\text{OH}$ o peróxido $\bullet\text{OOR}$), los cuales pueden activar nervios y dañar tejido sano [5,6]. Así mismo, el incremento en el volumen de los tejidos aumenta el riesgo de una compresión nerviosa; todo lo anterior se traduce en un aumento en el dolor, e incluso un daño mayor en la zona afectada [7]. En la inflamación participan una gran cantidad de metabolitos y sustancias bioquímicas, de los cuales, las que están principalmente relacionadas con los efectos nocivos del proceso de inflamación son: a) Aminas vasoactivas como la histamina, la cual es uno de los compuestos causantes de la vasodilatación; b) Metabolitos del ácido

araquidónico, principalmente las Prostaglandinas E_2 , I_2 y D_2 (PGE_2 , PGI_2 y PGD_2 respectivamente) que producen vasodilatación y son las principales causantes de la fiebre y el dolor, por lo que su inhibición se traduciría tanto en una disminución del volumen de los vasos sanguíneos, así como en un efecto analgésico y antipirético, c) las Citocinas, las cuales fomentan la síntesis de prostaglandinas [8,9].

De los metabolitos mencionados, los derivados del ácido araquidónico han sido considerados como los principales causantes de los efectos nocivos de la inflamación [7]. El ácido araquidónico, es transformado a la Prostaglandina H_2 (PGH_2) mediante la enzima ciclooxigenasa. La PGH_2 a su vez es transformada en otras prostaglandinas, entre ellas la PGE_2 , la PGI_2 y la PGD_2 [10]. Se ha sugerido que el mecanismo principal de acción de los oxicams se debe a la inhibición del sitio activo de la enzima ciclooxigenasa, lo que interrumpe la síntesis de las tres prostaglandinas mencionadas [11,12].

Además de su actividad antiinflamatoria, se ha observado que los oxicams poseen funcionalidades quimiopreventivas y quimiosupresivas [13,14], así mismo se ha reportado que actúan como neutralizadores de radicales libres a nivel biológico [15,16,17] y como protectores de la piel ante los rayos UV [18]. Sin embargo, no hay una explicación completa respecto a esta multifuncionalidad.

1.2 Equilibrios químicos en solución acuosa

Los oxicams, como la mayoría de los compuestos biológicamente activos, poseen varios grupos funcionales; un anillo tiazina, el cual se encuentra sustituido por un grupo carboxamida en la posición 3 y un enol en la posición 4, un anillo periférico izquierdo benceno (isoxicam, piroxicam y meloxicam), tieno (tenoxicam) o clorotieno (lornoxicam), un anillo periférico derecho isoxazolil (isoxicam), piridil (piroxicam, tenoxicam y lornoxicam) o tiazolil (meloxicam), Figura 1.1. De estos, los grupos funcionales implicados en la reactividad química en solución de estos fármacos son nitrógeno N1' presente en el anillo piridil (piroxicam, tenoxicam y lornoxicam) o tiazolil (meloxicam) o isoxazolil (isoxicam), el oxígeno enol (O17) y el nitrógeno carboxamida (N16). Estos tres grupos funcionales son responsables de su reactividad ácido-base, dando origen a una especie

catión univalente (H_2Ox^+), una especie neutra (HOx) y un anión univalente (Ox^-). Así mismo, estos grupos funcionales están implicados en la estabilidad tautomérica de los oxicams en solución, la cual contempla el equilibrio químico entre el tautómero enol (protonado en el oxígeno O17 y desprotonado en el nitrógeno N1') y el tautómero zwitterion (desprotonado en el oxígeno O17 y protonado en el nitrógeno N1'), ambos eléctricamente neutros [19,20,21]. En la Figura 1.2 se muestran las micro-especies del fármaco piroxicam. Para el caso de isoxicam, se ha encontrado evidencia de la presencia de sólo dos de estas especies: la especie neutra enol y el anión, por lo que este oxicam no presenta especie catiónica ni tautómero zwitterion (Figura 1.3). Los equilibrios químicos relacionados a todas las especies ácido-base y tautoméricas de los oxicams en solución se explican a continuación.

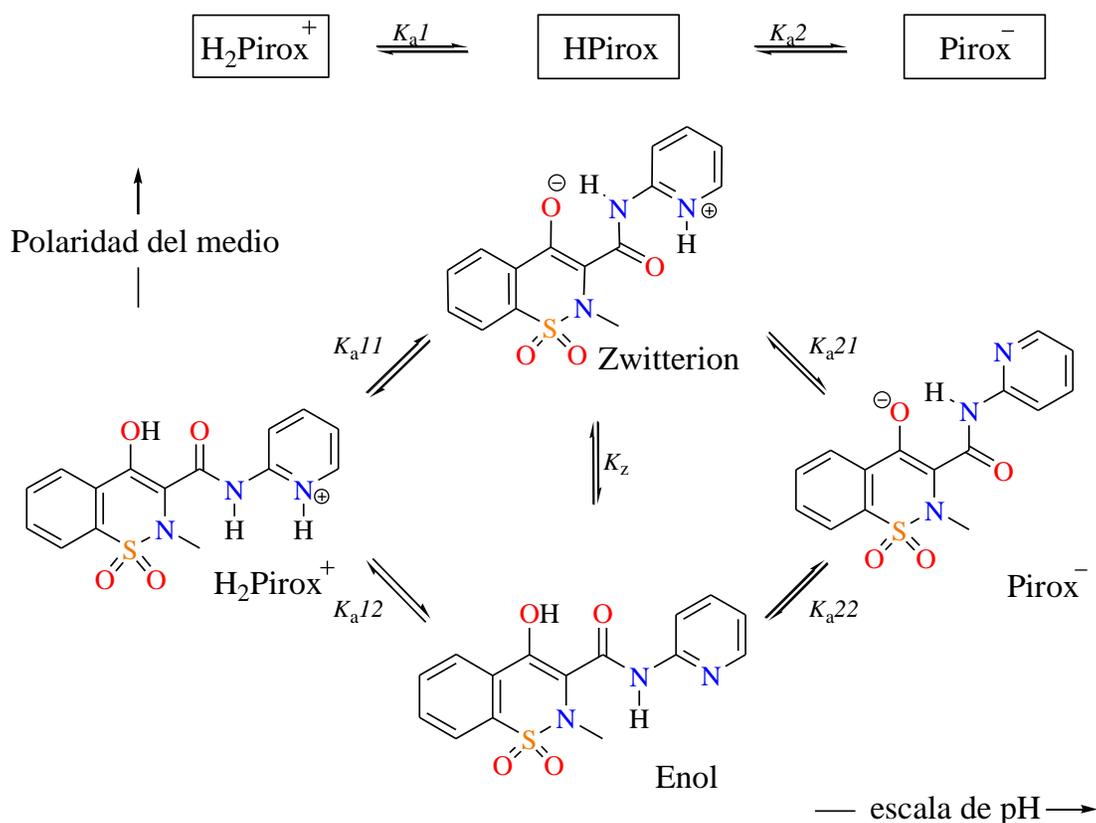


Figura 1.2 Micro y macro equilibrios químicos del piroxicam, un miembro de la familia de los oxicams.

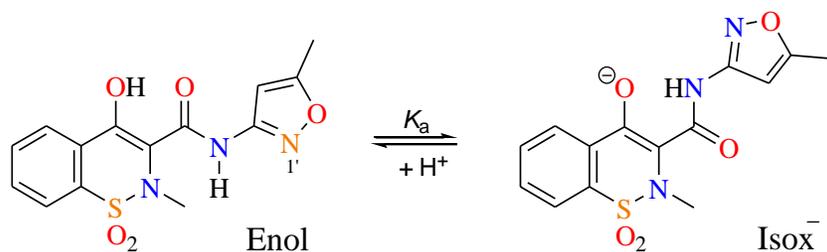
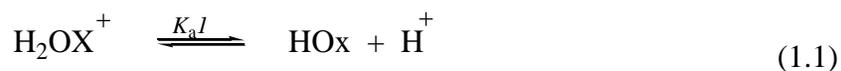


Figura 1.3 Equilibrio de disociación ácido-base del fármaco isoxicam

1.2.1 Constantes de equilibrio macroscópicas y macro-especies de los oxicams

Se denomina constante de equilibrio macroscópica (o macro-constante), a cualquier constante que describe el equilibrio general entre dos entidades químicas que se pueden interconvertir a través de dos o más compuestos intermedios alternativos; es decir pueden existir al menos tres especies químicas (de las cuales algunas son compuestos intermedios) que se interconvierten entre sí; la constante de equilibrio macroscópica describe el equilibrio químico global de todas estas especies [22]. Se le denomina macroscópica, debido a que puede determinarse a partir de propiedades macroscópicas del compuesto en solución, por ejemplo movilidad electroforética, potencial electroquímico, etc.; y por tanto, la información contenida en ella es también macroscópica, *i.e.*, una constante de equilibrio macroscópica está asociada a una ecuación química general, la cual no revela los sitios moleculares de reacción, aunque puede conocerse la carga y la cantidad de partículas intercambiadas [22,23]. A cada especie implicada en la ecuación química asociada a la constante de equilibrio macroscópica se le denomina macro-especie o especie macroscópica. Las ecuaciones químicas asociadas a los macro-equilibrios químicos de los oxicams en solución son las siguientes:



siendo K_{a1} y K_{a2} las constantes de equilibrio macroscópicas correspondientes al intercambio de un protón entre sus tres especies ácido-base macroscópicas: H_2Ox^+ , HOx y

Ox⁻. Nótese que para cada equilibrio (K_{a1} por ejemplo), existen varias especies que se interconvierten entre sí (catión, enol y zwitterion, Figura 1.2), no obstante, el equilibrio global entre estas tres especies está determinado sólo por la macro-constante implicada (K_{a1}).

1.2.2 Constantes de equilibrio microscópicas y micro-especies de los oxicams.

A cualquier constante que describe el equilibrio de la interconversión de dos entidades moleculares particulares se le denomina constante microscópica (o micro-constante) [22]. Por tanto, existe un equilibrio microscópico asociado a la interconversión entre especies químicas de estructura semejante (como isómeros) o incluso entre especies con diferente multiplicidad [22]. Consecuentemente, la interconversión tautomérica tiene una constante microscópica asociada. La cantidad de información que puede obtenerse a partir de una constante de equilibrio microscópica es mayor y mucho más específica; además de la carga y el número de partículas intercambiadas, este tipo de constante relaciona diferentes sitios de reacción a nivel molecular. Así, se consideran explícitamente las estructuras químicas de las especies para plantear la ecuación química relacionada a una micro-constante de equilibrio. A estas especies se les denomina especies microscópicas o micro-especies. Las constantes K_{a11} , K_{a12} , K_{a21} , K_{a22} y K_z en la figura 1.2 corresponden a los micro-equilibrios químicos presentes en el piroxicam. Las primeras cuatro micro-constantes son denominadas micro-constantes de acidez debido a que están asociadas a un micro-equilibrio ácido-base: a la interconversión de la estructura catiónica a la especie zwitterion (K_{a11}) mediante la desprotonación del nitrógeno piridil N1'; de la interconversión del catión a la especie enol (K_{a12}) mediante la desprotonación del oxígeno enol O17; a la interconversión del tautómero zwitterion a la especie anión (K_{a21}) mediante la desprotonación del oxígeno enol O17; a la interconversión de la especie enol al anión (K_{a22}) mediante la desprotonación del nitrógeno piridil N1'. Por tanto, la abundancia relativa de las micro-especies ácido-base puede manipularse modificando las condiciones de pH (Figura 1.2). La constante K_z , también llamada micro-constante de tautomerización está relacionada a la interconversión de la especie enol a la zwitterion (un equilibrio de tautomerización) y puede manipularse modificando la polaridad del medio (figura 1.2).

Debido a su alta especificidad, es necesario disponer de propiedades moleculares para determinar la magnitud de las micro-constantes, generalmente propiedades espectroscópicas (como desplazamientos químicos de Resonancia Magnética Nuclear). En este punto es de mencionar la gran utilidad de los métodos de la química teórica para determinar constantes microscópicas de equilibrio, dado que esta herramienta nos permite disponer de propiedades moleculares de entidades químicas específicas.

1.2.3 Relación entre los macro y micro equilibrios químicos.

El micro-equilibrio está asociado con la inter-conversión química entre dos entidades moleculares particulares del compuesto, mientras que el macro-equilibrio entre el conjunto de especies presentes a determinadas condiciones experimentales, por tanto, conocer la contribución de cada micro-equilibrio (asociado a cada la inter-conversión entre cada una de las micro-especies presentes) nos permite determinar el macro-equilibrio asociado. Por ejemplo, en el caso del conjunto de micro-equilibrios de la figura 1.2, debido a la inter-conversión entre los tautómeros zwitterion y enol del piroxicam; para obtener la constante de acidez macroscópica K_{a1} , debemos de considerar las ecuaciones de los equilibrios químicos ácido-base de cada uno de los tautómeros (K_{a11} y K_{a12}):

$$K_{a11} = \frac{[Zwitt][H^+]}{[H_2Pirox^+]} \quad K_{a12} = \frac{[Enol][H^+]}{[H_2Pirox^+]} \quad K_{a1} = \frac{[Neutro][H^+]}{[H_2Pirox^+]}$$

Puesto que:

$$[Neutro] = [Zwitt] + [Enol]$$

Entonces

$$K_{a1} = \frac{([Zwitt] + [Enol])[H^+]}{[H_2Pirox^+]} = \frac{[Zwitt][H^+]}{[H_2Pirox^+]} + \frac{[Enol][H^+]}{[H_2Pirox^+]} = K_{a11} + K_{a12} \quad (1.3)$$

Por otro lado, ambas especies neutras se disocian a la especie aniónica. En este caso, debemos considerar ambos micro-equilibrios de disociación (K_{a21} y K_{a22}) para obtener el macro-equilibrio K_{a2} :

$$K_{a21} = \frac{[Pirox^-][H^+]}{[Zwitt]} \quad K_{a22} = \frac{[Pirox^-][H^+]}{[Enol]} \quad K_{a2} = \frac{[Pirox^-][H^+]}{[Neutro]}$$

$$\frac{1}{K_{a2}} = \frac{[Neutro]}{[Pirox^-][H^+]} = \frac{[Zwitt]}{[Pirox^-][H^+]} + \frac{[Enol]}{[Pirox^-][H^+]} = \frac{1}{K_{a21}} + \frac{1}{K_{a22}} \quad (1.4)$$

Finalmente, dado que ambos tautómeros se interconvierten a las mismas especies iónicas, es posible relacionar a la micro-constante de tautomerización con las micro-constantes de acidez de cada tautómero.

$$\frac{K_{a11}}{K_{a12}} = \frac{\frac{[Zwitt][H^+]}{[H_2Pirox^+]}}{\frac{[Enol][H^+]}{[H_2Pirox^+]}} = \frac{[Zwitt]}{[Enol]} = K_z \quad \frac{K_{a22}}{K_{a21}} = \frac{\frac{[Pirox^-][H^+]}{[Enol]}}{\frac{[Pirox^-][H^+]}{[Zwitt]}} = \frac{[Zwitt]}{[Enol]} = K_z$$

$$K_z = \frac{K_{a11}}{K_{a12}} = \frac{K_{a22}}{K_{a21}} \quad (1.5)$$

De acuerdo las ecuaciones 1.3, 1.4 y 1.5, la determinación de las macro-constantes (K_{a1} y K_{a2}) y de alguna de las micro-constantes, es suficiente para determinar el total de los equilibrios presentes en la figura 1.2 [22, 24].

1.3 Métodos para la determinación de las constantes de equilibrio

1.3.1 Métodos para la determinación de constantes de equilibrio macroscópicas

En la caracterización de las constantes macroscópicas se monitorea la variación de una propiedad global (macroscópica) del compuesto en solución, como bandas de absorción UV-Visible (valoración espectrofotométrica), movilidad electroforética (valoración por electroforesis capilar de zona), etc., al cambiar determinadas condiciones del medio, como *pH* o concentración. Con esta información es posible calcular las poblaciones de las especies presentes en solución (y su distribución en función del *pH* por ejemplo) mediante un análisis estadístico [25]. Entre mayor sea la cantidad de información analizada, más precisa es la estimación. Para el análisis robusto de una gran cantidad de datos se utilizan programas computacionales como SQUAD [26,27] o HYPQUAD [28,29], los cuales proporcionan la mejor estimación estadística de las constantes de equilibrio de formación global de varios tipos de reacciones químicas, especialmente las que intercambian una partícula, utilizando principalmente matrices de datos espectrofotométricos.

1.3.2 Métodos para la determinación de las constantes de equilibrio microscópicas

A diferencia de las constantes macroscópicas, la determinación de las micro-constantes es generalmente compleja. Esto se debe tanto a su especificidad molecular (se requiere conocer la estructura y propiedades moleculares específicas de cada micro-especie), como a las altas velocidades de interconversión entre las especies involucradas en el equilibrio. Por tanto, existen dos principales aspectos a abordar en la determinación de los micro-equilibrios químicos: 1) disponer de alguna propiedad molecular que permita diferenciar a las dos micro-especies implicadas en el equilibrio (la propiedad debe ser muy distinta entre ambas especies); 2) imponer condiciones experimentales en donde sea posible favorecer a cada una de las micro-especies, con la finalidad de realizar una asignación no ambigua de la propiedad mencionada, a cada molécula. A continuación se describen los métodos comúnmente utilizados en la determinación de estas constantes, así como sus estrategias para abordar dichos inconvenientes:

1.3.1 Detección selectiva.

Si la velocidad de interconversión es muy baja, por debajo de la escala de tiempo de detección de los instrumentos de laboratorio, la identificación de las propiedades individuales de las especies y la determinación de la micro-constante de equilibrio asociada son generalmente triviales. Sin embargo, la utilidad de esta técnica es muy limitada, ya que las velocidades de interconversión son por lo general demasiado rápidas como para la detección aislada de propiedades [30]. Una variante de esta técnica, es la Resonancia Magnética Nuclear a bajas temperaturas, la cual se explica a continuación.

1.3.1.1 Determinación de la constante de tautomerización mediante Resonancia Magnética Nuclear a bajas temperaturas.

Esta metodología se aplica generalmente a sistemas isoméricos, como confórmers o tautómeros. En esta técnica se pretenden detectar los desplazamientos químicos de las especies involucradas de forma individual (generalmente ^1H y/o ^{13}C), disminuyendo la temperatura del sistema, generalmente cerca de los 200 K (dependiendo del sistema químico), con la finalidad de reducir la velocidad de interconversión. Una vez conocidos los desplazamientos de cada especie, es posible determinar la contribución de cada tautómero al desplazamiento químico observado para una mezcla de cualquier proporción. Además de que esta técnica es muy costosa, su aplicación depende de la disponibilidad de un disolvente, en el cual, debido a su polaridad y su temperatura de congelación, se tenga la certeza de que alguno de los tautómeros se encuentra aislado. Los disolventes más utilizados debido a su disponibilidad y bajo punto de congelación son: etanol- d_6 (159.05 K), metanol- d_4 (175.35 K), tolueno- d_8 (178.15 K), acetona- d_6 (179 K), cloroformo- d (209.65 K), entre otros. Así mismo, asegurar que la escala de tiempo de interconversión tautomérica se ha reducido lo suficiente, (para realizar la asignación no ambigua de los desplazamientos químicos) mediante un experimento RMN a bajas temperaturas, no es una tarea sencilla, ya que inicialmente no se conocen los desplazamientos químicos si no de la mezcla, y generalmente es necesario realizar una gran cantidad de experimentos modificando tanto la polaridad como la temperatura del sistema. [31].

1.3.2 Determinación de las micro-constantes de acidez mediante el Método deductivo.

Este método consiste en medir la constante de acidez de un derivado del compuesto problema, el cual tiene al resto de los sitios reactivos de la molécula sustituidos con algún grupo funcional no reactivo, generalmente un grupo metilo. El valor de la constante de este derivado, se considera equivalente a la micro-constante del compuesto problema. Con este valor y determinando las constantes macroscópicas, es posible revelar el resto de las micro-constantes. Por ejemplo, para el caso de la figura 1.2, una vez determinado el valor de la micro-constante K_{a22} mediante el método deductivo (lo cual implicaría metilar al Nitrógeno N1'), así como el de la macro-constante K_{a2} , es posible determinar el valor de K_{a21} mediante la ecuación 1.2. Posteriormente, K_{a21} y K_{a22} revelan K_z mediante la ecuación 1.3. Determinando K_{a1} y resolviendo para K_{a12} utilizando las ecuaciones 1.3 y 1.5, es posible conocer tanto K_{a12} como K_{a11} , por lo que el conjunto de micro-constantes queda determinado. La principal desventaja de este método es que no es fácil establecer el error inherente en el valor de la micro-constante del compuesto problema debido al efecto del sustituyente, por lo que generalmente este error no se determina y el éxito del método radica en que el efecto del sustituyente sea despreciable [24,30].

1.3.3 Determinación espectrofotométrica de la constante de tautomerización manipulando la polaridad del medio.

Este método trata de aprovechar la diferencia en la polaridad de los tautómeros involucrados en el equilibrio, para separarlos manipulando la polaridad del medio. En primera instancia, se toma el espectro UV-visible del compuesto, en mezclas de proporción variable de agua y algún disolvente orgánico. Posteriormente, extrapolando a concentración cero de disolvente orgánico, la constante de tautomerización en agua puede ser determinada. Sin embargo, no hay garantía de que el coeficiente de absortividad molar de un tautómero en particular, medido en algún disolvente orgánico, sea el mismo (permanezca constante) que en agua o en las mezclas de disolventes, ya que generalmente, el cambio de polaridad se traduce en un desplazamiento del máximo de absorción hacia el rojo si la transición es de tipo $\pi-\pi^*$, o hacia el azul si la transición es de tipo $n-\pi^*$ [32].

Adicionalmente, para poder aplicar este método se requiere una longitud de onda apropiada a la cual exista una diferencia suficiente entre los coeficientes de absorptividad molar de los tautómeros. Así mismo, no es posible garantizar una relación lineal entre la proporción tautomérica y la cantidad de disolvente orgánico [24,30].

Las implicaciones inherentes a cada una de las técnicas mencionadas para la determinación de la constante de tautomerización limitan su aplicabilidad e incluso su confiabilidad, por lo que su aplicación requiere de extremo cuidado.

1.4 Estudios previos de las macro y micro constantes de los oxicams.

En la literatura pueden encontrarse varios reportes de las constantes macroscópicas de los 5 oxicams estudiados, utilizando diferentes técnicas como la espectrofotometría UV-Visible y Electroforesis Capilar de Zona (ECZ) [33,34,35]. En la Tabla 1.1 se muestran estos valores. Puede observarse que para algunas de estas constantes, existen diferencias notables entre los valores reportados; por ejemplo, en el pK_{a1} del piroxicam (0.26) y tenoxicam (0.27), así como para el pK_{a2} de lornoxicam (0.46); dichas diferencias han sido atribuidas a las distintas condiciones impuestas en los diferentes estudios.

Tabla 1.1 Valores de las constantes macroscópicas de acidez de los 5 oxicams considerados, reportados por varios autores en agua.

	pK_{a1}	pK_{a2}	Técnica	Condiciones relevantes	Ref.
Isoxicam	-----	3.93	UV-vis	Temperatura impuesta de 25 °C, 1.5×10^{-4} M	[33]
	-----	3.80 (0.07)	UV-vis	1.5×10^{-2} M 5% (v/v) de acetona	[34]
Piroxicam	1.86	5.46	UV-vis	Temperatura impuesta de 25 °C, 1.5×10^{-4} M	[33]
	2.12	5.31 (0.03)	ECZ	5% (v/v) de acetona 1.5×10^{-2} M	[34]
Meloxicam	-----	4.08	UV-vis	Temperatura impuesta de 25 °C, 1.5×10^{-4} M	[33]
	1.09	4.18	UV-vis	2.4×10^{-6} M	[35]
	-----	4.17 (0.11)	ECZ	1.5×10^{-2} M 5% (v/v) de acetona	[34]
Tenoxicam	1.07	5.34	UV-vis	Temperatura impuesta de 25 °C, 1.5×10^{-4} M	[33]
	1.34 (0.07)	5.26 (0.03)	UV-vis	1.5×10^{-4} M	[34]
Lornoxicam	0.85 (0.06)	5.59	UV-vis	Temperatura impuesta de 25 °C, 1.5×10^{-4} M	[33]
	0.86 (0.11)	5.13 (0.03)	ECZ	1.5×10^{-2} M 5% (v/v) de acetona	[34]

Entre paréntesis se muestran los valores de desviación estándar

En la Tabla 1.2 se muestran los valores reportados para las micro constantes de algunos de estos oxicams. Para calcular las micro constantes de acidez del piroxicam, Tackács-Novák *et al.* [24] prepararon el derivado *o*-metil piroxicam (el cual se encuentra metilado en el

oxígeno O17 de la estructura del piroxicam, formando un grupo éter) y determinaron el valor de 2.72 para el único pK_a que presenta dicho derivado (correspondiente a la desprotonación del nitrógeno piridil, figura 1.4). Asumiendo que el efecto de la metilación en el derivado sobre el equilibrio ácido-base K_{a12} del piroxicam (figura 1.2) es despreciable, ellos asignaron el valor de 2.72 al pK_a asociado a dicho equilibrio (del piroxicam). Con este valor para el pK_{a12} , mediante la determinación de la macro constante K_{a1} y el empleo de la ecuación 1.3, obtuvieron la constante de acidez K_{a11} de piroxicam, para posteriormente revelar su constante de tautomerización K_z utilizando la ecuación 1.5.

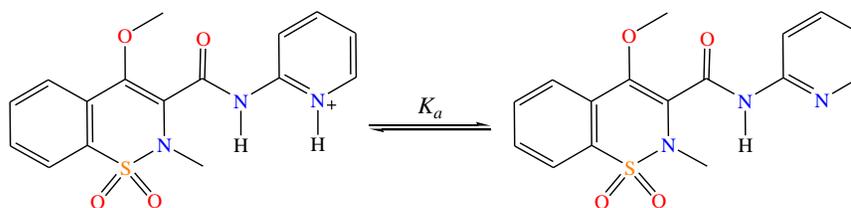


Figura 1.4. Equilibrio ácido-base del *o*-metilpiroxicam, un derivado del piroxicam.

En otro estudio Tsai et al. [33] sugieren que tanto meloxicam como isoxicam poseen sólo un equilibrio de disociación (ver figura 1.3). Dado que el valor de pK_a que ellos determinan para isoxicam (3.93) es muy similar al de meloxicam (4.18), ellos sugieren que el micro-equilibrio K_{a22} de piroxicam debe ser muy similar al de isoxicam y meloxicam (entre 4.18 y 3.93). De hecho ellos le asignaron un valor de 4.0 al pK_{a22} de piroxicam. Sin embargo, no dan alguna explicación adicional que apoye esta suposición, la cual es bastante discutible, especialmente debido a que otros autores han sugerido un segundo equilibrio ácido-base para meloxicam [35].

Para determinar los valores de las micro constantes de tenoxicam y lornoxicam Tsai *et al.* [33] consideraron que la diferencia $pK_{a22}-pK_{a11}$ calculada para piroxicam, es la misma tanto en tenoxicam como en lornoxicam (tanto el equilibrio K_{a11} como el K_{a22} implican la desprotonación del oxígeno enol O17 de estos fármacos, figura 1.2). Sin embargo, ellos no aportan evidencias o explicación que apoye esta suposición. Mediante este análisis, con las constantes macroscópicas K_{a11} y K_{a22} , así como con las ecuaciones 1.3, 1.4 y 1.5, los autores estimaron el resto de las micro-constantes de tenoxicam y lornoxicam.

Para revelar el conjunto de micro-constantes de tenoxicam, Kóczyán y su grupo de investigación [36] prepararon varios derivados de este fármaco, los cuales se encontraban sustituidos en el nitrógeno piridil, o poseían otro grupo funcional (distinto al piridil) en el anillo periférico derecho de la estructura de tenoxicam. Midiendo el pK_a de estos derivados, estudiaron el efecto del sustituyente en la constante de acidez del oxígeno enólico (O17), con la finalidad de encontrar el derivado que mejor mimetizara al anillo piridil original, presente en la estructura de tenoxicam, pero que no contenga un sitio ácido-base reactivo que interfiriera con la determinación de la constante de acidez del grupo enol. Determinando dicha constante y utilizando las ecuaciones 1.3, 1.4 y 1.5, los autores dedujeron el resto de las micro-constantes para este fármaco.

Tabla 1.2 Valores reportados de las micro constantes de los 5 oxicams bajo estudio.

	pK_{a11}	pK_{a12}	pK_{a21}	pK_{a22}	$\log K_z$	<i>Ref</i>
Piroxicam	1.92 ^{a)}	2.72 ^{a)}	5.40 ^{a)}	4.60 ^{a)}	0.8 ^{a)}	[24]
	1.88 ^{b)}	3.32 ^{b)}	5.44 ^{b)}	4.00 ^{b)}	1.44 ^{b)}	[33]
Tenoxicam	1.07 ^{b)}	3.24 ^{b)}	5.34 ^{b)}	3.17 ^{b)}	2.17 ^{b)}	[33]
	1.09 ^{c)}	3.70 ^{c)}	5.32 ^{c)}	2.71 ^{c)}	1.62 ^{c)}	[36]
Lornoxicam	0.85 ^{b)}	3.49 ^{b)}	5.59 ^{b)}	2.95 ^{b)}	2.64 ^{b)}	[33]

No encontramos valores reportados para las micro-constantes K_{a11} , K_{a12} , K_{a21} , K_{a22} y K_z de meloxicam, dado que se ha sugerido que meloxicam, al igual que isoxicam, presenta sólo un equilibrio ácido base (Figura 1.3). No obstante, Luger *et al.* [35] sugiere que meloxicam si presenta las 4 micro-especies mostradas en la Figura 1.2, aunque no reporta el valor de sus micro-constantes. Hasta donde sabemos, la controversia respecto al número de especies y micro-equilibrios químicos que presenta el meloxicam es un tema de discusión actual.

Así mismo, pueden observarse diferencias notables en los valores reportados para las micro-constantes de piroxicam y tenoxicam, especialmente para el pK_{a12} , el pK_{a22} y el

$\log K_z$ de piroxicam (con una diferencia de 0.6 en los tres casos) y para el pK_{a12} (0.46), el pK_{a22} (0.46) y el $\log K_z$ (0.55) de tenoxicam.

La falta de datos y la discrepancia en algunos de los valores, tanto de las micro como de las macro-constantes de los oxicams en estudio, no ha permitido una caracterización completa de los equilibrios químicos en solución de esta familia de fármacos. Esto se debe principalmente a las dificultades inherentes en los métodos disponibles para la determinación de las constantes microscópicas. En este contexto, la química teórica constituye una alternativa viable en el cálculo de las micro-constantes debido a que con esta herramienta es posible obtener energías libres de disociación en solución con un buen nivel de precisión para un gran número de sistemas [37, 38, 39], pero además debido a que mediante los protocolos de la química teórica es posible calcular propiedades moleculares (cuya determinación experimental es complicada), las cuales son necesarias para calcular el valor de las micro-constantes. En la presente tesis de doctorado explotamos estas dos posibilidades con la finalidad de caracterizar totalmente a los micro y macro equilibrios en solución que presenta la familia de los oxicams. En primera instancia utilizamos las energías de transición electrónica obtenidas a partir de la Teoría de Funcionales de la Densidad Dependiente del Tiempo (TD-DFT, por sus siglas en inglés), como la propiedad molecular con la cual identificamos el número y tipo de micro-especies que presenta cada oxicam (especiación) [40]. A continuación, realizamos cálculos termoquímicos a primeros principios para obtener las energías libres de desprotonación asociadas a los micro-equilibrios ácido-base mostrados en la figura 1.2, para posteriormente, apoyándonos en ciclos termodinámicos, obtener los valores de las micro y macro constantes de acidez en solución [41]. Finalmente, utilizamos los desplazamientos químicos de Resonancia Magnética Nuclear obtenidos a partir de métodos teóricos, combinados con determinaciones experimentales, para determinar la constante de tautomerización del fármaco tenoxicam, mediante un análisis estadístico multivariable [42].

CAPITULO 2

“Fundamentos teóricos de los métodos de la química cuántica”

En este capítulo presentamos los fundamentos teóricos de los métodos de la química teórica utilizados en el cálculo de las propiedades de estructura electrónica, empleadas para la identificación de cada una de las micro-especies de los 5 oxicams estudiados, así como en la determinación de los valores de sus micro y macro constantes asociadas. A modo de introducción abordamos aspectos generales de la teoría cuántica, así como del método Hartree-Fock para posteriormente abordar la Teoría de Funcionales de la Densidad, cuyo formalismo fue ampliamente utilizado en la presente tesis.

2.1 La Mecánica Cuántica

La mecánica cuántica surgió debido a la necesidad de formular una nueva teoría que lograra explicar los fenómenos observados a nivel atómico, que no podían explicarse mediante los principios en los que se estructura la mecánica clásica. Ejemplos de estos fenómenos son la naturaleza discreta de la energía, la dualidad onda-materia y la incertidumbre entre posición y momento. Una contribución muy importante para la fusión definitiva que cuantifica estas ideas, fue realizada por el científico austro-húngaro Erwin Schrödinger mediante la ecuación de onda de los cuerpos, en la cual se encuentra la información asociada tanto al comportamiento ondulatorio de las partículas, como a la probabilidad relacionada a su ubicación dentro de cierto elemento de volumen. En la derivación independiente del tiempo de esta ecuación de onda, el formalismo cuántico se convierte en un problema de valores propios. Esta formulación es aplicable para sistemas con potenciales no evolutivos en el tiempo, por tanto, es aplicable para átomos y moléculas en ausencia de campos electromagnéticos externos y se le conoce como ecuación de Schrödinger independiente del tiempo [43]:

$$\hat{H}(\vec{X}_1, \vec{X}_2, \dots, \vec{X}_N) \Psi(\vec{X}_1, \vec{X}_2, \dots, \vec{X}_N) = E \Psi(\vec{X}_1, \vec{X}_2, \dots, \vec{X}_N) \quad (2.1.1)$$

donde la función de onda Ψ es dependiente de las 3 coordenadas espaciales más la de espín (coordenada \vec{X}_i) de las N partículas en el átomo o en la molécula y E es la energía del sistema. El operador Hamiltoniano (\hat{H}), actuando sobre la función de onda Ψ está dado por la siguiente expresión:

$$\hat{H}\Psi(\vec{X}_1, \vec{X}_2, \dots, \vec{X}_N) = -\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 \Psi(\vec{X}_1, \vec{X}_2, \dots, \vec{X}_N) + \hat{V}\Psi(\vec{X}_1, \vec{X}_2, \dots, \vec{X}_N) \quad (2.1.2)$$

El primer término de la derecha en la ecuación 2.1.2 corresponde al operador de la energía cinética de las partículas del sistema mecánico-cuántico, mientras que el segundo término es el operador de la energía de interacción electrostática entre todas las partículas del sistema. La función de onda Ψ solución de 2.1.1 es la función propia del operador Hamiltoniano (\hat{H}) y E el correspondiente valor propio. Sin embargo, no cualquier función de onda es aceptable como solución de la ecuación 2.1.1 Tanto Ψ como sus primeras derivadas deben de ser continuas, Ψ debe ser cuadráticamente integrable (la integral del cuadrado de la función de onda sobre todo el espacio debe existir), normalizada (la integral de su módulo al cuadrado sobre todo el espacio y la coordenada de espín es igual a uno) y debe de cumplir con las condiciones de frontera del sistema en estudio. Estas funciones son denominadas “bien comportadas”.

2.1.1 La ecuación de Schrödinger para muchos cuerpos interactuantes

La función de onda para sistemas multielectrónicos y moleculares puede, en principio, obtenerse resolviendo la ecuación de Schrödinger, formulando los operadores adecuados para la n -ésima partícula del sistema. Por tanto, el Hamiltoniano para moléculas se expresa de la siguiente forma:

$$\hat{H} = -\frac{\hbar^2}{2m_\alpha} \sum_\alpha \nabla_\alpha^2 - \frac{\hbar^2}{2m_i} \sum_i \nabla_i^2 + \sum_\alpha \sum_{\beta > \alpha} \frac{Z_\alpha Z_\beta}{r_{\alpha-\beta}} - \sum_\alpha \sum_i \frac{Z_\alpha e}{r_{i-\alpha}} + \sum_i \sum_{i > j} \frac{e^2}{r_{i-j}} \quad (2.1.3)$$

donde Z representa la carga nuclear, los subíndices α y β denotan a los núcleos, mientras i y j denotan a los electrones del sistema molecular. Los primeros dos términos de la derecha corresponden a la energía cinética de los núcleos y la energía cinética de los electrones respectivamente, mientras que los últimos tres términos corresponden a las interacciones núcleo-núcleo, núcleo-electrón y electrón-electrón, en ese orden.

Debido a la enorme complejidad que representa encontrar una solución a la ecuación 2.1.2, es necesario recurrir a aproximaciones que simplifiquen su tratamiento.

En primera instancia, al ser la masa del núcleo mucho mayor que la de los electrones, su velocidad es correspondientemente pequeña, por lo que a cada configuración nuclear le corresponden varios cambios de configuración de electrones. Bajo esta consideración, un núcleo (fijo) experimenta una nube de carga electrónica, y una configuración nuclear particular posee una distribución de todas las posibles configuraciones de los electrones. Debido a lo anterior, es posible desacoplar los grados de libertad electrónicos de los nucleares. Por tanto, una vez que se ha determinado la posición de cada uno de los núcleos en la molécula, la distribución electrónica está determinada sólo por los grados de libertad de los electrones. En estos términos, los grados de libertad electrónicos se encuentran desacoplados de los grados de libertad de los núcleos, por lo que es posible formular un Hamiltoniano dependiente solo de las coordenadas electrónicas, denominado Hamiltoniano electrónico. Dicho Hamiltoniano no contempla la contribución de la energía cinética nuclear, mientras que la interacción electrostática núcleo-núcleo se mantiene constante. Así mismo, dado que cualquier constante presente en un operador es aditiva a sus valores propios, la dependencia de la función de onda respecto a la configuración nuclear es paramétrica [43]:

$$\hat{H}_{elec} = -\frac{\hbar^2}{2m_i} \sum_i \nabla_i^2 - \sum_\alpha \sum_i \frac{Z_\alpha e}{r_{i-\alpha}} + \sum_i \sum_{i>j} \frac{e^2}{r_{i-j}}$$

$$\hat{H}_{elec} \Psi_{elec} = E_{elec} \Psi_{elec} \quad (2.1.4)$$

mientras que a su función propia Ψ_{elec} y a su energía propia asociada E_{elec} son denominadas función y energía electrónicas respectivamente. Al desacoplamiento de los grados de libertad nucleares de los electrónicos, mediante la consideración de núcleos fijos, se le conoce como aproximación de Born-Oppenheimer [43].

2.2 Soluciones aproximadas al problema de muchos cuerpos.

Pese a la enorme simplificación que implica la aproximación de Born-Oppenheimer, los sistemas multielectrónicos en general no poseen solución analítica. Esto se debe a que el operador ($1/r_{i-j}$) del Hamiltoniano (2.1.4) hace insoluble de forma exacta a la ecuación de Schrödinger 2.1.2 (no permite la separación de variables). Este operador contiene los términos asociados a los acoplamientos electrón-electrón (términos que corresponden a la parte insoluble del problema de muchos cuerpos interactuantes).

2.2.1 El principio variacional de la mecánica cuántica

Se han desarrollado diferentes aproximaciones para obtener soluciones a la ecuación electrónica 2.1.4. El principio variacional de la mecánica cuántica constituye el pilar de la gran mayoría de los métodos actualmente usados para el cálculo de la energía electrónica [43]. El principio variacional establece que la energía obtenida a partir de cualquier función de onda aproximada (función de onda de prueba), utilizada para describir al sistema multielectrónico, tiene como cota inferior a la energía obtenida a partir de la función de onda exacta del sistema (energía exacta E_1 , ecuación 2.2.1.1). Por tanto, minimizar la integral variacional 2.2.1.1 utilizando alguna función de onda de prueba, garantiza obtener una mejor aproximación a la energía electrónica exacta. La función de onda de prueba debe ser bien comportada y debe contener algunos parámetros, denominados parámetros variacionales, los cuales son modificados en la minimización [44].

$$\int \Phi^* \hat{H} \Phi d\tau \geq E_1 \quad (2.2.1.1)$$

Mediante el principio variacional de la mecánica cuántica es posible obtener buenas aproximaciones a la energía, no obstante, la minimización de la integral variacional 2.2.1.1 se aproxima más rápidamente al valor exacto de la energía que a la función electrónica exacta del sistema [45].

2.2.2 El método Hartree-Fock

El método Hartree-Fock corresponde a uno de los primeros modelos de quasi-partículas (o teoría de campo medio) desarrollado para obtener una solución aproximada a la ecuación electrónica 2.1.4. En lugar de considerar el potencial (e^2/r_{i-j}) del Hamiltoniano 2.1.4, asociado a la interacción (acoplamiento) electrónica, en el método de *Hartree* tomamos un potencial efectivo de un cuerpo, de esta forma el problema insoluble de muchos cuerpos acoplados se resuelve como el problema de varios cuerpos individuales cuya interacción está representada por dicho potencial efectivo y es propio para cada partícula del sistema. En este contexto, se genera un conjunto de Hamiltonianos separables de una partícula (electrón) y la función de onda del sistema se representa como un producto de las funciones de onda de los N electrones:

$$\hat{H} = \sum_i^N (\hat{h}_i + v_i^{ef}) = \sum_i^N \hat{G}_i \quad (2.2.2.1)$$

$$\Psi(\vec{X}_1, \vec{X}_2, \dots, \vec{X}_N) = N \phi_1(\vec{X}_1) \phi_2(\vec{X}_2) \dots \phi_N(\vec{X}_N) \quad (2.2.2.2)$$

donde los \hat{G}_i son los Hamiltonianos de una partícula, \hat{h}_i es un operador monoeléctrico que contiene a todos los términos dependientes de las coordenadas de un solo electrón (energía cinética de los electrones y potenciales electrón-núcleo), v_i^{ef} es el potencial efectivo, Ψ es la función de onda de muchos cuerpos y las ϕ_i son las funciones de onda individuales de los N cuerpos (funciones monoeléctricas), las cuales dependen de las 3 coordenadas espaciales más la del espín (\vec{X}_i) de su electrón correspondiente.

En similitud con la aproximación de Born-Oppenheimer, la idea central de la teoría de Hartree es tratar el acoplamiento entre partículas, en este caso entre los electrones. En lugar de considerar la interacción electrón-electrón de forma explícita, se asume que cada electrón interactúa con la distribución de carga del resto de los electrones del sistema. Primero se obtiene la distribución de carga digamos del electrón uno (mediante su función de onda monoeléctrica) y posteriormente se obtiene el potencial (efectivo) de interacción de esta distribución con alguno de los electrones del sistema, digamos el electrón dos:

$$v^{ef} = \int \frac{e|\phi_1|^2}{r_{1-2}} dv_1 \quad (2.2.2.3)$$

donde v^{ef} es el potencial efectivo de la interacción, e la carga del electrón dos, r_{1-2} la distancia media entre ambos electrones y ϕ_1 es la función monoeléctronica (orbital) del electrón 1.

Para el caso en donde un electrón (i) se mueve en el campo de muchos electrones, su potencial efectivo es entonces:

$$v^{ef} = \sum_{j \neq i}^N \int \frac{e|\phi_j|^2}{r_{i-j}} dv_j \quad (2.2.2.4)$$

donde la suma corre sobre los N electrones del sistema (excepto el electrón en cuestión).

Es importante mencionar que la función de onda de muchos cuerpos expresada como un producto de funciones de un cuerpo del tipo 2.2.2.2, no contiene los grados de libertad de espín de los electrones. Para obtener funciones de onda dependientes de las coordenadas de espín de cada electrón, es necesario sustituir los orbitales monoeléctronicos por espín-orbitales, los cuales además de depender de las coordenadas espaciales, dependen de la coordenada de espín. Dado que dos partículas no pueden poseer todos sus números cuánticos iguales, una función de onda expresada como un producto de espín-orbitales de un cuerpo, debe contener todas las posibles permutaciones por pares (debido a que los posibles valores propios de espín para los electrones son dos; α y β), considerando que cada permutación cambia el signo del producto de funciones (propiedad de antisimetría). En este sentido, la función de onda de muchos cuerpos se expresa como una combinación de todos los productos de espín-orbitales, resultantes de todas las permutaciones por pares. Es posible representar a la combinación de productos de espín-orbitales mediante un *Determinante de Slater*:

$$\Psi_{DS}(\bar{X}_1, \bar{X}_2, \dots, \bar{X}_N) = (N!)^{-1/2} \begin{vmatrix} \chi_i(\bar{X}_1) & \chi_j(\bar{X}_1) & \dots & \chi_k(\bar{X}_1) \\ \chi_i(\bar{X}_2) & \chi_j(\bar{X}_2) & \dots & \chi_k(\bar{X}_2) \\ \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ \chi_i(\bar{X}_N) & \chi_j(\bar{X}_N) & \dots & \chi_k(\bar{X}_N) \end{vmatrix} \quad (2.2.2.5)$$

Construir un potencial efectivo mediante una función de onda del tipo 2.2.2.5 implica que los electrones no se mueven de forma independiente en dicho potencial (modelo de Hartree), sino que deben adoptar sólo aquellas configuraciones que satisfagan las propiedades de antisimetría requeridas.

El método de *Hartree-Fock* utiliza una función de onda expresada como un determinante de Slater (satisface las condiciones de antisimetría) para construir el potencial efectivo de una partícula, así como para obtener una aproximación a la función de onda y energía del sistema multielectrónico.

En primera instancia se aplica la integral variacional 2.2.1.1 a la ecuación 2.2.2.5 (ver referencia [43] para los detalles del desarrollo):

$$\begin{aligned}
 E_o = \int \Psi_{DS}^* \hat{H} \Psi_{DS} = \sum_i^N \int \chi_i^*(\bar{X}_m) \hat{h}_i(\bar{X}_m) \chi_i(\bar{X}_m) d\bar{X}_m \\
 + \frac{1}{2} \sum_i^N \int \chi_i^*(\bar{X}_m) \chi_i(\bar{X}_m) \left[\frac{1}{r_{m-n}} \right] \chi_j^*(\bar{X}_m) \chi_j(\bar{X}_n) d\bar{X}_m d\bar{X}_n \\
 - \frac{1}{2} \sum_i^N \int \chi_i^*(\bar{X}_m) \chi_j(\bar{X}_m) \left[\frac{1}{r_{m-n}} \right] \chi_j^*(\bar{X}_m) \chi_i(\bar{X}_n) d\bar{X}_m d\bar{X}_n \quad (2.2.2.6)
 \end{aligned}$$

En 2.2.2.6 se observa que la energía E_o tiene una dependencia funcional con los espín-orbitales de un cuerpo:

$$E_{HF} = E_{HF}[\{\chi_i\}] \quad (2.2.2.7)$$

Dado que el potencial efectivo se construye a partir de los espín-orbitales de los electrones, optimizar estos espín-orbitales garantiza obtener el potencial que mejor representa (dentro del modelo Hartree-Fock) al acoplamiento electrón-electrón. Lo anterior se traduce en una mejor aproximación a la función de onda y energía electrónica del sistema (ya que los operadores restantes en el Hamiltoniano electrónico coinciden con todos los asociados a un sistema de electrones libres, es decir sin interacción). Para optimizar las funciones

monoelectrónicas (y obtener el mejor potencial efectivo) se minimiza la energía de Hartree-Fock 2.2.2.76, respecto a los espín-orbitales $\{\chi_i\}$ llamados orbitales de Hartree-Fock.

$$\min E_{HF}[\{\chi_i\}] \quad (2.2.2.8)$$

Puesto que estos orbitales deben de cumplir la condición de ortonormalidad:

$$\int \chi_i^*(\bar{X}_m) \chi_j(\bar{X}_m) d\tau = \delta_{ij} \quad (2.2.2.9)$$

la minimización en 2.2.2.8 está sujeta a $N(N-1)/2$ restricciones 2.2.2.9, lo que genera la misma cantidad de λ_{ij} multiplicadores de Lagrange. Para llevar a cabo esta minimización, construimos el siguiente funcional auxiliar:

$$L[\{\chi_i\}] = E_0[\{\chi_i\}] - \sum_{i,j} \lambda_{i,j} \left\{ \int \chi_i^*(\bar{X}_m) \chi_j(\bar{X}_m) d\tau - \delta_{ij} \right\} \quad (2.2.2.10)$$

Que constituye el problema variacional de la teoría de *Hartree-Fock*. La solución a este problema es:

$$\frac{\partial L[\{\chi_i\}]}{\partial \chi_i} = 0 \quad (2.2.2.11)$$

Introduciendo 2.2.2.6 en 2.2.2.10 y derivando de acuerdo a 2.2.2.11 tenemos:

$$\sum_i^N \int d\bar{X}_m d\chi_i(\bar{X}_m) \left\{ \begin{array}{l} \hat{h}_i(\bar{X}_m) \chi_i(\bar{X}_m) + \sum_j^N \int d\bar{X}_n \chi_j^*(\bar{X}_n) \chi_j(\bar{X}_n) \left[\frac{1}{r_{m-n}} \right] \chi_i(\bar{X}_m) \\ - \sum_j^N \int d\bar{X}_n \chi_j^*(\bar{X}_n) \chi_i(\bar{X}_n) \left[\frac{1}{r_{m-n}} \right] \chi_j(\bar{X}_m) - \sum_{i,j} \lambda_{i,j} \chi_j(\bar{X}_m) \end{array} \right\} = 0 \quad (2.2.2.12)$$

Definiendo al operador *coulómbico* \hat{J}_j y al de *intercambio* \hat{K}_j :

$$\begin{aligned} \hat{J}_j(\bar{X}_m) \chi_i(\bar{X}_m) &= \int d\bar{X}_n \chi_j^*(\bar{X}_n) \chi_j(\bar{X}_n) \left[\frac{1}{r_{m-n}} \right] \chi_i(\bar{X}_m) \\ \hat{K}_j(\bar{X}_m) \chi_i(\bar{X}_m) &= \int d\bar{X}_n \chi_j^*(\bar{X}_n) \chi_i(\bar{X}_n) \left[\frac{1}{r_{m-n}} \right] \chi_j(\bar{X}_m) \end{aligned} \quad (2.2.2.13)$$

La ecuación 2.2.2.12 puede expresarse como:

$$\sum_i^N \int d\bar{X}_m \delta\chi_i(\bar{X}_m) \left\{ \hat{h}_i(\bar{X}_m) \chi_i(\bar{X}_m) + \sum_j^N \langle \hat{J}_j(\bar{X}_m) \chi_i(\bar{X}_m) - \hat{K}_j \chi_i(\bar{X}_m) \rangle - \sum_{i,j} \lambda_{i,j} \chi_j(\bar{X}_m) \right\} = 0 \quad (2.2.2.14)$$

Ya que las $\{\delta\chi_i\}$ son arbitrarias e independientes, a partir de 2.2.2.14 se obtiene que:

$$\left\{ \hat{h}_i(\bar{X}_m) + \sum_j^N \langle \hat{J}_j(\bar{X}_m) - \hat{K}_j(\bar{X}_m) \rangle \right\} \chi_i(\bar{X}_m) = \sum_{i,j} \lambda_{i,j} \chi_j(\bar{X}_m)$$

$$\left\{ \hat{h}_i(\bar{X}_m) + \mathcal{V}_i^{ef}(\bar{X}_m) \right\} \chi_i(\bar{X}_m) = \sum_{i,j} \lambda_{i,j} \chi_j(\bar{X}_m) \quad (2.2.2.15)$$

Donde \mathcal{V}_i^{ef} es el potencial efectivo del modelo Hartree-Fock. Además de la interacción electrostática, este potencial contiene un término asociado al intercambio entre electrones (ver ecuación 2.2.2.14), el cual no está presente en el potencial de Hartree 2.2.2.3.

El término entre corchetes de la ecuación 2.2.2.15 es conocido como el operador de *Fock* $\hat{f}(\bar{X}_m)$. Empleando esta definición, la ecuación 2.2.2.15 se expresa de la siguiente forma:

$$\hat{f}(\bar{X}_m) \chi_i(\bar{X}_m) = \sum_{i,j} \lambda_{i,j} \chi_j(\bar{X}_m) \quad (2.2.2.16)$$

Considerando que los términos $\lambda_{i,j}$ en 2.2.2.16 son reales, existe una matriz unitaria única U con la cual es posible diagonalizar a la matriz λ , $U^\dagger \lambda U = E$, así como obtener los orbitales $U^{-1} \chi = \varphi$, con los cuales la matriz E es diagonal. Aplicando esta transformación a la ecuación 2.2.2.16 tenemos:

$$\hat{f}(\bar{X}_m) \varphi_i(\bar{X}_m) = \varepsilon_i \varphi_i(\bar{X}_m),$$

$$\int \varphi_i(\bar{X}_m) \hat{f}(\bar{X}_m) \varphi_i(\bar{X}_m) d\bar{X}_m = \varepsilon_i \quad (2.2.2.17)$$

Los φ_i orbitales corresponden a los orbitales canónicos de Hartree-Fock. Los elementos ε_i de la matriz diagonalizada E , corresponden a la energía del i-esimo orbital canónico.

Sumando sobre todas las energías de los orbitales canónicos y comparando con 2.2.2.5, la energía de una función de onda electrónica es:

$$E_{HF} = \sum_i \varepsilon_i - \frac{1}{2} \sum_i \sum_j \int \{\varphi_i(\bar{X}_m) [\hat{J}_j(\bar{X}_m) - \hat{K}_j(\bar{X}_m)] \varphi_i(\bar{X}_m)\} d\bar{X}_m \quad (2.2.2.18)$$

El conjunto de las i ecuaciones 2.2.2.17 se encuentran fuertemente acopladas y se resuelven mediante el método iterativo del Campo Autoconsistente (SCF por sus siglas en inglés).

2.2.3 La Teoría de Funcionales de la Densidad (TFD)

Al igual que la Teoría de Hartree-Fock, la Teoría de Funcionales de la Densidad corresponde a un modelo de cuasi-partículas que estudia de forma colectiva el comportamiento de muchos cuerpos. Sin embargo, a diferencia del método de Hartree-Fock, el potencial efectivo en la TFD es único para todas las partículas del sistema y no específico para cada una de ellas. La TFD nos permite remplazar a la complicada función de onda dependiente de las coordenadas de cada uno de los electrones, por la mucho más sencilla densidad electrónica, que es dependiente sólo de las tres coordenadas espaciales. Es posible obtener la energía electrónica utilizando a la densidad (electrónica), ya que ésta determina directamente el número de electrones así como el potencial generado por la interacción de los electrones con los núcleos del sistema (potencial externo) y éstos son suficientes tanto para formular el Hamiltoniano molecular, así como para conocer la función de onda y todas las propiedades del sistema. El pilar de la TFD está constituido por los teoremas de Hohenberg y Kohn [46]:

Primer teorema de la TFD: El potencial externo $v(r)$ (término asociado a la interacción de los electrones con los núcleos) está determinado unívocamente por la densidad electrónica (más una constante aditiva trivial). Por lo tanto, la densidad electrónica determina la función de onda y todas las propiedades del sistema.

Segundo teorema de la TFD: La densidad electrónica de un estado fundamental no degenerado puede ser calculada en principio, de forma exacta, determinando aquella densidad que minimiza el funcional de la energía del estado fundamental.

El segundo teorema nos proporciona el principio variacional para la TFD, el cual requiere de una expresión del funcional de la energía del estado fundamental. Para establecer dicho funcional, es conveniente trabajar con la matriz de densidad reducida de primer orden

$$\rho(r_1, r'_1) = N \int \Psi(x_1, x_2, x_3, \dots, x_N) \Psi(x'_1, x'_2, x'_3, \dots, x'_N) dx_2 dx_3, \dots, dx_N ds_1 ds'_1 \quad (2.2.3.1)$$

La diagonal $\rho(r_1)$ de dicha matriz nos proporciona la probabilidad de encontrar a un electrón con espín α ($N=N_\alpha$) o con espín β ($N=N_\beta$) en la región entre x_1 y x_1+dx_1

independiente de la localización de los demás electrones y de su valor de espín. De igual forma debemos establecer la matriz de densidad reducida de segundo orden:

$$\gamma(r_1, r_2; r'_1, r'_2) = \frac{N(N-1)}{2} \int \Psi(x_1, x_2, \dots, x_N) \Psi(x_1, x_2, \dots, x_N) dx_3 dx_4 \dots dx_N ds_1 ds'_1 ds_2 ds'_2 \quad (2.2.3.2)$$

cuya diagonal $\rho(r_1, r_2)$ nos da la probabilidad de encontrar a un electrón en la región entre x_1 y x_1+dx y a otro en la región entre x_2 y x_2+dx_2 por pares de electrones $\alpha\alpha, \alpha\beta, \beta\beta, \beta\alpha$.

Las trazas (suma de los elementos diagonales) de las dos matrices nos proporcionan el número total de electrones y el número total de pares de electrones respectivamente. La matriz de densidad reducida de segundo orden puede interpretarse como una probabilidad condicional, la de encontrar un electrón entre x_2 y x_2+dx_2 cuando ya se ha encontrado a otro electrón entre x_1 y x_1+dx_1 . Por tanto puede expresarse mediante:

$$\rho(r_1, r_2) = \frac{1}{2} \rho(r_1) \rho(r_2) + \frac{1}{2} \rho(r_1) \rho(r_2) \Gamma(r_1, r_2) \quad (2.2.3.3)$$

El primer término de la derecha corresponde a la probabilidad si ambos eventos (los de encontrar a los dos electrones) fueran independientes, mientras que el segundo corresponde a la probabilidad condicional de un evento respecto al otro (la probabilidad de encontrar a un electrón en cualquier otro lugar del espacio a excepción del lugar ya ocupado por el otro electrón). El factor de $\frac{1}{2}$ corresponde al promedio en el número de eventos (2 electrones). Por tanto, la función $\Gamma(r_1, r_2)$ es la que correlaciona ambos eventos y es conocida como función de correlación de pares (electrónicos). El producto $\rho(r_2) \Gamma(r_1, r_2)$ nos indica la región de exclusión del electrón uno debida a la presencia del electrón dos: Este término es conocido como hueco de intercambio y correlación:

$$\rho_{xc}(r_1, r_2) = \rho(r_2) \Gamma(r_1, r_2) \quad (2.2.3.4)$$

El hueco de intercambio y correlación describe precisamente la región alrededor del electrón en la que la presencia de otro está excluida en cierto grado. Para el nivel HF por ejemplo, el hueco $\rho^{\alpha\beta} = 0$, debido a que el hueco de coulomb (interacción de dos electrones

con diferente espín) es nulo en esta teoría, mientras que el hueco ρ^{aa} si está descrito adecuadamente debido a que las propiedades de antisimetría se satisfacen mediante una función de onda expresada como un determinante de Slater.

Con la aproximación Born-Oppenheimer, para una configuración dada de núcleos, el valor esperado del Hamiltoniano molecular es:

$$\langle \Psi | \hat{H} | \Psi \rangle = \sum_i \langle \Psi | \hat{T}_i | \Psi \rangle + \sum_i \sum_\alpha \langle \Psi | \frac{1}{r_{\alpha-i}} | \Psi \rangle + \sum_i \sum_{j \neq i} \langle \Psi | \frac{1}{r_{i-j}} | \Psi \rangle \quad (2.2.3.5)$$

Las integrales monoeléctricas pueden expresarse en términos de la matriz de densidad reducida de primer orden, mientras que las integrales bielectrónicas se relacionan con la matriz de densidad reducida de segundo orden de acuerdo con las siguientes expresiones:

$$\begin{aligned} \langle \Psi | \hat{G}_1 | \Psi \rangle &= \int G_1(r_1, r'_1) \rho(r_1, r'_1) dr_1 \\ \langle \Psi | \hat{G}_2 | \Psi \rangle &= \iint G_2(r_1, r_2) \rho(r_1, r_2) dr_1 dr_2 \end{aligned} \quad (2.2.3.6)$$

Utilizando 2.2.3.4 y 2.2.3.6 se obtiene la siguiente expresión para el funcional de la energía:

$$\begin{aligned} E[\rho] &= \int (-\frac{1}{2} \hat{\nabla}_1^2 + v_1) \rho(r_1, r'_1) dr_1 + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1) \rho(r_2)}{r_1 - r_2} dr_1 dr_2 \\ &+ \frac{1}{2} \int \rho(r_1) dr_1 \int \frac{\rho_{xc}(r_1, r_2)_2 dr_2}{|r_1 - r_2|} \end{aligned} \quad (2.2.3.7)$$

donde $v(r_1)$ es el funcional correspondiente a la interacción de los núcleos con los electrones (comúnmente llamado potencial externo). Definiendo

$$V_{xc} = \frac{1}{2} \int \frac{\rho_{xc}(r_1, r_2)_2 dr_2}{|r_1 - r_2|} \quad (2.2.3.8)$$

el funcional de la energía se expresa como:

$$E[\rho] = -\frac{1}{2} \int \hat{\nabla}_1^2 \rho(r_1, r_1') dr_1 + \int v(r) \rho(r_1) dr + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1) \rho(r_2)}{r_1 - r_2} dr_1 dr_2 + \frac{1}{2} \iint \rho(r_1) V_{xc} dr_1 dr_2 \quad (2.2.3.9)$$

Para dicho funcional, la expresión exacta tanto de la energía cinética (primer término de la derecha), como del término V_{xc} no son conocidas.

Si definimos al funcional universal de Hohenberg y Kohn $F_{HK}[\rho]$ como:

$$F_{HK}[\rho] = -\frac{1}{2} \int \hat{\nabla}_1^2 \rho(r_1, r_1') dr_1 + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1) \rho(r_2)}{r_1 - r_2} dr_1 dr_2 + \frac{1}{2} \iint \rho(r_1) V_{xc} dr$$

$$F_{HK}[\rho] = T[\rho] + J[\rho] + \frac{1}{2} \iint \rho(r_1) V_{xc} dr \quad (2.2.3.10)$$

El funcional de la energía puede expresarse:

$$E[\rho] = F_{HK}[\rho] + \int v(r) \rho(r_1) dr_1 \quad (2.2.3.11)$$

De acuerdo con el segundo teorema de la TFD, la densidad de este funcional se obtiene mediante la siguiente minimización:

$$E_0[\rho] = \min_{\rho \rightarrow N} \left\langle F_{HK}[\rho] + \int v(r) \rho(r_1) dr_1 \right\rangle \quad (2.2.3.12)$$

bajo la restricción (la densidad electrónica es definida positiva y su integral sobre todo el espacio es igual al número de electrones);

$$\int \rho(r) dr = N \quad (2.2.3.13)$$

Para dicha minimización, construimos el siguiente funcional auxiliar:

$$L[\rho] = E_0[\rho] - \mu \left[\int \rho(r) dr - N \right] \quad (2.2.3.14)$$

Con μ como el multiplicador de Lagrange asociado a la condición de minimización 2.2.3.13. La condición de mínimo en 2.2.3.14 se cumple con:

$$\frac{\partial L[\rho]}{\partial \rho} = 0 \quad (2.2.3.15)$$

La solución a este problema variacional es [46]:

$$\mu = \frac{\delta E[\rho]}{\delta \rho(r)} = v(r) + \frac{\delta F_{HK}[\rho]}{\delta \rho(r)} \quad (2.2.3.16)$$

Donde μ es conocido como el potencial químico electrónico. Si se conociera el funcional $F_{HK}[\rho]$ (lo que implicaría conocer una expresión exacta para la energía cinética y para las interacciones electrón-electrón) dicha minimización nos proporcionaría la densidad exacta del estado fundamental. La ecuación 2.2.3.16 es la ecuación de trabajo básica en la teoría de funcionales de la densidad, tal y como veremos en el método Kohn-Sham.

2.2.3.1 El método de Kohn-Sham

Este método tiene como objetivo realizar la búsqueda variacional del mínimo de $E[\rho]$ en el espacio de orbitales de un cuerpo. En primera instancia, se considera un sistema de N electrones no interactuantes entre sí, pero que sí interactúan con los núcleos presentes en el sistema. Por tanto, la energía cinética de este sistema puede calcularse de forma exacta utilizando una densidad electrónica obtenida a partir de una función de onda expresada como un determinante de Slater. Bajo estas condiciones, la energía cinética exacta puede obtenerse mediante [47,46]:

$$T_s[\rho] = \int \Psi_{DS} \left[-\frac{1}{2} \sum_i^N \nabla_i^2 \right] \Psi_{DS} d\tau \quad (2.2.3.17)$$

La idea principal en Kohn-Sham es establecer el problema de interés (aquel que sí contempla la interacción electrón-electrón) de tal forma que la $T_s[\rho]$ en 2.2.3.17 sea un componente de su energía cinética exacta $T[\rho]$. Bajo esta consideración, el funcional universal 2.2.3.10 tiene la siguiente expresión:

$$F_{KS}[\rho] = T_s[\rho] + \Delta T[\rho] + \Delta V_{ee}[\rho] + J[\rho] \quad (2.2.3.18)$$

con

$$\begin{aligned}\Delta T[\rho] &= T[\rho] - T_s[\rho] \\ \Delta V_{ee}[\rho] &= V_{ee}[\rho] - \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{r_1 - r_2} dr_1 dr_2 \\ &= V_{ee}[\rho] - J[\rho]\end{aligned}\quad (2.2.3.19)$$

donde $V_{ee}[\rho]$ es el funcional exacto de la interacción electrón-electrón. Especificando a la energía de intercambio y correlación como:

$$E_{xc}[\rho] = \Delta T[\rho] + \Delta V_{ee}[\rho] \quad (2.2.3.20)$$

definimos al funcional universal de Kohn-Sham:

$$F_{KS}[\rho] = T_s[\rho] + J[\rho] + E_{xc}[\rho] \quad (2.2.3.21)$$

para obtener el funcional de la energía:

$$E_0 = F_{KS}[\rho] + \int v(r)\rho(r) dr_1 \quad (2.2.3.22)$$

cuyo problema variacional es:

$$E_0 = \min_{\rho \rightarrow N} \left\langle F_{KS}[\rho] + \int v(r)\rho(r) dr_1 \right\rangle \quad (2.2.3.23)$$

donde se ha usado 2.2.3.12. Aprovechando la solución 2.2.3.16 obtenemos:

$$\mu = \frac{\delta E[\rho]}{\delta \rho(r)} = v_{ef}(r) + \frac{\delta F_{KS}[\rho]}{\delta \rho(r)} \quad (2.2.3.24)$$

El potencial efectivo de Kohn-Sham $v_{ef}(r)$ tiene la siguiente expresión [47]:

$$v_{ef}(r) = v(r) + \frac{\delta J[\rho]}{\delta \rho(r)} + \frac{\delta E_{xc}[\rho]}{\delta \rho(r)} \quad (2.2.3.25)$$

Definiendo al potencial de intercambio y correlación como:

$$v_{xc}(r) = \frac{\delta E_{xc}[\rho]}{\delta \rho(r)} \quad (2.2.3.26)$$

El potencial efectivo de Kohn-Sham se escribe de la siguiente manera:

$$v_{ef}^{KS}(r) = v(r) + \int \frac{\rho(r')}{|r-r'|} dr' + v_{xc}(r) \quad (2.2.3.27)$$

Este potencial es único y todos los electrones del sistema lo experimentan. Por tanto, dado un potencial efectivo, debemos encontrar aquella densidad que satisface a la ecuación 2.2.3.24.

Sin embargo, como se ha mencionado, tomar un sistema de referencia del tipo 2.2.3.17 tiene como objetivo realizar la búsqueda variacional del mínimo de $E[\rho]$ (de forma equivalente) en el espacio de orbitales de un cuerpo. En este sentido el funcional de la energía se expresa como:

$$E[\rho] = T_s[\rho] + J[\rho] + E_{xc}[\rho] + \int v(r)\rho(r)dr$$

$$E[\rho] = \sum_i \sum_s \int \chi_i^*(\bar{X}_m) \left[-\frac{1}{2} \sum_i^N \nabla_i^2 \right] \chi_i(\bar{X}_m) d\bar{X}_m + J[\rho] + E_{xc}[\rho] + \int v(r)\rho(r)dr$$
(2.2.3.28)

Y la densidad electrónica es:

$$\rho(r) = \sum_i \sum_s |\chi_i^*(\bar{X}_m)|^2 \quad (2.2.3.29)$$

Entonces, la mejor densidad electrónica será aquella cuyos orbitales minimicen el funcional de la energía 2.2.3.28. Dichos orbitales deben de cumplir la restricción 2.2.28. El problema variacional bajo estas circunstancias es:

$$\Omega[\chi_i(\bar{X}_m)] = E_0[\rho] - \sum_{i,j} \varepsilon_{i,j} \left\{ \int \chi_i^*(\bar{X}_m) \chi_j(\bar{X}_m) d\tau \right\}$$

$$\frac{\partial \Omega[\chi_i(\bar{X}_m)]}{\partial \chi_i} = 0 \quad (2.2.3.30)$$

Obteniéndose así [47]:

$$\left[-\frac{1}{2} \nabla^2 + v_{ef}^{KS}(r) \right] \chi_i(\bar{X}_m) = \sum_{i,j} \varepsilon_{i,j} \chi_j(\bar{X}_m) \quad (2.2.3.31)$$

Donde $v_{ef}^{KS}(r)$ corresponde al potencial efectivo de la ecuación 2.2.3.27.

Es posible aplicar una transformación unitaria a la ecuación 2.2.3.31, para obtener la energía de los orbitales canónicos de Kohn Sham:

$$\left[-\frac{1}{2} \nabla^2 + v_{ef}^{KS}(r) \right] \varphi_i(\bar{X}_m) = \varepsilon_i \varphi_i(\bar{X}_m) \quad (2.2.3.32)$$

Finalmente, la energía total del sistema se obtiene mediante:

$$E_{KS} = \sum_i \varepsilon_i - \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{r_1 - r_2} dr_1 dr_2 + E_{xc}[\rho] - \int v_{xc} \rho(r) dr \quad (2.2.3.33)$$

La ecuación 2.2.3.33, aún contiene un término desconocido: el potencial de intercambio y correlación v_{xc} . La forma exacta de dicho potencial es desconocida y constituye el principal tema de estudio de la TFD moderna. Actualmente, existen varias aproximaciones para dicho término. Enseguida, se explican algunas de ellas.

2.2.3.2 Aproximaciones locales al potencial de intercambio y correlación, el método LDA.

En esta aproximación se parte de la suposición de que la energía de intercambio y correlación depende únicamente del valor de la densidad electrónica en cada punto del espacio, a lo que se le denomina localidad. La energía de intercambio y correlación está dada por [46]:

$$E_{xc}^{LDA} = \int \rho(r) E_{xc}(\rho) dr \quad (2.2.3.34)$$

La contribución de la correlación e intercambio suele tratarse por separado. Para la contribución al intercambio se tiene que:

$$E_x^{LDA} = -\frac{3}{4} \left(\frac{3}{\pi} \right)^{1/2} (\rho(r))^{1/3} \quad (2.2.3.35)$$

mientras que la energía de correlación es [46]:

$$E_c^{VWN}[\rho] = A \left\{ \ln \frac{x^2}{X(x)} + \frac{2b}{Q} \tan^{-1} \frac{Q}{2x+b} - \frac{bx_0}{X(x_0)} \left[\ln \frac{x-x_0}{X(x)} + \frac{2(b+2x_0)}{Q} \tan^{-1} \frac{Q}{2x+b} \right] \right\} \quad (2.2.3.36)$$

Donde x_0 , b y c son parámetros, y

$$X(x) = x^2 + bx + c$$

$$Q = (4c - b^2)^{1/2} \quad (2.2.3.37)$$

$$x = \rho^{1/2}$$

Entonces al sustituir ambas contribuciones a la energía en la ecuación 2.2.3.34 y derivando (derivada funcional [46]) a cada uno de los términos de la suma $E_{xc}^{LDA} = E_x^{LDA} + E_c^{VWN}$ se llega a:

$$V_{xc} = - \left[\left(\frac{3}{\pi} \right) \rho(r) \right]^{1/3} + V^{VWN} \quad (2.2.3.38)$$

donde V^{VWN} es el potencial de correlación.

2.2.3.3 Aproximaciones semi-locales al potencial de intercambio y correlación, el método GGA.

En la Aproximación de Gradientes Generalizados (GGA por sus siglas en ingles), la localidad de la energía de correlación e intercambio antes supuesta, se pretende corregir

mediante la introducción de gradientes que permitan la variación de la E_{xc} con la posición alrededor de la localidad sugerida por LDA, de tal forma que la E_{xc} en vez de depender de la densidad electrónica en cada punto, depende de dicha densidad alrededor de este punto. La E_{xc} GGA se expresa como:

$$E_{xc}^{GGA} = \int f[\rho(r), \nabla\rho(r)] dr \quad (2.2.3.39)$$

donde f es una función de la densidad electrónica y de su gradiente. Al igual que en LDA la correlación y el intercambio son tratados de forma separada:

$$E_{xc}^{GGA} = E_c^{GGA} + E_x^{GGA} \quad (2.2.3.40)$$

Se ha observado que el término de intercambio LDA suele subestimar a la energía en un 15%. Para la energía de intercambio GGA, Becke propuso adicionar un término de corrección a la E_x LDA:

$$E_x^{GGA} = E_x^{LDA} + E_x^{NoLDA} \quad (2.2.3.41)$$

con

$$E_x^{NoLDA} = \int \rho^{1/3} f^{NoLDA}(x) dr \quad , \quad x = \frac{|\nabla\rho|}{\rho^{4/3}} \quad (2.2.3.42)$$

donde f^{NoLDA} es una función que debe corregir el comportamiento asintótico exacto para la energía de correlación. Para la E_x Becke obtuvo la energía de intercambio:

$$E_x^{B88} = E_x^{LSDA} - b \sum_{\sigma=\alpha,\beta} \int (\rho^\sigma)^{4/3} x_\sigma^2 \left[1 + 6bx_\sigma \ln x + (x^2 + 1)^{\frac{1}{2}} \right]^{-1} dx_\sigma$$

$$x_\sigma = \frac{|\nabla\rho^\sigma|}{(\rho^\sigma)^{4/3}} \quad (2.2.3.43)$$

Donde $b=0.0042$ se obtuvo mediante el ajuste de energías de intercambio Hartree-Fock.

La energía de correlación electrónica es en general más difícil de tratar. Uno de los más conocidos y utilizados es el funcional de correlación de Lee Yang Parr (LYP) [47].

2.2.3.4 Los funcionales de la densidad PBE0, B3LYP y O3LYP

La expresión del funcional *B3LYP* [48] es la siguiente:

$$E_{XC}^{B3LYP}[\rho] = A \cdot E_X^{LDA} + (1-A) \cdot E_X^{HF} + B \cdot E_X^{Becke88} + C \cdot E_C^{LYP} + (1-C) \cdot E_C^{VWN} \quad (2.2.3.44)$$

A, *B* y *C* son parámetros cuyos valores son *A*=0.80, *B*=0.72 y *C*=0.81, obtenidos empíricamente de modo que los resultados ajusten 56 energías de atomización, 42 potenciales de ionización, 8 afinidades protónicas, y 10 energías atómicas correspondientes a elementos de la 1^{ra} fila (excluyendo a la del Hidrógeno); E_X^{HF} es la energía de intercambio exacto.

El funcional *PBE0* [49] tiene la siguiente expresión:

$$E_{XC}^{PBE0}[\rho] = A \cdot E_X^{HF} + (1-A) \cdot E_X^{PBE} + E_C^{PBE} \quad (2.2.3.45)$$

Donde *A* es una constante la cual se ha demostrado que tiene un valor igual a ¼ (por lo cual este funcional se considera híbrido, libre de parámetros). La energía de intercambio PBE está dada por:

$$E_X^{PBE} = \frac{bx^2}{1+ax^2} \quad (2.2.3.46)$$

Siendo *a* y *b* dos constantes cuyos valores son 0.00449 y 0.00336 respectivamente y *x* está dada de acuerdo a la ecuación 2.2.3.43.

El funcional de intercambio y correlación *O3LYP* [50] se expresa de la forma:

$$E_{XC}^{O3LYP}[\rho] = E_X^{OPTX} + A \cdot E_X^{HF} + C + 0.81 \cdot E_C^{LYP} + 0.19 \cdot E_C^{VWN} \quad (2.2.3.47)$$

Siendo *A* un parámetro de valor 0.1161; el funcional de intercambio E_X^{OPTX} es:

$$E_{XC}^{OPTX}[\rho] = -\sum_{\sigma} \int \rho_{\sigma}^{4/3} \left\langle a_1 C_x + a_2 (\gamma x_{\sigma}^2)^2 (1 + \gamma x_{\sigma}^2)^{-2} \right\rangle dr \quad (2.2.3.48)$$

Donde a_1 y a_2 son parámetros con valores de 0.9262 y 0.8133 respectivamente; x_{σ}^2 está dado por la ecuación 2.2.3.43 y $C_x = (3/4)(6/\pi)^{1/3}$.

2.3 Programas computacionales

Todas las propiedades de estructura electrónica de todas las especies de los 5 oxicams estudiados se calcularon mediante los programas computacionales de química teórica Gaussian 03® [51] y Gaussian 09® [52]

CAPITULO 3

*“Propiedades UV-visible de los oxicams en solución;
detección de las especies microscópicas de los 5
oxicams”*

Antes de determinar la magnitud de las macro y micro-constantes de los cinco oxicams estudiados, es necesario determinar el número (y tipo) de micro-especies químicas de cada fármaco, así como asociar a cada micro-especie con una estructura de mínima energía (obtenida mediante métodos teóricos). Para este fin, planteamos la posibilidad de caracterizar a las micro-especies de los oxicams, midiendo los espectros de absorción UV-visible en medios con diferentes condiciones de *pH* y polaridad (ver figura 1.2); y comparando dichos espectros con las energías de transición electrónica obtenidas a partir de la Teoría de Funcionales de la Densidad Dependiente del Tiempo (TD-DFT por sus siglas en inglés).

Los avances recientes realizados en la TD-DFT, han permitido el tratamiento preciso del espectro electrónico de excitación de una gran variedad de sistemas [53,54,55,56]. Los métodos TD-DFT proporcionan resultados de calidad similar que aquellos obtenidos mediante métodos post Hartree-Fock, los cuales son más sofisticados y demandantes de recursos computacionales, especialmente con el funcional PBE0 [57,58,59]. Con esta mejora en el desempeño de la TD-DFT, ha sido posible estudiar el efecto de la isomerización en los espectros de absorción de varios compuestos, por ejemplo algunos colorantes orgánicos, así como algunos nucleósidos de ARN [60,61]. Por tanto, consideramos que las transiciones electrónicas obtenidas a partir de la TD-DFT son adecuadas para asignar de manera no ambigua los espectros de absorción experimentales de los oxicams estudiados.

Las propiedades de absorción UV-visible de algunos oxicams (principalmente piroxicam) han sido estudiadas por diversos grupos de investigación. La Tabla 3.1 muestra un resumen de los resultados reportados en estos estudios. El grupo de Andrade [62] asoció el máximo de absorción del espectro UV-Visible del piroxicam en dioxano ($\lambda^{max} = 329$ nm) con la especie enol de este fármaco. Banerjee et al. observaron un comportamiento de absorción interesante para piroxicam en soluciones de etanol, al cambiar la concentración y las condiciones de *pH* [63,64]. Aumentando la concentración de 10 μ M a 90 μ M, observaron un efecto hipsocrómico (desplazamiento del máximo de absorción hacia el azul) desde $\lambda^{max} = 362$ nm a $\lambda^{max} = 330$ nm. La valoración de la solución 10 μ M con agua acidificada

produjo también un desplazamiento al azul de igual magnitud. Presuntamente, la especie aniónica del piroxicam presente a bajas concentraciones se neutraliza al incrementar el pH del medio, favoreciendo la forma neutra. En contraparte, la valoración de la solución 90 μM con álcali, provoca un desplazamiento hacia el rojo comparable en magnitud con el desplazamiento hacia al azul previamente descrito. Así, el piroxicam neutro, presente a concentraciones más altas, es desprotonado por efecto de la adición del álcali y la $\lambda^{max} = 362$ nm es atribuida a la especie aniónica. A pesar de que la banda de absorción a 330 nm, observada en la solución 90 μM , se asemeja a la observada en dioxano por Andrade ($\lambda^{max} = 329$ nm, asociada a la especie enol), Banerjee la asignó a la especie neutra global zwitterion/enol [63,64]. Experimentos similares llevados a cabo en etanol para meloxicam producen resultados análogos: la especie aniónica se encuentra a bajas concentraciones o en solución con álcali, mientras que las especies neutras se encuentran favorecidas a concentraciones mayores o en solución acidificada [63].

Así mismo, las propiedades de absorción UV-Visible de piroxicam han sido reportadas en solución acuosa a diferentes condiciones de pH (Tabla 3.1). A valores bajos de pH , Andrade *et al.* [65,66] detectaron un espectro que se asemeja al encontrado en dioxano para este fármaco. Por tanto, concluyen que el tautómero enol es responsable de dicho espectro. En la región básica ($pH=10.0$), el espectro de absorción muestra dos bandas principales, claramente asociadas a la especie aniónica, dado que el valor más alto de pK_a de este fármaco es menor a 6.0 [34]. En otro estudio realizado por Gil *et al.* [67], se detecta un máximo de absorción UV-Visible en 359 nm a un pH de 3.0. Gil asume que la especie catiónica de piroxicam, en vez de la especie neutra propuesta por Andrade, es la responsable de esta banda. Es importante mencionar que el valor de pK_{a1} de piroxicam es de 1.83, por lo que a pH de 3.0 se espera que la especie neutra ocupe prácticamente el total de la población.

Adicionalmente, Andrade y su grupo de investigación estudiaron experimentalmente la dependencia de las propiedades espectrofotométricas UV-Visible de piroxicam con la polaridad del medio [62], utilizando mezclas dioxano/agua en diferentes proporciones. Comparando los espectros observados en estos medios con los detectados en los disolventes

puros, concluyen que el espectro de absorción de piroxicam depende de la capacidad del disolvente para formar puentes de hidrógeno. De acuerdo a sus resultados, un conformero cerrado de piroxicam (enol-cc, Figura 3.1) es el responsable del espectro de absorción observado en medios apróticos de baja polaridad, como dioxano ($\lambda^{max} = 329$ nm). En contraste, una conformación abierta del tautómero enol (enol-ca, esquema 3.1) puede asociarse a la banda de absorción observada en disolventes próticos de media y alta polaridad. De acuerdo a sus resultados, el espectro de absorción de la conformación abierta tiene un máximo de absorción de 359 nm con otra señal intensa en 286 nm (registrado en las soluciones de dioxano/agua). Es de mencionar que este espectro es muy semejante al identificado en agua alcalina ($\lambda^{max} = 356$ nm) para la especie aniónica [66]. Finalmente, en un estudio espectrofotométrico experimental y bajo el marco de la Teoría de Funcionales de la Densidad Dependiente del Tiempo, Ferreira de Souza *et al.* reportaron que la conformación cerrada de piroxicam es la responsable de las transiciones electrónicas observadas en medios apróticos de baja polaridad como tetracloruro de carbono [21].

Tabla 3.1. Propiedades espectroscópicas reportadas para las especies de piroxicam a diferentes condiciones experimentales.

Disolvente	Condiciones relevantes	Especie sugerida	λ_{exp}^{max} (nm)	Ref.
1,4-dioxano	Ninguna	Enol-cc	329	[62]
Etanol	90 μ M o acidificado 10 μ M	Enol/zwitterion	330	[65]
Etanol	10 μ M o alcalino 90 μ M ^a	Anión	362	[64]
H ₂ O	pH=10.0 ^a	Anión	356	[63,66]
H ₂ O	pH no impuesto ^a	Enol-oc	359	[63]
H ₂ O	pH =1.8-2.5	Enol-cc	330	[63,66]
H ₂ O	pH =3.0	Catión	359	[67]

^a Una segunda banda a 286 nm también es reportada para estas soluciones

Dadas las inconsistencias arriba mencionadas, es evidente que tanto las propiedades de absorción UV-visible, así como la caracterización de las micro-especies del piroxicam son un tema de discusión abierto, mientras que para el resto de los oxicams, no hemos encontrado reportes enfocados a la caracterización espectrofotométrica de sus micro-especies. Por tanto, es totalmente indispensable realizar un estudio con el cual sea posible

revelar el conjunto de especies microscópicas de los oxicams contemplados en estudio, para posteriormente poder determinar los micro-equilibrios asociados a estas especies. Dicho estudio es el tema central de este capítulo.

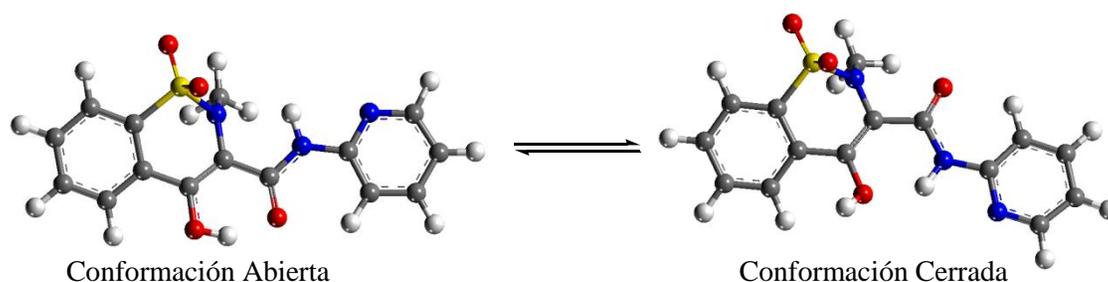


Figura 3.1 Estructuras moleculares de los conformeros abierto y cerrado de la especie enol de piroxicam

3.1 Metodologías

3.1.1 Métodos teóricos.

Para cada micro-especie, la estabilidad conformacional relacionada a las rotaciones presentes en los enlaces C3-C14 y N16-C2' (figura 3.2-a), así como el análisis conformacional de la silla tiazina (S1-C8, figura 3.2b), se llevó a cabo con el funcional PBE0 [68] y la base 6-31+G(d) [69] en fase gas. Seleccionamos las estructuras de menor energía para cada especie y confirmamos que correspondieran a un mínimo en la superficie de energía potencial (PES) mediante el análisis de frecuencias vibracionales. A las estructuras resultantes las reoptimizamos utilizando el mismo nivel de teoría y el modelo PCM [70] para simular el medio (la cavidad del soluto se construyó mediante el modelo Campo de Fuerza Universal, UFF por sus siglas en inglés). Las energías de excitación verticales (λ_{teor}^{excit} en nm) de los oxicams estudiados fueron calculadas para cada micro-especie en la conformación de mínima energía encontrada, usando el funcional PBE0 y el conjunto base 6-311++G(d,p), así como el modelo PCM. Consideramos un total de tres transiciones para cada cálculo. Sólo las energías de excitación teóricas λ_{teor}^{excit} con la fuerza del oscilador más grande se compararon con los máximos de absorción experimentales λ_{exp}^{max} . Con motivos de comparación, una metodología muy similar se llevó a cabo

utilizando el funcional B3LYP [48]; es decir, se obtuvieron las energías de excitación al nivel PCM-B3LYP/6-311++G(d,p)//PCM-B3LYP/6-31G+(d,p) para la conformación de mínima energía encontrada en todos los disolventes para cada micro-especie de los 5 oxicams estudiados. Así mismo, la energía libre en solución de las especies neutras (zwitterion y enol) se calcularon mediante $G_{soln}^* = G_{gas}^* + \Delta G_{soln}^*$ donde G_{gas}^* es la energía libre en fase gas a 298.15K obtenida para las geometrías de mínima energía optimizadas en fase gas y ΔG_{soln}^* es la energía libre de solvatación de las especies (calculada como la diferencia en energía entre un cálculo de punto simple en ausencia del dieléctrico y otro en presencia del dieléctrico), obtenida con el modelo PCM (considerando solo las contribuciones electrostáticas) al nivel B3LYP/6-31+G(d). Las energías libres en solución las utilizamos para obtener la distribución de Maxwell-Boltzman de las especies neutras en todos los medios considerados, con la finalidad de apoyar las asignaciones de los máximos de absorción de las especies neutras de los oxicams bajo estudio. La distribución de Maxwell-Boltzman se realizó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$c_i = \frac{e^{-(G_i - G_0)/kT}}{\sum_i e^{-(G_i - G_0)/kT}} \quad (3.1)$$

Donde k es la constante de Boltzmann, T la temperatura, c_i es el factor de peso, correspondiente a la población de la especie y G_i es la energía libre la i -ésima especie en cada medio.

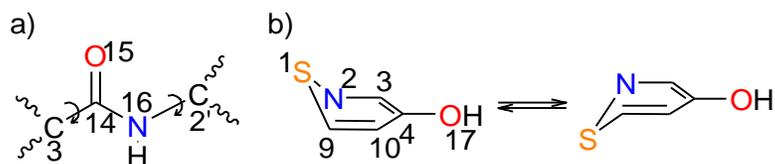


Figura 3.2 a) Rotaciones exploradas para las especies microscópicas de los oxicams. b) conformaciones de la media silla tiazina.

3.1.2 Procedimiento Experimental.

Los espectros de absorción UV-Visible y las bandas máximas de absorción (λ_{exp}^{max}) de los cinco oxicams bajo estudio se registraron a las concentraciones 27 μM y 100 μM . Tal y

como hemos mencionado, es posible manipular los equilibrios microscópicos de los oxicams, modificando tanto la polaridad como las condiciones de *pH* del medio. En este contexto, para contemplar el efecto de la polaridad del medio, preparamos soluciones a las concentraciones mencionadas en disolventes con diferente valor de constante dieléctrica (desde muy baja hasta muy alta), como lo son: 1,4-dioxano ($\epsilon=2.2$), etanol ($\epsilon=24.9$), agua desionizada ($R=18.2\text{ m}\Omega$, $\epsilon=78.4$) y formamida ($\epsilon=109.6$). Para manipular las condiciones de *pH*, mezclamos los disolventes puros con soluciones acuosas a *pH* impuesto, en donde el disolvente orgánico fue el componente molar principal. Dichas soluciones se prepararon de acuerdo a la Tabla 3.2, a las dos concentraciones mencionadas. Las mediciones en soluciones de formamida acidificada se realizaron en menos de un minuto, con tal de evitar la hidrólisis de la formamida, de acuerdo a los resultados de Viar et al. [71]. Todos los espectros de absorción se registraron en un espectrofotómetro UV-Visible Perking-Elmer Lambda 35. Se realizó la corrección de la línea base con el correspondiente disolvente (o mezcla de disolventes) antes de medir cada conjunto de espectros. Todos nuestros experimentos los realizamos a temperatura ambiente, con tres repeticiones en tres días distintos y no se observó variaciones en las bandas.

Tabla 3.2. Medios preparados a diferentes *pH* 's, de los cinco oxicams estudiados.

Medio	Relación molar	<i>pH</i> de la fracción acuosa
Etanol/ Agua	6:1	2.5
Etanol/ Agua	6:1	10.0
Agua		0.6
		Isoxicam, 2.6 ^{a)}
		Piroxicam, 3.7 ^{a)}
		Meloxicam, 2.6 ^{a)}
Agua		Tenoxicam, 3.2 ^{a)}
		Lornoxicam, 3.0 ^{a)}
Agua		10.0
Formamida/Agua	4:1	0.6
Formamida/Agua	4:1	10.0

^{a)} Punto isoeléctrico del fármaco

3.2 Resultados

3.2.1 Evaluación del protocolo teórico.

Es importante evaluar el desempeño de los funcionales de la densidad seleccionados para reproducir los máximos de absorción registrados experimentalmente. Así mismo, es necesario disponer de un nivel de teoría adecuado para realizar la asignación no ambigua de dichos espectros. El desempeño global de los niveles de teoría PBE0/6-311++G(d,p)//PBE0/6-31+G(d) y B3LYP/6-311++G(d,p)//B3LYP/6-31+G(d) (39 energías de excitación en total) se presentan en las figuras 3.3 y 3.4 respectivamente. En general, el desempeño del funcional PBE0 es mejor que el de B3LYP. Se observa un buen acuerdo entre las λ_{exp}^{max} calculadas con el funcional PBE0 ($R^2 = 0.93$), mejor que el observado con B3LYP ($R^2 = 0.89$). La Desviación Media Absoluta (DMA) y el Error Medio Absoluto (EMA) obtenidos con el funcional PBE0 fueron 4.5 nm y 7.08 nm respectivamente, mucho menores que los observados para B3LYP (DMA = 13.23 nm, EMA = 22.85 nm). Las λ_{teor}^{excit} obtenidas con ambos funcionales son generalmente mayores que las λ_{exp}^{max} correspondientes. Así mismo, el error más grande de ambos funcionales se observa para meloxicam en dioxano (~25 nm para PBE0 y ~48 nm para B3LYP). En general las energías de excitación teóricas son calculadas con una mejor precisión para isoxicam en todos los medios: DMA=3.7 nm y EMA = 4.0 nm para PBE0; DMA=4.43 nm y EMA = 4.7 nm para B3LYP.

Para el resto de los oxicams, PBE0 y B3LYP tienen errores dentro 10 y 25 nm respectivamente. En todos los disolventes estudiados se observa que los resultados con el funcional PBE0 siempre son más próximos a los experimentales, que los obtenidos con B3LYP. Debido a estos resultados, recomendamos usar el funcional PBE0 para el cálculo de las energías de excitación de moléculas con estructura similar a la de los oxicams. Por tanto, el siguiente análisis de resultados se realizó con base en las energías de excitación teóricas calculadas con el funcional PBE0.

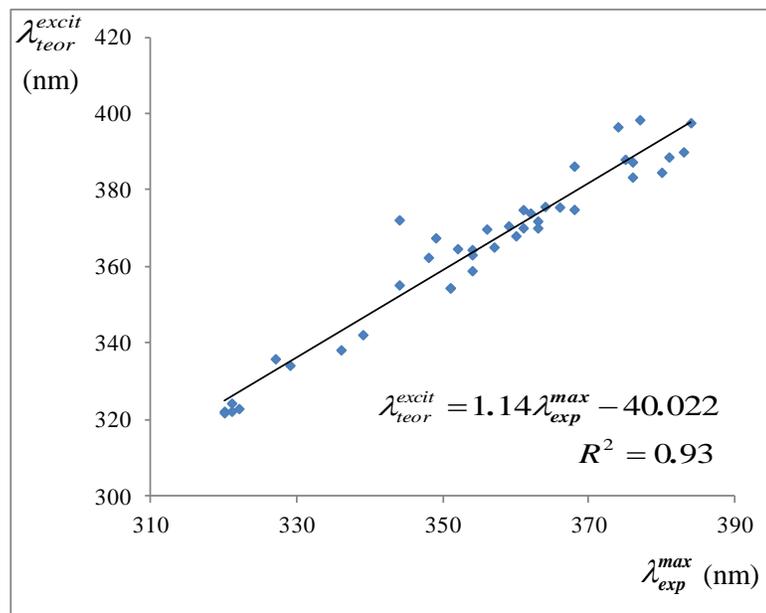


Figura 3.3 Perfil de correlación entre las longitudes de onda calculadas al nivel de teoría PBE0/6-311++G(d,p)//PBE0/6-31+G(d) con los máximos de absorción registrados experimentalmente de todas las micro-especies de los 5 oxicams estudiados.

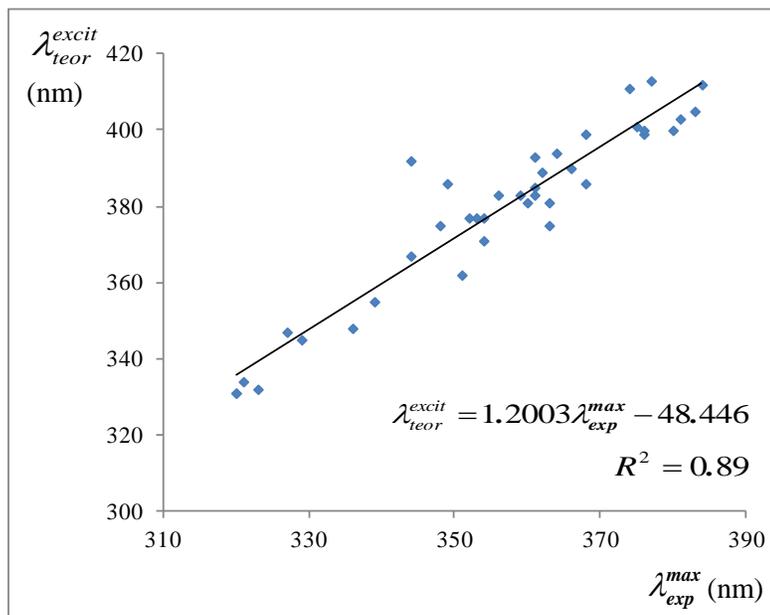


Figura 3.4 Perfil de correlación entre las longitudes de onda calculadas al nivel de teoría B3LYP/6-311++G(d,p)//B3LYP/6-31+G(d) con los máximos de absorción registrados experimentalmente de todas las micro-especies de los 5 oxicams estudiados.

Tabla 3.3. Energías libres en solución relativas (ΔG , en kcal/mol) y distribuciones de Maxwell-Boltzmann (MB) de las especies neutras de todos los oxicams.

	Isoxicam		Piroxicam		Meloxicam		Tenoxicam		Lornoxicam	
	ΔG	MB								
Fase Gas										
Enol-cc	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00
Enol-ca	14.00	0.00	14.45	0.00	13.70	0.00	14.45	0.00	14.53	0.00
Zwitterion	----	----	8.66	0.00	8.11	0.00	7.5	0.00	6.67	0.00
1,4-dioxano										
Enol-cc	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00
Enol-ca	13.25	0.00	13.73	0.00	13.00	0.00	13.93	0.00	14.04	0.00
Zwitterion	----	----	4.55	0.00	5.13	0.00	3.22	0.00	4.20	0.00
Etanol										
Enol-cc	0.00	1.00	1.29	0.10	0.00	0.60	2.69	0.01	3.40	0.00
Enol-ca	8.51	0.00	8.92	0.00	8.20	0.00	12.53	0.00	9.85	0.00
Zwitterion	----	----	0.00	0.90	0.25	0.40	0.00	0.99	0.00	1.00
Agua										
Enol-cc	0.00	1.00	1.35	0.09	0.27	0.39	2.68	0.01	3.37	0.00
Enol-ca	8.42	0.00	9.71	0.00	7.77	0.00	12.22	0.00	12.20	0.00
Zwitterion	----	----	0.00	0.91	0.00	0.61	0.00	0.99	0.00	1.00
Formamida										
Enol-cc	0.00	1.00	1.87	0.04	0.49	0.31	3.21	0.00	3.87	0.00
Enol-ca	7.75	0.00	8.18	0.00	7.40	0.00	9.27	0.00	9.31	0.00
Zwitterion	----	----	0.00	0.96	0.00	0.69	0.00	1.00	0.00	1.00

3.2.2 Comportamiento de absorción UV-Visible y micro-especies de los oxicams en 1,4-dioxano.

Debido al valor de la constante dieléctrica del 1,4-dioxano ($\epsilon = 2.2$), la población de la especie enol de todos los oxicams debe estar favorecida en la solución. De hecho, de acuerdo al estudio de Andrade [62] el confórmero cerrado del enol debería ser el más abundante debido a que el 1,4-dioxano es un disolvente no-prótico. En la Tabla 3.3 se muestra la distribución de Maxwell-Boltzmann calculada para las especies neutras en dioxano (y en el resto de los medios estudiados). Puede observarse que en este medio se encuentra totalmente favorecido el tautómero enol-cc sobre el zwitterion. Así mismo, las

energías de excitación teóricas λ_{teor}^{excit} de las estructuras de mínima energía del enol-cc, se encuentran muy próximas a los máximos de absorción experimentales, en un rango de 10 nm (25 nm para meloxicam) y por tanto, las consideramos como las responsables de las bandas de absorción observadas en este medio (Tabla 3.4). Los espectros de absorción experimentales mostrado en la figura 3.5 para los 5 fármacos bajo estudio, se asignaron a la especie enol de todos los oxicams.

Tabla 3.4. Espectro de transiciones electrónicas teórico y experimental en 1,4-dioxano de la especie enol-cc de los oxicams estudiados.

Oxicam	E (eV) ^a	λ_{teor}^{excit} (nm) ^a	E (eV) ^b	λ_{teor}^{excit} (nm) ^b	λ_{exp}^{max} (nm)
Isoxicam	3.85	322	3.85	334	321
Piroxicam	3.71	333	3.58	347	327
Meloxicam	3.34	369	3.18	392	344
Tenoxicam	3.53	351	3.34	367	344
Lornoxicam	3.43	362	3.29	377	353

^a) PCM-PBE0/6-311++G(d,p)//PCM-PBE0/ 6-31G+(d,p)

^b) PCM-B3LYP/6-311++G(d,p)//PCM-B3LYP/ 6-31G+(d,p)

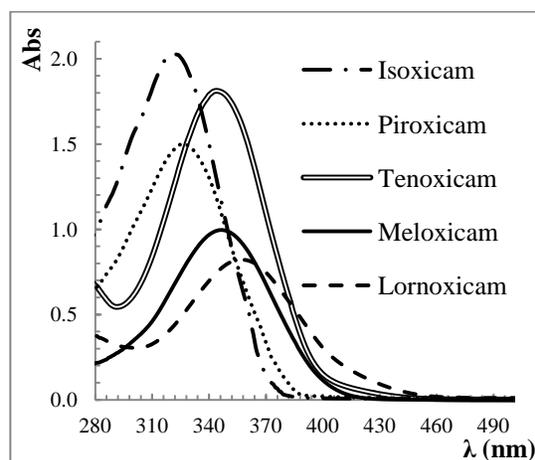


Figura 3.5. Espectros de absorción UV-Visible registrados en la solución de 1,4-dioxano para los cinco oxicams bajo estudio.

3.2.3 Comportamiento de absorción UV-Visible y micro-especies de los oxicams en etanol.

Un aspecto a resaltar en etanol, es que las posiciones de las bandas de absorción experimentales dependen de la concentración del oxicam, lo que modifica tanto el máximo de absorción como la forma de los espectros. Esto sugiere que a medida de que la concentración del oxicam cambia, la especie predominante también. Los máximos de absorción de mayor energía se detectaron en las soluciones más concentradas (pH no impuesto) de oxicam (100 μM). Un efecto batocrómico ($\Delta\lambda\sim 27$ nm) se observó al disminuir la concentración hasta 27 μM . A continuación, realizamos la asignación de las bandas observadas, comparando las transiciones electrónicas teóricas calculadas con los datos experimentales, De acuerdo a la Tabla 3.5, las transiciones calculadas para la especie enol, corresponden a las observadas en la solución más concentrada (mayor diferencia respecto a las experimentales de 16 nm), mientras que las predichas para la especie anión de los oxicams, corresponden a las soluciones diluidas (mayor diferencia respecto a las experimentales de 11 nm). Adicionalmente, vale la pena mencionar que las longitudes de onda de los máximos de absorción de la especie enol-cc detectadas en 1,4-dioxano (Tabla 3.4) son muy semejantes, tanto teórica como experimentalmente a las observadas en la solución concentrada de etanol (Tablas 3.4 y 3.5, Figuras 3.5 y 3.6). Consecuentemente, la especie enol-cc es la que predomina en la solución concentrada. Interesantemente, de acuerdo a la distribución de Maxwell-Boltzman en etanol (Tabla 3.3), la especie neutra más estable en este disolvente es la zwitterion y no el enol-cc, sin embargo la diferencia entre el máximo de absorción experimental con la energía de excitación teórica calculada para la especie zwitterion es mayor (69 para piroxicam, 17 para meloxicam, 30 para tenoxicam y 33 para lornoxicam) que la calculada para la especie enol (4 para piroxicam, 16 para meloxicam, 10 para tenoxicam y 9 para lornoxicam). Por tanto, se considero a la especie enol como la predominante en este medio.

Soluciones acidificadas y alcalinizadas de etanol: Cuando la solución 27 μM en etanol es acidificada, el máximo de absorción se desplaza hacia el azul: isoxicam 34 nm, piroxicam 32 nm, meloxicam 17 nm, tenoxicam 24 nm y lornoxicam 25 nm. Este efecto hipsocrómico desplaza los máximos de absorción de cada oxicam, hasta el correspondiente observado en

la solución concentrada de etanol. Dado que los cambios de pH afectan a las especies ácido-base activas, acidificando la solución diluida se interconvierte al oxicam desde su forma aniónica hasta su especie enol. Por otra parte, cuando la solución concentrada $100\ \mu\text{M}$ es alcalinizada, la banda máxima de absorción se desplaza hacia el rojo, hasta la banda observada en la solución diluida de etanol puro. Por tanto, alcalinizar la solución cambia a la micro-especie, de la neutra a la aniónica. Adicionalmente, dado que la estructura molecular del isoxicam sólo permite la protonación/desprotonación del oxígeno enol O17 de este fármaco [34], se infiere que para el resto de los oxicams está presente también este equilibrio. La dependencia del espectro de absorción con la concentración y el pH de las soluciones de etanol de los cinco oxicams estudiados en etanol, se muestra en la Figura 3.6.

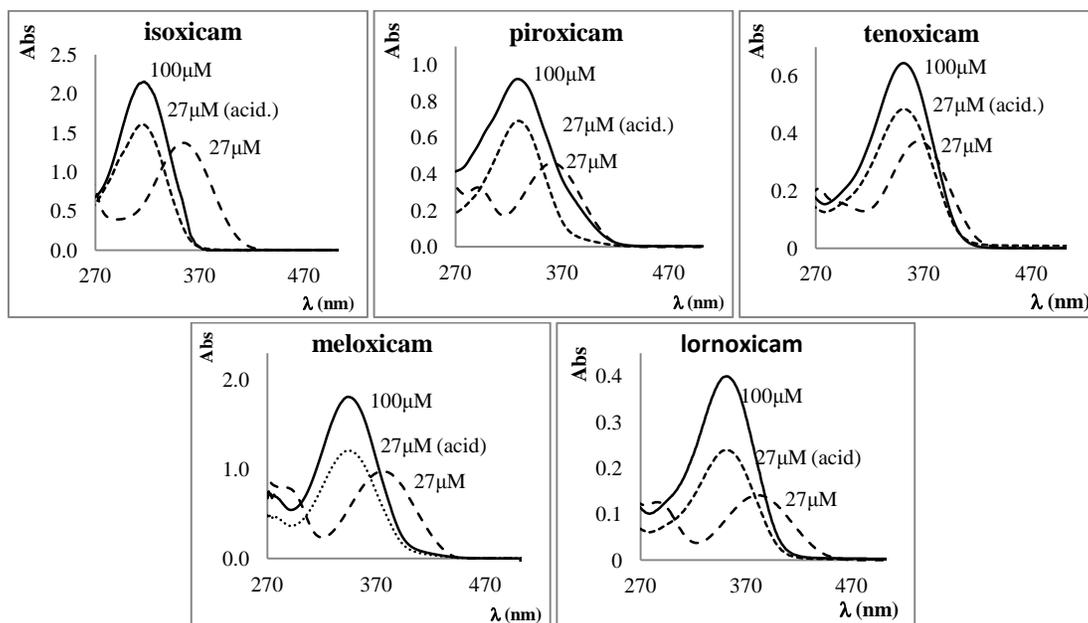


Figura 3.6. Espectros de absorción UV-Visible registrados en las soluciones de etanol consideradas, para los cinco oxicams estudiados.

Con la finalidad de explorar la existencia de la conformación abierta de la especie enol en la solución diluida, comparamos las transiciones electrónicas calculadas para las geometrías optimizadas en solución de la conformación abierta de cada oxicam, con las detectadas experimentalmente (Tabla 3.5). Para todos los oxicams bajo estudio, el valor de λ_{teor}^{excit} del enol-ca siempre es más cercano al λ_{exp}^{max} observado en la solución concentrada que en la

diluida (ver Tabla 3.5). Por tanto, es la especie anión y no la especie enol-ca, la responsable del espectro experimental observado en este medio, tal y como lo sugirió Andrade [66]. Nuestros cálculos teóricos demuestran que, en general, las conformaciones cerradas son más estables por unas 10 kCal/mol respecto a la conformación abierta. Lo anterior indica que las conformaciones abiertas son inexistentes bajo estas condiciones.

Tabla 3.5. Transiciones TD-DFT más intensas calculadas teóricamente y máximos de absorción detectados en las soluciones de etanol estudiadas.

Especies	E (eV) ^{a)}	E (eV) ^{b)}	λ_{teor}^{excit} (nm) ^{a)}	λ_{teor}^{excit} (nm) ^{b)}	λ_{exp}^{max} (nm)	
					100 μ M	27 μ M
Isoxicam						
Enol-cc	3.87	3.75	320	331	320	
Enol-ca	3.88	3.74	319	332		
Anión	3.42	3.29	362	377		354
Piroxicam						
Zwitterion	3.32	3.12	374	398		
Enol-cc	3.72	3.59	333	345	329	
Enol-ca	3.72	3.55	333	349		
Anión	3.33	3.22	372	385		361
Meloxicam						
Zwitterion	3.39	3.25	366	381		
Enol-cc	3.38	3.21	365	386	349	
Enol-ca	3.30	3.13	375	396		
Anión	3.31	3.12	374	390		366
Tenoxicam						
Zwitterion	3.26	3.08	381	402		
Enol-cc	3.53	3.39	361	362	351	
Enol-ca	3.54	3.38	350	367		
Anión	3.23	3.09	383	401		375
Lornoxicam						
Zwitterion	3.22	3.06	385	406		
Enol-cc	3.43	3.29	361	377	352	
Enol-ca	3.44	3.29	360	377		
Anión	3.15	3.00	394	413		377

^{a)} PCM-PBE0/6-311++G(d,p)//PCM-PBE0/ 6-31G+(d,p)

^{b)} PCM-B3LYP/6-311++G(d,p)//PCM-B3LYP/ 6-31G+(d,p)

3.2.4 Comportamiento de absorción UV-Visible y micro-especies de los oxicams en solución acuosa.

El comportamiento de los oxicams en solución acuosa ha sido descrito por varios autores, mediante espectroscopia UV-Visible [24,33,34]. En este medio, los espectros registrados son independientes de la concentración (hasta llegar al límite de saturación), pero muy sensibles al cambio de *pH*. Para identificar las especies absorbentes, es conveniente analizar su comportamiento ácido-base. Como se ha mencionado, isoxicam sólo posee un valor de *pK_a* (correspondiente a la desprotonación del enol) de 3.9, por lo que en solución acuosa sólo pueden coexistir el enol y la especie aniónica. A *pH* 's menores a su *pK_a* (*pH* =2.6), se observa un máximo en 320 nm, muy semejante al registrado en la solución de etanol (con una diferencia de 2 nm); adicionalmente la transición electrónica calculada para la especie enol en este medio, es de 322 nm, muy próxima a la experimental. Así mismo, la distribución de Maxwell-Boltzman calculada para isoxicam en agua predice un 100% de la conformación cerrada de la especie enol. Lo anterior demuestra que la especie predominante a valores menores al *pK_a* del isoxicam es precisamente la enol-cc. El comportamiento de absorción UV-Visible de los otros cuatro oxicams en su punto isoeléctrico es interesante. Las poblaciones calculadas mediante la distribución de Maxwell-Boltzman para estos cuatro fármacos en agua sugieren que el tautómero zwitterion es el más abundante en este medio. Los resultados de la Tabla 3.5 muestran que las energías de excitación teóricas calculadas para la especie zwitterion de piroxicam, tenoxicam y lornoxicam, son mucho más cercanas que aquellas calculadas para la especie enol; por ejemplo la λ_{teor}^{excit} del piroxicam zwitterion (371 nm) es más cercana al máximo de absorción $\lambda_{exp}^{max}=361$ que el del piroxicam enol $\lambda_{teor}^{excit}=322$ nm. Lo anterior refleja que la constante dieléctrica del agua ($\epsilon =78.4$) favorece a la especie zwitterion sobre la enol, está última más abundante en 1,4-dioxano ($\epsilon =2.2$). Meloxicam es un caso especial, ya que como se ha mencionado, existe cierta controversia respecto a la existencia tanto del tautómero zwitterion como de su especie catiónica. Al igual que para piroxicam, tenoxicam y lornoxicam, la energía de excitación calculada para la especie zwitterion está más próxima al máximo experimental, que aquella calculada para la especie enol; además,

puede observarse que, tanto el máximo de absorción como la forma del espectro medido en la solución de 1,4-dioxano (asignado a la especie enol) son totalmente diferentes a los observados en la solución acuosa al punto isoeléctrico del meloxicam (figuras 3.4 y 3.7). Nuestros resultados indican que en estas condiciones la especie absorbente es el zwitterion y no el enol de meloxicam. La dependencia del espectro de absorción con el pH de los cinco oxicams estudiados en solución acuosa, se muestra en la Figura 3.7.

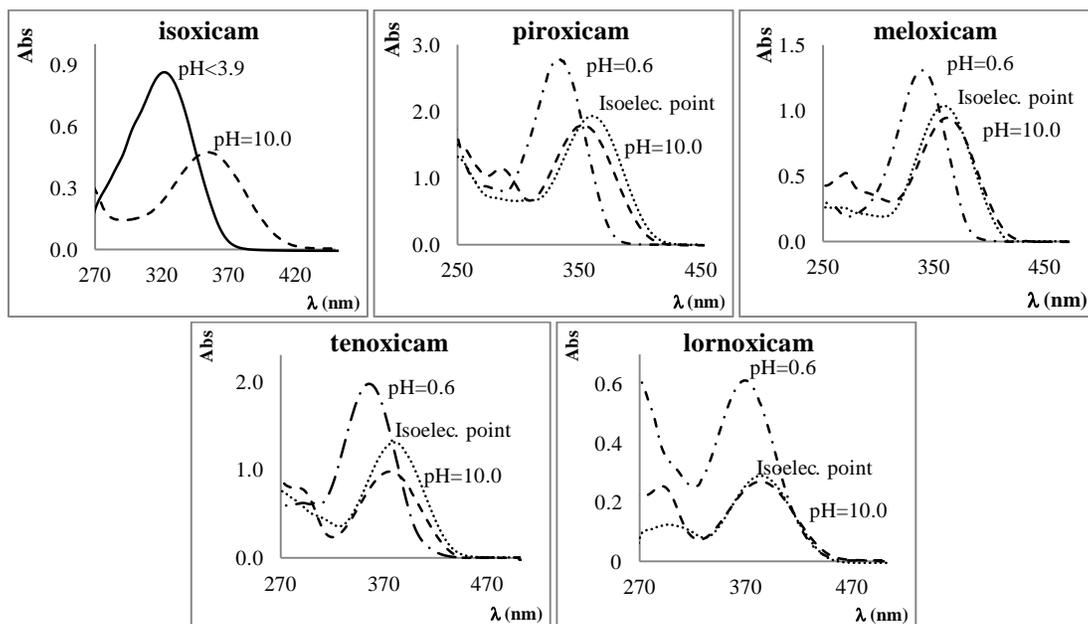


Figura 3.7. Espectros de absorción UV-Visible registrados en solución acuosa a diferentes valores de pH , para los cinco oxicams estudiados.

Soluciones acuosas acidificadas y alcalinizadas. En general, las energías de excitación teóricas calculadas para la especie catiónica de los oxicams (excepto isoxicam) son muy semejantes al máximo de absorción detectado experimentalmente a $pH = 0.6$ (Tabla 3.6). De acuerdo a los valores de pK_a reportados para todos los oxicams (Tabla 1.1), la especie predominante en estas condiciones es la H_2OX^+ . Estos datos indican que la especie absorbente en estas condiciones es el catión de los oxicams, incluso el de meloxicam, el cual no se ha considerado en estudios previos [33,64,72]. De hecho, una nueva banda de absorción experimental detectada en estas condiciones confirma que el meloxicam posee el mismo comportamiento que piroxicam, tenoxicam y lornoxicam, mostrado en la figura 1.2.

Por otra parte, estos resultados sugieren que la banda de absorción observada por Andrade y sus colaboradores [66], supuestamente asociada con la forma enol, se debe a la especie catiónica de piroxicam. En el mismo análisis, el espectro de absorción reportado por Gil et al [67] en solución acuosa de piroxicam a $pH = 3.0$, claramente se asemeja al detectado para la especie zwitterion en este estudio. Tomando en cuenta los valores de pK_a de este fármaco (Tabla 1.1), es evidente que bajo esas condiciones la especie favorecida es la zwitterion y no el catión. Las energías de excitación teóricas calculadas (Tabla 3.6) para la especie zwitterion (371 nm) son mucho más cercanas al máximo de absorción reportado por Gil a $pH = 3.0$ (359 nm), que aquella calculada para el catión (334 nm) de piroxicam. Por tanto, la forma zwitterion y no la especie catiónica reportada, es la que se encuentra en solución, bajo las condiciones impuestas por estos autores [67].

Finalmente, considerando los valores de pK_a de los 5 oxicams (Tabla 1.1), al valor de pH impuesto de 10.0, la especie más abundante es el anión. Se observa un buen acuerdo entre los máximos de absorción registrados a estas condiciones, con las energías de excitación teóricas calculadas para la estructura de mínima energía de la especie aniónica de los fármacos, confirmando la presencia de la especie aniónica. Cabe mencionar que el espectro registrado en solución acuosa alcalina de los oxicams, se asemeja, en todos los casos, al detectado en la solución 27 μM de etanol, corroborando la presencia de la especie aniónica en este disolvente a bajas concentraciones, tal y como se ha discutido.

Tabla 3.6. Transiciones TD-DFT más intensas calculadas teóricamente y máximos de absorción detectados en soluciones acuosas a distintos valores de pH.

Especies	E (eV) ^{a)}	E (eV) ^{b)}	λ_{teor}^{excit} (nm) ^{a)}	λ_{teor}^{excit} (nm) ^{b)}	λ_{exp}^{max} (nm)		
					pH=0.6	pH Isoelec.	pH=10.0
Isoxicam							
Enol-cc	3.88	3.75	320	331	320	320	
Enol-ca	3.88	3.75	319	331			
Anión	3.44	3.31	361	375			348
Zwitterion	--		--				
Catión	--		--				
Piroxicam							
Enol-cc	3.74	3.59	332	345			
Enol-ca	3.72	3.56	333	348			
Anión	3.37	3.24	368	383			356
Zwitterion	3.34	3.15	371	393		361	
Catión	3.71	3.57	334	348	336		
Meloxicam							
Enol-cc	3.39	3.22	365	385			
Enol-ca	3.32	3.14	373	395			
Anión	3.33	3.19	373	389			362
Zwitterion	3.46	3.25	358	381		360	
Catión	3.63	3.49	341	355	339		
Tenoxicam							
Enol-cc	3.54	3.40	350	365			
Enol-ca	3.55	3.38	350	366			
Anión	3.25	3.11	382	399			368
Zwitterion	3.28	3.11	379	399		376	
Catión	3.50	3.34	355	371	354		
Lornoxicam							
Enol-cc	3.43	3.30	361	376			
Enol-ca	3.45	3.30	359	376			
Anión	3.16	3.02	392	411			374
Zwitterion	3.23	3.07	384	403		381	
Catión	3.38	3.25	367	381	363		

^{a)} PCM-PBE0/6-311++G(d,p)//PCM-PBE0/ 6-31G+(d,p)

^{b)} PCM-B3LYP/6-311++G(d,p)//PCM-B3LYP/ 6-31G+(d,p)

3.2.5 Comportamiento de absorción UV-Visible y micro-especies de los oxicams en formamida.

Los resultados obtenidos en la solución de formamida indican que la posición de los máximos de absorción correspondientes a los espectros registrados experimentalmente, son independientes de la concentración del fármaco. La formamida es un disolvente con un valor muy alto de constante dieléctrica ($\epsilon = 109.6$) y favorece la formación de especies iónicas en solución. Por lo cual, es de esperar que el anión sea la especie más abundante en este disolvente. Comparando la longitud de onda calculada teóricamente para la transición más intensa (de la especie aniónica de todos los oxicams), con la determinación experimental, se observa un buen acuerdo, con una diferencia máxima de 12 nm (Tabla 3.7).

Soluciones acidificadas y alcalinizadas de formamida. Cuando la solución de formamida es acidificada, se observa un efecto hipsocrómico para isoxicam, meloxicam y lornoxicam (Tabla 3.7). Esta tendencia es reproducida correctamente por las energías de transición calculadas teóricamente, asumiendo que en la solución acidificada la especie más abundante es el zwitterion. Siguiendo esta suposición, las energías de excitación teóricas calculadas predicen un efecto batocrómico para piroxicam y tenoxicam, lo cual es confirmado por los datos extraídos experimentalmente. Si se considerase a la especie enol para evaluar estos efectos (hipsocrómico o batocrómico), los resultados teóricos predecirían desplazamientos más grandes que los observados experimentalmente. Adicionalmente, dado el alto valor de la constante dieléctrica de la formamida, es de esperarse que la especie neutra abundante sea la zwitterion y no la enol, lo cual es confirmado por la distribución de Maxwell-Boltzman calculada para estos fármacos en formamida, la cual sugiere que el tautómero zwitterion ocupa prácticamente el 100% de la población (Tabla 3.3).

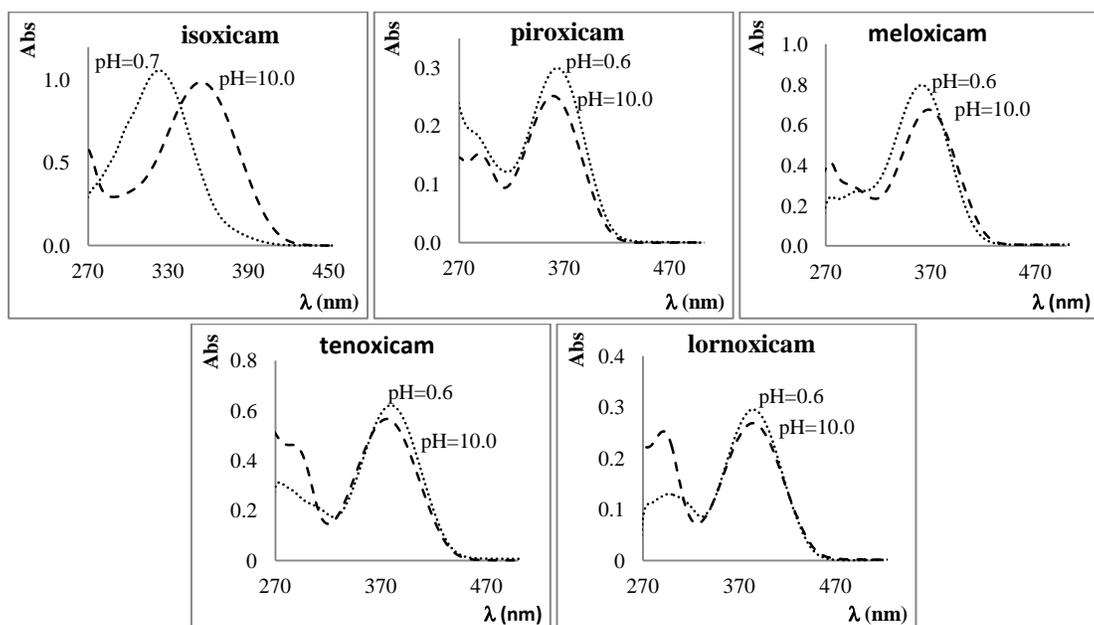


Figura 3.8. Espectros de absorción UV-Visible registrados en las soluciones de formamida consideradas, para los cinco oxicams estudiados.

Las propiedades espectrofotométricas de los 5 oxicams estudiados, obtenidas en formamida alcalina, son prácticamente las mismas que en formamida pura; debido a la adición de una solución acuosa muy concentrada de álcali, se espera que el anión sea la especie predominante en formamida alcalina. La dependencia del espectro de absorción con el pH de las soluciones de formamida de los cinco oxicams estudiados, se muestra en la Figura 3.8 (es importante mencionar que existe cierta incertidumbre en los valores de pH en formamida, debido al desplazamiento de la escala de pH en este medio respecto al acuoso).

Tabla 3.7. Transiciones TD-DFT más intensas calculadas teóricamente y máximos de absorción detectados en las soluciones de formamida estudiadas.

Especies	E (eV) ^{a)}	E (eV) ^{b)}	λ_{teor}^{max} (nm) ^{a)}	λ_{teor}^{max} (nm) ^{b)}	λ_{exp}^{max} (nm)	
					pH=0.6	pH=10.0
Isoxicam						
Anión	3.43	3.30	361	375		363
Zwitterion	----		----			
Enol-cc	3.87	3.74	321	332	323	
Piroxicam						
Anión	3.36	3.23	369	383		359
Zwitterion	3.33	3.15	371	394	364	
Enol-cc	3.72	3.58	333	346		
Meloxicam						
Anión	3.32	3.18	374	386		368
Zwitterion	3.39	3.24	366	383	361	
Enol-cc	3.38	3.21	366	387		
Tenoxicam						
Anión	3.24	3.10	383	400		376
Zwitterion	3.26	3.10	380	400	380	
Enol-cc	3.52	3.38	352	367		
Lornoxicam						
Anión	3.16	3.01	392	412		384
Zwitterion	3.22	3.06	385	405	383	
Enol-cc	3.42	3.28	362	378		

^{a)} PCM-PBE0/6-311++G(d,p)//PCM-PBE0/ 6-31G+(d,p)

^{b)} PCM-B3LYP/6-311++G(d,p)//PCM-B3LYP/ 6-31G+(d,p)

3.2.6 Especies absorbentes de los cinco oxicams.

Analizando el conjunto completo de resultados teóricos y experimentales obtenidos en este estudio, se identificaron cuatro especies para piroxicam, tenoxicam, meloxicam y lornoxicam y sólo dos para isoxicam. Estos espectros se muestran en la Figura 3.9. Manipulando las condiciones del medio, las especies responsables de cada espectro de absorción fueron aisladas experimentalmente. Mediante nuestro protocolo teórico, obtuvimos las energías de excitación para las estructuras de mínima energía en solución de cada una de estas especies, obteniendo en general, transiciones comparables con las mediciones experimentales en cada uno de los medios estudiados. Con estos resultados,

pudimos asociar cada espectro experimental con una conformación de mínima energía de cada micro-especie de los 5 oxicams estudiados (Figura 3.10), obtenida mediante el protocolo teórico planteado. La importancia de estas conformaciones radica en que están directamente asociadas a una propiedad detectada experimentalmente, por lo que su uso resulta conveniente para llevar a cabo la determinación de las micro-constantes de acidez de los fármacos mediante métodos teóricos, objetivo primordial en la presente tesis y es el tema de estudio en los siguientes dos capítulos.

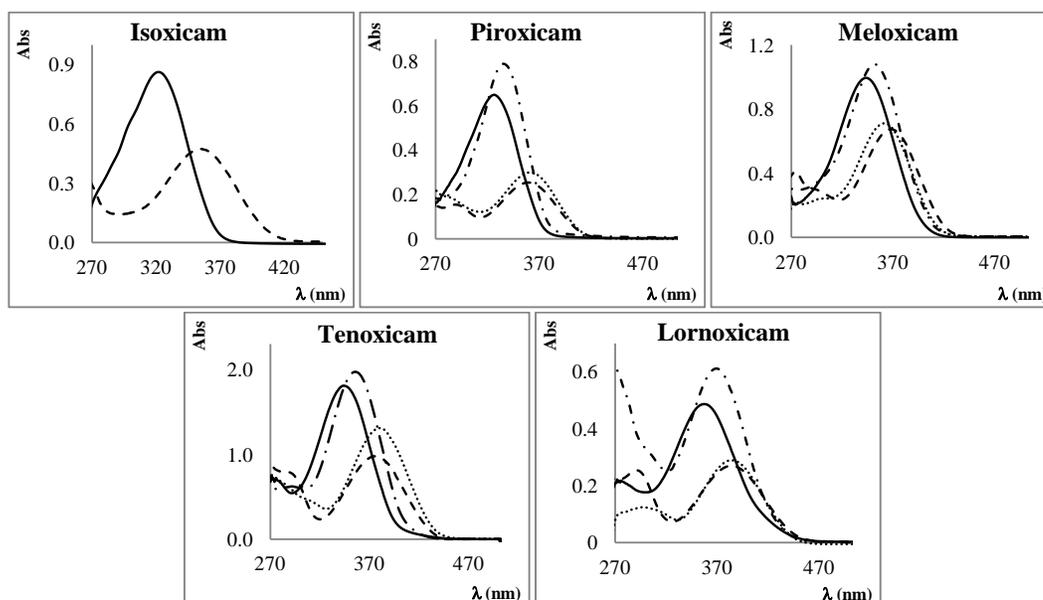


Figura 3.9. Espectros de absorción individuales de las especies enol (línea), zwitterion (puntos), anión (guiones) y catión (guiones y puntos) de los 5 oxicams estudiados, detectados en solución acuosa a diferentes valores de pH ; sólo el espectro de la especie enol corresponde al observado en la solución de 1,4-dioxano.

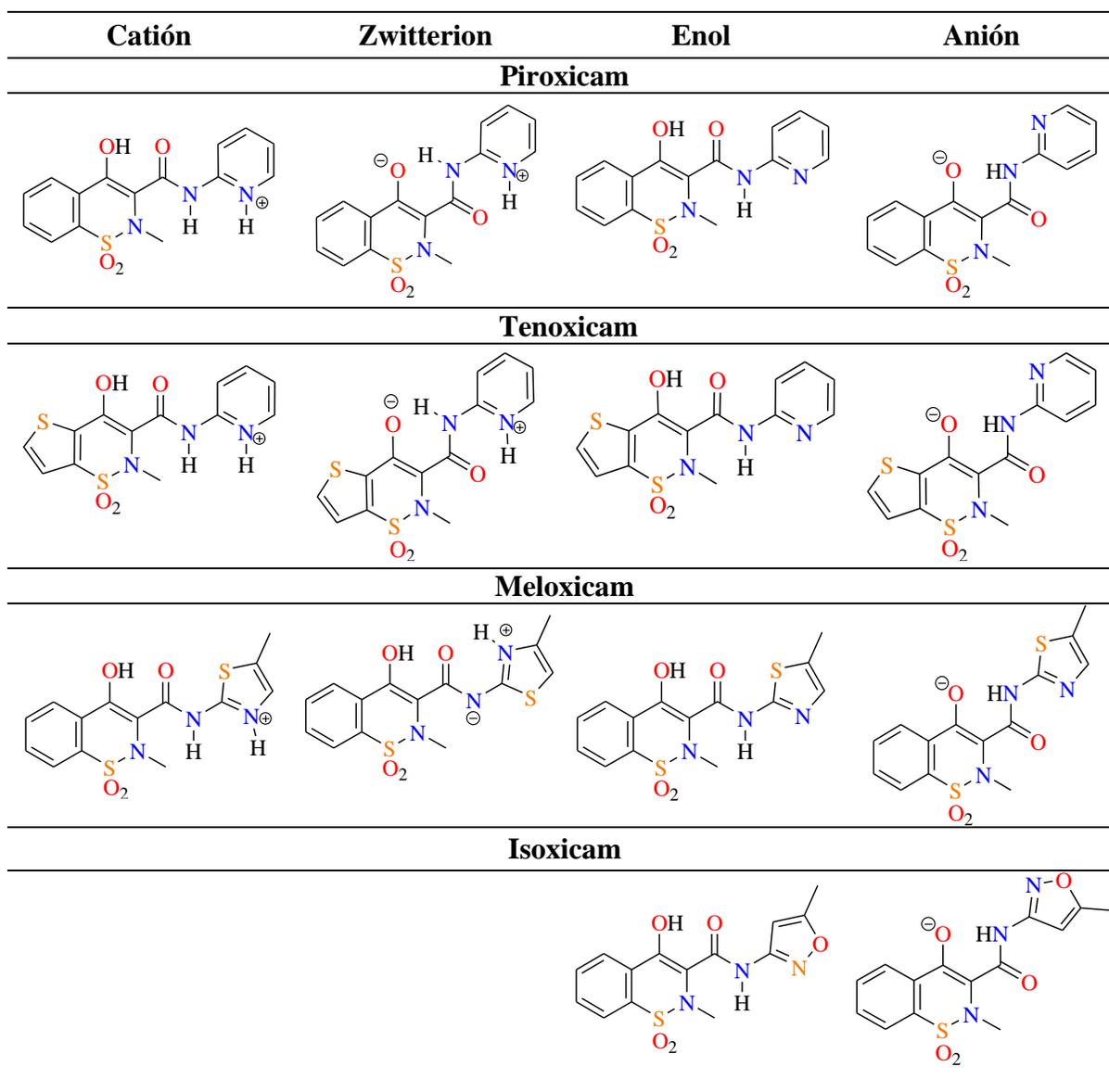


Figura 3.10. Conformaciones de mínima energía de cada una de las micro-especies de los oxicams, asociadas a los espectros de absorción observados en los diferentes medios estudiados; todas las conformaciones mostradas poseen una estructura plana (las conformaciones de mínima energía de lornoxicam son idénticas que las de tenoxicam, sustituyendo al anillo tieno por el clorotieno presente en lornoxicam).

CAPITULO 4

“Cálculo de las micro-constantes de acidez de los oxicams a primeros principios”

Una vez que hemos identificado el número de especies involucradas en los micro-equilibrios químicos en solución de cada oxicam, en esta sección del proyecto procedimos a calcular la magnitud de las constantes asociadas a dichos equilibrios, particularmente las micro-constantes de acidez.

La determinación experimental de las micro-constantes de acidez es por lo general una tarea muy difícil, ya que las constantes cinéticas de interconversión entre los tautómeros presentes (involucrados en las reacciones de protonación y desprotonación de la molécula) son muy grandes, lo que impide detectar las propiedades individuales de las micro-especies. En este contexto, la química teórica representa una alternativa muy conveniente para obtener dichas constantes, ya que con esta herramienta es posible determinar los sitios de protonación, así como el número y la magnitud de las constantes de acidez en solución que presentan los compuestos. Sin embargo, la determinación de la energía libre de una molécula en solución mediante métodos teóricos es en general complicada, ya que el espacio configuracional de la molécula en el medio es muy grande, pudiéndose presentar interacciones específicas relevantes soluto-disolvente. No obstante, en las últimas dos décadas se han diseñado diferentes aproximaciones y metodologías para obtener valores confiables de la energía libre de la reacción en solución, con los cuales pueden obtenerse valores de pK_a dentro de un rango de error de 2 unidades de pK_a . Un ejemplo de estas metodologías la representan los ciclos termodinámicos [73]. En estos ciclos, la energía libre en solución de la reacción se obtiene como contribución de la energía libre de reacción en fase gas, calculada a altos niveles de teoría y de la energía libre de solvatación de las especies participantes en la reacción, esta generalmente obtenida a partir de métodos de medio continuo. Si la cancelación de errores es apropiada, los valores de pK_a predichos con este tipo de metodologías pueden ser muy cercanos a los experimentales

4.1 Ciclos termodinámicos para el cálculo de los pK_a 's de los oxicams

Para calcular los valores de pK_a de los cinco oxicams estudiados, hicimos uso de los ciclos termodinámicos directo y de intercambio protónico (figura 4.1-a y 4.1-b) [73]. Para el ciclo

termodinámico directo, la energía libre de reacción en solución y el pK_a están dados por las siguientes expresiones:

$$\Delta G_{soln}^* = \Delta G_{gas}^* + \Delta G_{solv}^*(H^+) + \Delta G_{solv}^*(A^-) - \Delta G_{solv}^*(HA)$$

$$pK_a(HA) = \frac{\Delta G_{soln}^*}{RT \ln(10)} \quad (4.1)$$

Donde ΔG_{soln}^* es la energía libre de reacción en solución a condiciones estándar 1 molar y 298.15 K, ΔG_{gas}^* es la energía libre de reacción en fase gas a condiciones estándar de presión de 1 atmosfera y 298.15 K; y las ΔG_{solv}^* corresponde a las energías libres de solvatación del ácido (HA), la base (A^-) y el protón (H^+). Además del error inherente al método de cálculo, el ciclo directo presenta dos fuentes importantes de error; la primera corresponde a la energía libre de solvatación del protón, para la cual se han reportado valores experimentales en un rango bastante amplio, de aproximadamente 20kJ/mol (de -1086.47 kJ/mol a -1105.32 kJ/mol) [74,75,76,77,78]. Por otra parte, los métodos de medio continuo permiten obtener valores relativamente precisos para las energías libres de solvatación de las especies neutras, no obstante pueden obtenerse errores de unos 16 kJ/mol o incluso mayores para las especies iónicas, lo que constituye la segunda fuente de error del ciclo termodinámico directo.

Con el fin de reducir las mencionadas fuentes de error, en el ciclo termodinámico de intercambio protónico se introduce el equilibrio de disociación en solución de un compuesto de referencia (H_{ref}) con estructura muy similar al compuesto problema; de esta forma ya no es necesario considerar a la energía libre en solución del protón, además, aunque el número de especies iónicas se conserva, estas pertenecen a especies con misma carga (negativa) y estructura muy similar (si el compuesto de referencia es seleccionado adecuadamente), lo que puede traducirse en una cancelación sustancial de errores en el cálculo de la energía libre de la reacción en solución. Sin embargo, el desempeño de esta aproximación depende en gran medida en la elección del ácido de referencia (lo que además, le da un carácter empírico adicional a este modelo), así como de la precisión de su pK_a experimental. La aplicación del ciclo termodinámico de intercambio protónico es muy

conveniente para el cálculo de los valores de pK_a de familias de compuestos como los oxicams, ya que estos poseen estructuras químicas muy similares, lo que permite seleccionar a alguno de los miembros de la familia como ácido de referencia para obtener los valores de pK_a de los otros oxicams. Para el ciclo termodinámico de intercambio protónico, la energía libre de reacción en solución y el pK_a están dados por:

$$\Delta G_{\text{soln}}^* = \Delta G_{\text{gas}}^* + \Delta G_{\text{solv}}^*(\text{HRef}) + \Delta G_{\text{solv}}^*(\text{A}^-) - \Delta G_{\text{solv}}^*(\text{HA}) - \Delta G_{\text{solv}}^*(\text{Ref}^-)$$

$$pK_a(\text{HA}) = \frac{\Delta G_{\text{soln}}^*}{RT \ln(10)} + pK_a(\text{HRef}) \quad (4.2)$$

Además de los términos contemplados en la expresión de la energía libre de la reacción en solución del ciclo directo, la ecuación 4.2 contiene las energías libres de solvatación del ácido (HRef) y la base conjugada (Ref⁻) del compuesto de referencia, pero no la energía libre del protón.

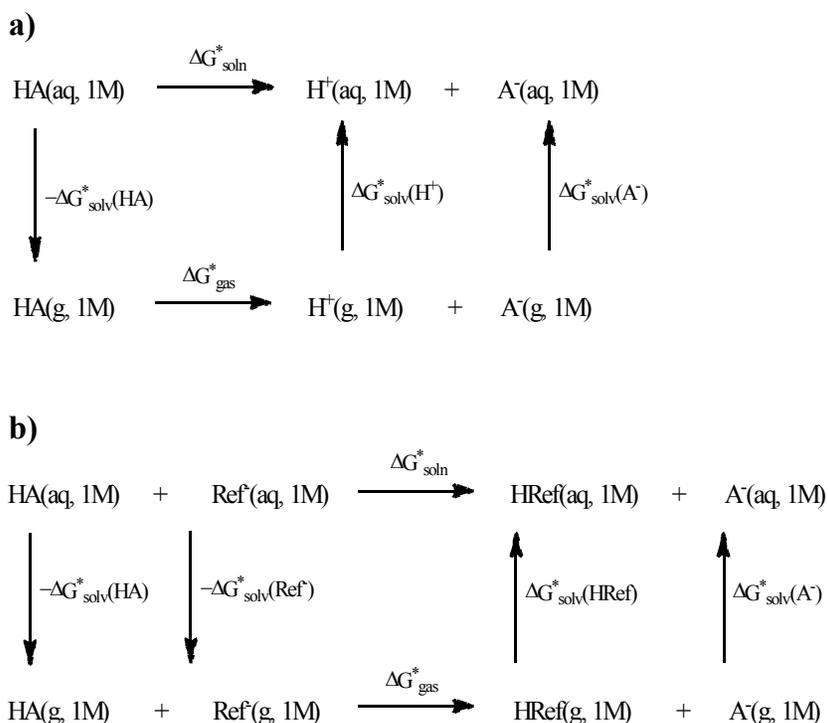


Figura 4.1. Ciclos termodinámicos utilizados para el cálculo de las constantes de acidez de los cinco oxicams estudiados. a) ciclo directo b) ciclo de intercambio protónico.

4.2 Metodologías

4.2.1 Métodos teóricos.

Ambos ciclos termodinámicos (directo e intercambio protónico) dependen de la calidad tanto del cálculo de la energía libre de la reacción de disociación en fase gas, como de la energía libre de solvatación de las especies químicas participantes en la reacción. Por tanto, con la finalidad de disponer de un método adecuado para el cálculo de la energía libre en fase gas, realizamos un cálculo de partida en donde determinamos los cuatro pasos de desprotonación de un modelo estructural simple de los oxicams (figura 4.2). Este cálculo lo realizamos utilizando el método compuesto G3MP2(+)-cc [79], el cual se ha utilizado para el cálculo de pK_a 's de varios tipos de moléculas orgánicas [1]. Este método compuesto utiliza geometrías MP2 [80,81,82] con la base 6-31+G(d), incluyendo a todos los electrones en la perturbación, a las que se les realiza un cálculo de energía electrónica al nivel CCSD(T). A esta energía se le adicionan los siguientes términos: a) de corrección de la base $\Delta E[MP2_{fc}]$ en el cual se toma la diferencia entre la energía calculada al nivel $MP2_{fc}/631+G(d)$ (la misma base que el cálculo CCSD(T) y la calculada mediante $MP2_{fc}/MP2lar$, en donde no se contemplan los electrones de *core* en la perturbación de segundo orden y la base MP2lar es una versión modificada de la base gaussiana 6-311G(3d f,2p). b) la energía vibracional de punto cero E_{ZPVE} , obtenida al nivel HF/6-31+G(d) escalada a un factor de 0.8929. c) el término de corrección de alto nivel (HLC por sus siglas en ingles) $E[HLC]$, el cual contiene parámetros que minimizan los errores medios absolutos respecto a los datos del conjunto de prueba G2/97. Por tanto, la energía G3MP2(+)-cc está dada de acuerdo a la siguientes expresiones:

$$\begin{aligned}
 E_0[G3MP2(+)-cc] &= E[CCSD(T)/6-31+G(d)] + \Delta E[MP2_{fc}] + E[HLC] + E_{ZPVE}[HF/6-31+G(d)] \\
 \Delta E[MP2] &= E[MP2/G3MP2lar] - E[MP2/6-31+G(d)] \\
 E[HLC] &= -An_\beta - B(n_\alpha - n_\beta)
 \end{aligned}
 \tag{4.3}$$

en donde n_α y n_β son los electrones de valencia con espín α y espín β respectivamente y A y B son parámetros determinados al valor de 9.279 y 4.471 mHartrees. Posteriormente estudiamos el desempeño de varios funcionales de la densidad, tal y como: B3LYP, BMK [83], MPWB95 [84], M05-2X [85], B97 [86,87], así como el método MP2, respecto al

método compuesto mencionado, en el cálculo de la energía en fase gas de los cuatro pasos de desprotonación del modelo de oxicam mostrado en la figura 4.2. En estos cálculos, se optimizaron las geometrías y se obtuvieron las correcciones térmicas al nivel B3LYP/6-31+G(d) de cada una de las especies involucradas en los cuatro pasos de desprotonación de este modelo de oxicam; a las geometrías resultantes se les realizó un cálculo de energía de punto simple con cada uno de los funcionales de prueba y la base 6-311+G(3df,2p). Con estos resultados calculamos las cuatro energías de desprotonación del modelo de oxicam y las comparamos con los resultados obtenidos con el método G3MP2(+)-cc.

Finalmente, para calcular los valores de pK_a relacionados a los procesos de desprotonación de los 5 oxicams estudiados, realizamos una optimización de las geometrías de cada una de sus especies químicas (figura 1.2) al nivel B3LYP/6-31+G(d); a este mismo nivel se obtuvo la corrección térmica a la energía libre en fase gas. Posteriormente obtuvimos la energía electrónica de cada especie utilizando el funcional de mejor desempeño (respecto al método G3MP2(+)-cc) y la base 6-311+G(3df,2p); enseguida, sumamos la corrección térmica calculada, para obtener la energía libre en fase gas de cada micro-especie. La energía libre en solución la calculamos como la suma de la energía libre en fase gas, con la energía libre de solvatación obtenida mediante los diferentes modelos de continuo polarizable; PCM, CPCM-UAKS [88], SMD [89] así como el modelo COSMO-RS [90] (los cálculos con el modelo COSMO-RS se realizaron con el programa computacional ADF); estos cálculos se realizaron al nivel B3LYP/6-31+G(d). Por tanto, la energía libre en solución se obtuvo mediante $G_{\text{soln}}^* = G_{\text{gas}}^* + \Delta G_{\text{solv}}^*$.

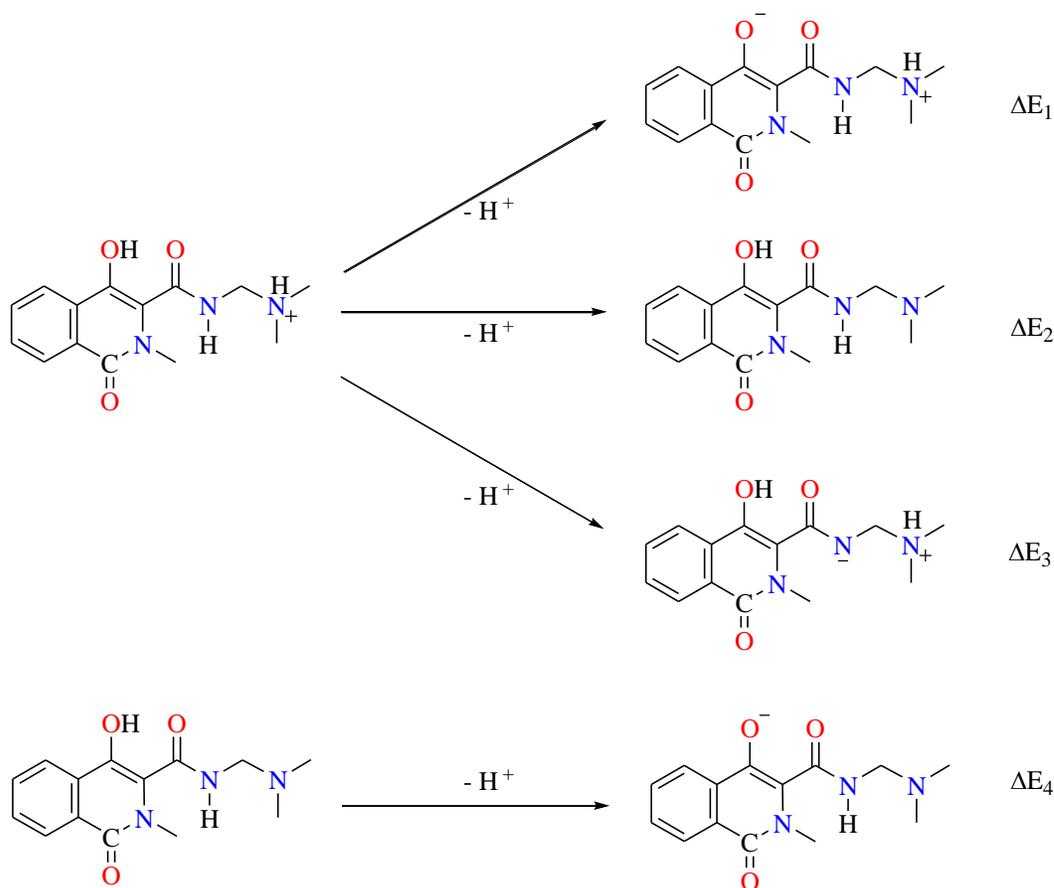


Figura 4.2. Reacciones de desprotonación consideradas para el modelo de oxycam estudiado.

4.3 Resultados.

4.3.1 Evaluación de los funcionales de prueba

Como se muestra en la Tabla 4.1, en general todos los funcionales DFT probados, presentan un buen desempeño respecto al método compuesto prueba (G3MP2(+)-cc), con una desviación media absoluta de aproximadamente 5 kJ/mol. Para todos los funcionales considerados, los errores más grandes se observan respecto al cálculo de ΔE_3 , con la excepción de M05-2X, el cual presenta errores por debajo de 4 kJ/mol. Así mismo, considerando el total de energías calculadas, el funcional M05-2X presentó el menor valor de la desviación media absoluta de forma global (1.9 kJ/mol). Por tanto, consideramos que este funcional era el adecuado para realizar el cálculo de las energías de reacción en fase

gas, que conjuntamente con la base $6-311+G(3df,2p)$ y las correcciones térmicas obtenidas al nivel $B3LYP/6-31+G(d)$, nos permitieron obtener las energías libres de reacción correspondientes.

Tabla 4.1. Energías de desprotonación (kJ/mol) calculadas con varios funcionales DFT en conjunción con el conjunto base $6-311+G(3df,2p)$; Desviaciones Medias Absolutas (MAD, en kJ/mol). Los errores respecto a los cálculos obtenidos al nivel G3MP2(+)-cc se muestran entre paréntesis.

	ΔE_1	ΔE_2	ΔE_3	ΔE_4	DMA
B971	1063.7 (3.1)	1003.1 (7.6)	1071.2 (14.8)	1398.0 (3.3)	7.2
B3LYP	1059.5 (-1.1)	996.9 (1.5)	1066.7 (10.3)	1395.9 (1.1)	3.5
BMK	1062.3 (1.7)	996.1 (0.6)	1071.3 (14.9)	1394.7 (0.1)	4.3
MPWB95	1062.7 (2.1)	996.3 (0.9)	1068.0 (11.6)	1399.9 (5.1)	4.9
M05-2X	1058.4 (-2.2)	993.6 (1.9)	1059.4 (3.0)	1395.2 (0.4)	1.9
MP2	1047.0 (-13.6)	989.2 (6.3)	1044.3 (12.1)	1382.2 (12.6)	11.2
G3MP2(+)-cc	1060.6	995.48	1056.4	1394.79	

4.3.2 Acidez de los oxicams en fase gas.

Los pasos de desprotonación (figura 4.2) estudiados para el modelo simplificado de oxicams, están convenientemente asociados a la formación de las especies prototrópicas de los oxicams mostradas en la figura 1.2. Antes de realizar el estudio de la acidez en solución acuosa de los oxicams, estudiamos la relación entre la estructura química de los oxicams con su acidez intrínseca (en ausencia de disolvente). En la Tabla 4.2 se muestran las energías de desprotonación en fase gaseosa de los cinco oxicams estudiados, de acuerdo con el esquema de reacción mostrado en la figura 4.2. En general, hay poca variación en la acidez entre los cinco oxicams. Lo anterior indica que la modificación estructural por ejemplo mediante la sustitución del anillo benceno de piroxicam por un anillo tieno (dando tenoxicam) tiene un efecto relativamente pequeño sobre la acidez intrínseca de estos fármacos. Sin embargo, hay algunas excepciones notables, como las energías ΔG_1 y ΔG_4 de lornoxicam en donde la sustitución del anillo de benceno de piroxicam con un anillo clorotieno electroattractor, aumenta la acidez del protón enólico del O15 en aproximadamente 20 kJ/mol. De manera similar, la sustitución del anillo piridin-2-il de piroxicam con un anillo de 5-metilisoxazol-3-il (produciendo isoxicam) reduce

drásticamente la basicidad del átomo de N2' produciendo un ΔG_2 inferior en unos 30 kJ/mol. Esto es presumiblemente debido al efecto electroatractor del oxígeno adyacente (O5' figura 1.1) y es consistente con los datos experimentales que sugieren que la forma protonada del isoxicam no predomina en solución acuosa [33,34].

Tabla 4.2. Energías de desprotonación en fase gaseosa (kJ mol^{-1}) at 298 K asociadas con los cuatro pasos de desprotonación de los cinco oxicams estudiados (entre paréntesis, los valores relativos a piroxicam).

	ΔG_1	ΔG_2	ΔG_3	ΔG_4
Isoxicam	979.1 (0.3)	898.9 (-30.6)	959.7 (-6.7)	1308.5 (-8.1)
Piroxicam	978.8 (0.0)	929.5 (0.0)	966.4 (0.0)	1316.6 (0.0)
Meloxicam	973.9 (-4.9)	923.2 (-6.3)	948.6 (-17.8)	1302.0 (-14.6)
Tenoxicam	971.4 (-7.4)	927.0 (-2.5)	962.1 (-4.3)	1307.2 (-9.4)
Lornoxicam	963.5 (-15.3)	922.3 (-7.2)	955.4 (-11.0)	1295.0 (-21.6)

4.3.3 Acidez de los oxicams en solución acuosa.

Las constantes de acidez microscópicas, calculadas mediante el ciclo directo (ecuación 4.1), así como los valores de las constantes macroscópicas de acidez (calculadas usando las ecuaciones 1.3, 1.4 y 1.5) de los cinco oxicams estudiados, se resumen en la Tabla 4.3. En general, las micro-constantes calculadas con el modelo CPCM-UAKS reproducen razonablemente bien a las experimentales, especialmente los valores de pK_aI , para los cuales se observan errores menores a la unidad. Por otro lado, el desempeño de los modelos SMD y COSMO-RS es menos satisfactorio, en donde las desviaciones en los valores calculados es de ~ 2 a 4 unidades.

Tabla 4.3. Constantes microscópicas calculadas con el ciclo directo y los pK_a 's macroscópicos asociados, a 298 K. (Los errores respecto a los datos experimentales se muestran entre paréntesis).

	Modelo de Disolvente	Isoxicam	Piroxicam	Meloxicam	Tenoxicam	Lornoxicam
pK_{a11}	CPCM	1.77	1.27(-0.65)	1.06	0.81(-0.28)	0.22(0.63)
	COSMO-RS	-1.57	-1.85(-3.77)	-2.36	-2.48(-3.57)	-2.90(3.75)
	SMD	0.36	0.33(-1.59)	-0.85	-0.81(-1.90)	-1.46(2.31)
	Exp.		1.92 ^a		1.09 ^b	0.85 ^c
pK_{a12}	CPCM	-2.83	1.37(-1.35)	-0.15	1.57(-1.14)	1.42(2.07)
	COSMO-RS	-3.84	1.01(-1.71)	-1.58	1.06(-1.65)	0.79(2.7)
	SMD	-4.12	2.82(0.10)	-1.97	2.68(-0.03)	2.56(0.93)
	Exp.		2.72 ^a		2.71 ^b	3.49 ^c
pK_{a21}	CPCM	2.28	6.31(0.91)	3.90	6.01(0.69)	6.01(-0.42)
	COSMO-RS	-1.97	3.59(-1.81)	0.87	3.25(-2.07)	3.41(2.18)
	SMD	0.69	8.30(2.90)	3.71	8.01(2.69)	7.90(-2.31)
	Exp.		5.40 ^a		5.32 ^b	5.59 ^c
pK_{a22}	CPCM	6.87	6.21(1.61)	5.11	5.25(1.55)	4.81(-1.86)
	COSMO-RS	0.31	0.73(-3.87)	0.10	-0.29(-3.99)	-0.28(3.23)
	SMD	5.17	5.80(1.20)	4.83	4.52(0.82)	3.88(-1.93)
	Exp.		4.60 ^a		3.70 ^b	2.95 ^c
$\log K_z$	CPCM	-4.59	0.10(-0.70)	-1.22	0.77(-0.85)	1.20(1.44)
	COSMO-RS	-2.28	2.86(2.06)	0.77	3.54(1.89)	3.69(-1.05)
	SMD	-4.48	2.50(1.70)	-1.12	3.49(1.87)	4.02(-1.38)
	Exp.		0.80 ^a		1.62 ^b	2.64 ^c
pK_{a1}	CPCM	-2.83	1.02(-0.84)	-0.24(-1.33)	0.74(-0.33)	0.19(-0.66)
	COSMO-RS	-3.84	-1.85(-3.71)	-2.51(-3.60)	-2.48(-3.55)	-2.90(-3.75)
	SMD	-4.12	0.32(-1.54)	-2.03(-3.12)	-0.81(-1.88)	-1.46(-2.31)
	Exp.		1.86 ^c	1.09 ^d	1.07 ^c	0.85 ^c
pK_{a2}	CPCM	6.87(2.94)	6.56(1.10)	5.20(1.02)	6.08(0.74)	6.04(0.45)
	COSMO-RS	0.31(-3.6)	3.59(-1.87)	1.02(-3.16)	3.25(-2.09)	3.41(-2.18)
	SMD	5.17(1.24)	8.30(2.84)	4.89(0.71)	8.01(2.67)	7.90(2.31)
	Exp.	3.93 ^a	5.46 ^c	1.06 ^d	5.34 ^c	5.59 ^c

^a Referencia [24]. ^b Referencia [36]. ^c Referencia [33]. ^d Referencia [35].

En la Tabla 4.4 se muestran las constantes microscópicas de acidez de los cinco oxicams estudiados, calculadas mediante el ciclo de intercambio protónico (usando a piroxicam como compuesto de referencia), así como las correspondientes constantes de tautomerización calculadas a partir de estas constantes microscópicas. Puede observarse que el esquema de intercambio protónico ofrece una gran mejora en los tres modelos de disolvente, respecto al ciclo directo; particularmente, puede observarse una mejora sustancial en el cálculo de las micro-constantes del tenoxicam, utilizando los modelos

CPCM y COSMO RS, con los cuales se obtienen los menores Errores Medios Absolutos (0.34 y 0.38 respectivamente). En contraparte, los valores predichos para las micro-constantes de meloxicam presentan las desviaciones más grandes respecto a los valores experimentales, donde CPCM y COSMO-RS incurren en errores de ~ 2 unidades de pK_a (Tabla 4.2). Presumiblemente, esta disparidad se debe a que la diferencia estructural entre meloxicam y piroxicam (sustitución del anillo de piridinilo para un anillo de 5-metilisoxazol-3-il) altera el patrón de solvatación y como consecuencia, el uso de piroxicam como referencia origina que algunos errores no se cancelen adecuadamente. Adicionalmente, la estructura de la especie zwitterion del meloxicam es diferente a la del resto de los oxicams, incluyendo a la del piroxicam (Figura 3.5), el cual fue nuestro compuesto referencia, por lo que no es posible garantizar que el esquema de intercambio protónico (con cualquiera de los modelos de disolvente) ofrezca alguna mejora en la precisión del cálculo del pK_a para este oxicam.

Para isoxicam, los dos esquemas (directo e intercambio protónico) con los tres modelos de disolvente predicen que la constante de tautomerización es de aproximadamente -4 (cf piroxicam: 2,7), debido a que la basicidad del nitrógeno en el anillo de 5-metilisoxazol-3-ilo es más débil que la del anillo piridil o incluso del tiazolil (Tabla 4.2). Este resultado es de resaltar, ya que está en total acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro estudio de absorción UV-Visible, en donde no fue posible detectar a las especies zwitterion ni catión del isoxicam. Nótese que los cálculos realizados con todos los modelos disolventes predicen que la especie neutra del isoxicam es la forma predominante en solución (de acuerdo al valor calculado para la constante de tautomerización, Tablas 4.3 y 4.4). Así mismo, es de notarse que a diferencia de isoxicam, la constante de tautomerización calculada para meloxicam con el modelo COSMO-RS es mayor a la unidad, debido a que el nitrógeno tiazolil es más ácido (comparable al de lornoxicam, Tabla 4.2). Este resultado es también consistente con los resultados observados en el estudio UV-Visible para este fármaco, en donde se detectaron, además del anión y la forma enol, las especie zwitterion y catión. Este resultado es de gran relevancia, ya que la reactividad prototrópica en solución del meloxicam es hasta ahora, un tema de controversia sin resolver (ver sección 1.4).

Tabla 4.4. Constantes microscópicas calculadas con el ciclo de intercambio protónico y los pK_a 's macroscópicos asociados, a 298 K. (Los errores respecto a los datos experimentales se muestran entre paréntesis).

	Modelo de disolvente	Isoxicam	Meloxicam	Tenoxicam	Lornoxicam
pK_{a11}	CPCM	2.42	1.71	1.46 (0.37)	0.87(-0.02)
	COSMO-RS	2.20	1.41	1.29 (0.20)	0.87(-0.02)
	SMD	1.96	0.74	0.78 (-0.31)	0.14(0.71)
	Exp.			1.09 ^b	0.85 ^c
pK_{a12}	CPCM	-1.48	1.19	2.92 (0.21)	2.76(0.73)
	COSMO-RS	-2.13	0.12	2.76 (0.05)	2.49(1)
	SMD	-4.22	-2.08	2.57 (-0.14)	2.46(1.03)
	Exp.			2.71 ^b	3.49 ^c
pK_{a21}	CPCM	1.37	2.98	5.10 (-0.22)	5.10(0.49)
	COSMO-RS	-0.16	2.68	5.06 (-0.26)	5.22(0.37)
	SMD	-2.21	0.81	5.11 (-0.21)	5.00(0.59)
	Exp.			5.32 ^b	5.59 ^c
pK_{a22}	CPCM	5.26	3.50	3.64 (-0.06)	3.20(-0.25)
	COSMO-RS	4.18	3.97	3.59 (-0.11)	3.60(-0.65)
	SMD	3.97	3.63	3.32 (-0.38)	2.68(0.27)
	Exp.			3.70 ^b	2.95 ^c
$\log K_z$	CPCM	-3.90	-0.52	1.46 (-0.16)	1.89 (0.75)
	COSMO-RS	-4.34	0.29	1.48 (-0.14)	1.62 (1.02)
	SMD	-6.17	-2.82	1.79 (0.17)	2.32 (0.32)
	Exp.			1.62 ^b	2.64 ^c
pK_{a1}	CPCM	-1.48	1.08 (-0.01)	1.44 (-0.37)	0.87 (0.02)
	COSMO-RS	-2.13	0.10 (-0.99)	1.27 (0.20)	0.86 (0.01)
	SMD	-4.22	-2.08 (-3.17)	0.78 (-0.29)	0.13 (-0.72)
	Exp.		1.09 ^d	1.07 ^c	0.85 ^c
pK_{a2}	CPCM	5.26 (1.33)	3.62 (-0.56)	5.12 (-0.22)	5.10 (-0.49)
	COSMO-RS	4.18 (0.25)	3.99 (-0.19)	5.08 (-0.26)	5.23 (-0.36)
	SMD	3.97 (0.04)	3.63 (-0.55)	5.12 (-0.22)	5.00 (-0.59)
	Exp.	3.93 ^a	4.18 ^d	5.34 ^c	5.59 ^c

^a Referencia [24]. ^b Referencia [36]. ^c Referencia [33]. ^d Referencia [35].

4.3.4 Cálculo de las constantes de acidez de nuevos derivados de los oxicams.

Una ventaja que ofrece el ciclo de intercambio protónico, es que, una vez que se ha definido adecuadamente al compuesto de referencia, es posible calcular los valores de pK_a de otros compuestos de estructura similar (al de referencia), de los cuales no se tienen los valores experimentales de sus constantes de acidez. Esta ventaja es de gran utilidad en el diseño de fármacos, en donde continuamente se proponen nuevos derivados y no siempre se

encuentran disponibles sus constantes de acidez experimentales. El desarrollo de nuevos derivados de los oxicams con actividades farmacológicas mejoradas es un tema de investigación en curso. Por ejemplo, propoxicam y algunos de sus derivados (figura 4.3) han sido recientemente explorados como fármacos antiosteoartríticos, observándose que la cuaternización del grupo terminal amino aparentemente aumenta su afinidad hacia el cartílago articular [91,92]. Otro derivado relevante es un híbrido de piroxicam y Rutaecarpina (figura 4.6) donde este último es un alcaloide de quinzolineocarbolina y posee un amplio espectro de propiedades farmacológicas, incluyendo actividades antihipertensivas y citotóxicas [93]. Aplicamos el esquema de intercambio protónico conjuntamente con los modelos del continuo CPCM-UAKS y COSMO-RS para calcular las micro y macro-constantes de acidez de todos los derivados mostrados en la figura 4.6, utilizando al piroxicam como compuesto de referencia. Hasta nuestro conocimiento, los valores de pK_a de estos oxicams no han sido determinados experimentalmente, por lo que los valores aquí calculados, deben compararse directamente con las futuras mediciones experimentales.

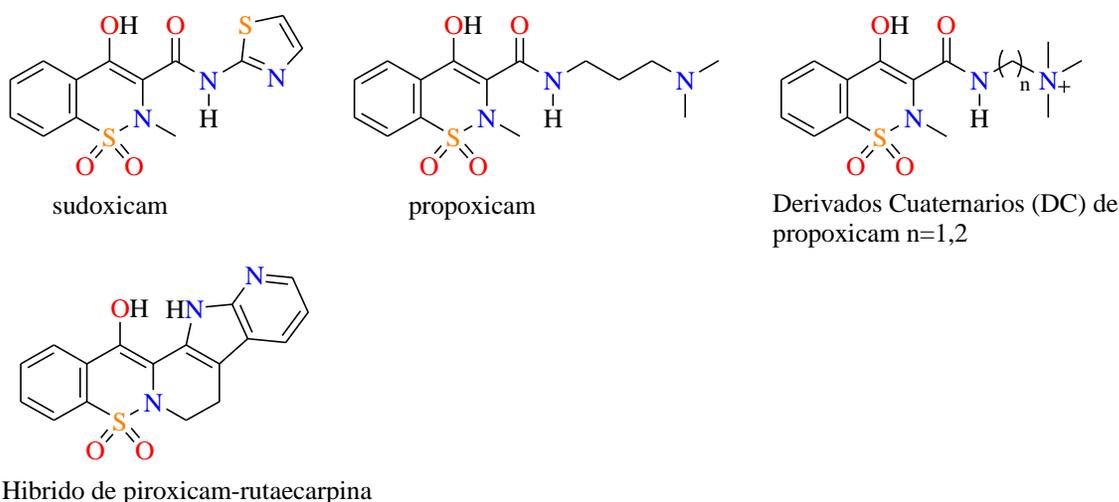


Figura 4.3. Estructura química otros derivados de los oxicams considerados en este estudio.

Las energías de desprotonación en fase gas (ver esquema de reacción en la figura 4.2) y los valores de las micro y macro constantes de acidez de los derivados de los oxicams mostrados en la figura 4.6, se reportan en la Tabla 4.5. En general, hay un acuerdo

razonablemente bueno entre los valores de pK_a predichos por los dos modelos de disolvente, donde la diferencia es generalmente dentro de 1 unidad. Curiosamente, aparte de sudoxicam, los valores predichos para los pK_a 's microscópicos de los nuevos derivados, son considerablemente más altos que los del piroxicam. Comparando las Tablas 4.2 y 4.5 se observa que las energías de desprotonación en fase gas de propoxicam (ΔG_1 , ΔG_2 y ΔG_4) y sus derivados cuaternarios, son sustancialmente mayores que el piroxicam en unos 30 kJ/mol o incluso mayores. Esta diferencia se debe en gran medida, a la mayor basicidad del nitrógeno terminal en relación con el nitrógeno de piridina (la basicidad en fase gaseosa de trimetilamina es 918 kJ/mol, mientras que el de piridina es 898 kJ/mol, debido a la deslocalización del par libre en el sistema aromático piridina [94]).

Para el derivado híbrido de piroxicam-rutaecarpina, a excepción del equilibrio relacionado a ΔG_1 , presenta una acidez en fase gas muy similar a piroxicam. La débil acidez (por unos 20 kJ/mol) relacionada ΔG_1 se debe a la restricción conformacional impuesta por la fusión del anillo de piridina, lo que ocasiona que el protón enlazado al nitrógeno de la piridina está en estrecha proximidad al protón del nitrógeno pirrolidina (véase la estructura en la Figura 5). Respecto a sudoxicam, es sorprendente observar que la sustitución de un anillo de 5-metiltiazol-2-il (correspondiente a meloxicam) con un anillo tiazol-2-il, aumenta la energía de desprotonación en fase gas, en aproximadamente 10 kJ/mol, aunque esta diferencia es comparable al efecto de un grupo metilo en la basicidad de piridina (la basicidad en fase gas de la 4-metilpiridina es diferente en 15 kJ/mol respecto a la de la piridina sin el grupo metilo [94])

En solución, los valores de pK_a predichos indican que el híbrido de piroxicam-rutaecarpina, así como los derivados del propoxicam son en general ácidos más débiles comparados a los 5 oxicams piroxicam, isoxicam, meloxicam, tenoxicam y lornoxicam; esta diferencia se debe principalmente a la acidez intrínseca (en fase gas) de todos los oxicams. Por ejemplo, los valores de pK_a de sudoxicam son comparables (por menos de una unidad de pK_a) a los de meloxicam, lo cual es consistente con las diferencias observadas en fase gas para estos dos fármacos (Tablas 4.2 y 4.5). Así mismo, los derivados de propoxicam exhiben valores de pK_a mayores que los de piroxicam en 4 o 6 unidades, lo que es consistente con los datos en fase gas. Interesantemente, el pK_a

macroscópico de estos derivados es comparable a piroxicam, a pesar de que su acidez en fase gas es menor por unos 30kJ/mol. En esta instancia, parece haber un efecto importante del disolvente, en donde el tautómero zwitterion se encuentra fuertemente solvatado de tal forma que contrarresta la débil acidez calculada en fase gas.

Tabla 4.5. Energías de desprotonación en fase gas y acidez acuosa predicha a 298 K para los derivados de los oxicams mostrados en la figura 4.6.

	Sudoxicam	Propoxicam	DC (n=1)	DC (n=2)	Hibrido
ΔG_1 (kJ mol ⁻¹)	964.7	1013.5	1033.3	1054.9	995.7
ΔG_2 (kJ mol ⁻¹)	909.5	970.9			920.7
ΔG_4 (kJ mol ⁻¹)	1298.0	1348.7			1306.0
<hr/>					
pK_a11 (CPCM)	1.10	0.98	5.10	7.44	8.46
pK_a11 (COSMO-RS)	1.16	0.84	3.81	5.83	9.28
pK_a12 (CPCM)	0.18	10.55			4.52
pK_a12 (COSMO-RS)	-0.76	9.03			4.39
pK_a21 (CPCM)	2.38	15.17			3.58
pK_a21 (COSMO-RS)	1.97	14.30			4.83
pK_a22 (CPCM)	3.29	5.60			7.52
pK_a22 (COSMO-RS)	3.89	6.11			9.72
<hr/>					
pK_a1 (CPCM)	0.13	0.98	5.10	7.44	4.52
pK_a1 (COSMORS)	-0.77	0.84	3.81	5.83	4.39
pK_a2 (CPCM)	3.34	15.17			7.52
pK_a2 (COSMORS)	3.90	14.30			9.72

^a La acidez en solución se calculó usando el esquema de intercambio protónico tomando a piroxicam como ácido de referencia.

CAPITULO 5

“Determinación de la constante de tautomerización del tenoxicam mediante un modelo RMN teórico-experimental”

El cálculo de la constante de tautomerización de los oxicams recibió una atención especial en el presente proyecto, ya que desde el punto de vista práctico su determinación permite revelar el conjunto completo de micro-equilibrios químicos (ecuaciones 1.3, 1.4 y 1.5)], una vez que se establezcan los valores de los equilibrios macroscópicos, que como se ha mencionado, su determinación es relativamente sencilla.

Sin embargo, no siempre es posible conocer la constante de tautomerización y los métodos disponibles para su determinación, están sustentados en diversas asunciones las cuales no siempre pueden ser válidas (ver sección 1.3.2).

Por tanto, en el presente proyecto de doctorado nos dispusimos a proponer una alternativa distinta para calcular la constante de tautomerización, basándonos en una propiedad molecular bastante específica para cada núcleo atómico en una molécula (siempre y cuando este posea un valor de espín adecuado); el desplazamiento químico de Resonancia Magnética Nuclear.

La RMN es una técnica versátil que se utiliza para investigar la estructura molecular y electrónica de compuestos químicos. Un proceso de intercambio químico que se aproxima al límite de velocidad en la escala de RMN, puede exhibir señales independientes de cada una de las especies participantes en el equilibrio, siempre y cuando se manipulen de forma adecuada las condiciones a las que se lleva a cabo este intercambio; por ejemplo, la polaridad del disolvente, la cual puede mejorar la diferenciación de la señal, favoreciendo el predominio de una especie sobre las demás si estas poseen momentos dipolares bastante diferenciados. Se ha utilizado la RMN para identificar a las especies tautoméricas de varios compuestos [95,96]. No obstante, para determinar el equilibrio entre estas especies es necesario realizar la determinación no ambigua de los desplazamientos químicos individuales de las especies, lo cual, en principio no es posible, si no se conoce la magnitud del equilibrio en el medio, qué es precisamente la propiedad que se desea determinar.

Los recientes avances en los métodos de química teórica permiten reproducir de forma muy precisa los desplazamientos químicos experimentales, especialmente los desplazamientos de ^{13}C y ^1H , los cuales pueden obtenerse mediante niveles de teoría altos o métodos de funcionales de la densidad [97,98,99,100]. Pueden encontrarse estudios recientes en donde

se reporta una precisión de los desplazamientos químicos ^1H , calculados a partir de la teoría de funcionales de la densidad, menores a 1 ppm, mientras que para ^{13}C de unas 3-10 ppm, dependiendo del método y el conjunto de bases [101,102,103]. Aprovechando la precisión de los cálculos de desplazamientos químicos teóricos respecto a los experimentales, algunos estudios han analizado las mezclas conformacionales y tautoméricas de varios compuestos, usando esta propiedad [104,105]. No obstante, la posibilidad de cuantificar a las poblaciones de las especies presentes en una mezcla conformacional o tautomérica empleando los desplazamientos químicos calculados teóricamente conjuntamente con los experimentales, aún no ha sido explorado (hasta nuestro conocimiento).

En el presente proyecto, nos planteamos la posibilidad de determinar las poblaciones y las constantes tautoméricas de los oxicams, utilizando tanto los desplazamientos químicos calculados mediante métodos teóricos, como los detectados experimentalmente en medios de diferente polaridad. Para este estudio seleccionamos al fármaco tenoxicam, para el cual se ha sugerido un tautómero ceto adicional a los tautómeros enol y zwitterion presentes en el resto de los oxicams (Figura 5.1).

Debido a la distribución de cargas en la estructura zwitterion de tenoxicam, ésta mostrará un momento dipolar mayor que las especies ceto y enol. En consecuencia, se espera que el zwitterion sea el tautómero más abundante en disolventes polares. A medida que la polaridad del medio disminuya, las poblaciones de los tautómeros ceto y enol deben incrementarse. No obstante, se ha reportado que la estabilidad relativa del tautómero enol es mayor a la del tautómero ceto de los oxicams [21], por tanto es de esperarse que la proporción del tautómero enol siempre sea mayor que la del ceto.

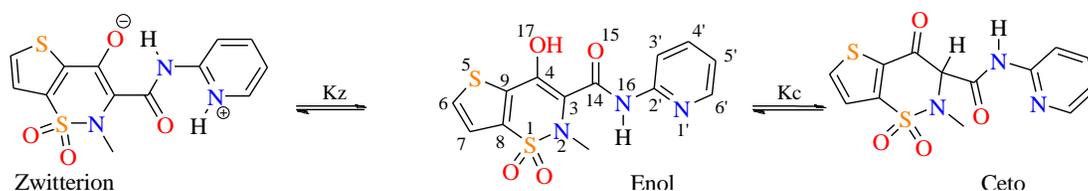


Figura 5.1. Especies tautoméricas sugeridas para tenoxicam

5.1 Determinación de las poblaciones tautoméricas del tenoxicam.

Si las especies en solución están relacionadas mediante equilibrios químicos de intercambio muy rápido, la respuesta global a una perturbación externa estará dada por el promedio de las respuestas individuales de las especies involucradas en los equilibrios, con un peso idéntico a la fracción mol de cada especie. Al punto isoeléctrico del tenoxicam (pH en donde predominan las especies neutras), las especies neutras zwitterion (Z), enol (E) y ceto (C) predominan en la solución, y se encuentran en equilibrio químico entre sí. En estas circunstancias, el desplazamiento químico detectado para el i-núcleo (δ_i) proviene de la contribución de los desplazamientos individuales de cada tautómero ($\delta_i^Z, \delta_i^E, \delta_i^C$), ponderado por su correspondiente fracción mol (f^Z, f^E, f^C):

$$\langle \delta_i^{ZEC} \rangle_t = f^Z \delta_i^Z + f^E \delta_i^E + f^C \delta_i^C \quad \dots \dots \dots (5.1)$$

Por tanto, si se conocen los desplazamientos químicos $\delta_i^Z, \delta_i^E, \delta_i^C$ de todos los núcleos de los tautómeros en cierto disolvente, y el desplazamiento químico correspondiente al mismo núcleo de la mezcla tautomérica en el mismo disolvente, podríamos usar la ecuación 5.1 para calcular la fracción mol de cada tautómero mediante un análisis multivariable. No obstante, como se ha mencionado, generalmente no es posible conocer los desplazamientos químicos individuales de cada tautómero. Este inconveniente puede abordarse usando a los desplazamientos químicos teóricos como información auxiliar, conjuntamente con los detectados experimentalmente, para obtener las fracciones mol de los tautómeros. En estos términos, las fracciones mol solución a la ecuación 5.1, serán aquellas para las cuales la suma de los residuales cuadráticos toma su valor mínimo:

$$\min \sum \frac{\left(\langle \delta_i^{ZEC} \rangle_t - [f^Z \delta_i^Z + f^E \delta_i^E + f^C \delta_i^C + \beta] \right)^2}{N - P} \quad \dots \dots \dots (5.2)$$

En 5.2, N es el número de los núcleos magnéticamente activos considerados, P es el número de parámetros incluidos en el ajuste multivariable y β es el parámetro de intercepción. El estimador β tendría un valor igual a cero si los desplazamientos químicos experimentales de cada tautómero se utilizaran en el ajuste. Así mismo, las fracciones mol

f^Z, f^E, f^C son los coeficientes de ajuste de este análisis estadístico y deben de satisfacer las condiciones de fracción mol: $f^Z, f^E, f^C \geq 0, f^Z + f^E + f^C = 1$.

5.2 Metodología

5.2.1 Métodos teóricos.

Para calcular los desplazamientos químicos de las especies tautoméricas del tenoxicam se siguió la siguiente metodología: Se tomaron las geometrías de mínima energía determinadas en el capítulo 3 de la presente tesis de los tautómeros enol y zwitterion. Para encontrar la estructura de mínima energía del tautómero ceto, realizamos un análisis conformacional similar al realizado para los tautómeros enol y zwitterion en el capítulo 3 (ver figura 3.2) al nivel B3LYP/6-31+G(d); verificamos que la estructura final correspondiera a un mínimo de energía mediante un análisis de frecuencias vibracionales al mismo nivel de teoría. A las tres estructuras resultantes (una por cada tautómero) se les realizó una nueva optimización de geometría al nivel B3LYP/6-311++G(d,p) considerando el efecto del disolvente mediante el modelo PCM. Los disolventes utilizados fueron dimetilsulfóxido (DMSO) y agua. Adicionalmente consideramos un medio compuesto por una mezcla equimolar de DMSO/H₂O. Para modelar este sistema se tomo el valor de 64.02 para la constante dieléctrica estática, 4.9 para la constante dieléctrica a frecuencia infinita, 1.098 g/mL para la densidad [106,107] y un volumen molecular de 3.05 Å³. Con el fin de evaluar el efecto de la funcional en la población final de cada especie tautomérica, calculamos las constantes de apantallamiento con los funcionales de la densidad PW91[108], B3LYP, O3LYP [50], OLYP, OPBE [109,110,111], y OPW9 [111], los cuales han demostrado presentar la mejor precisión en varios estudios comparativos en el cálculo de desplazamientos químicos [112,113]. En nuestros cálculos de las constantes de apantallamiento utilizamos el conjunto base 6-311 + + G (d, p) y el esquema Gauge Invariant Atomic Orbital (GIAO) [114,115], así como el método PCM para modelar el medio disolvente. Para obtener el desplazamiento químico, utilizamos las constantes de apantallamiento del Tetrametilsilano (TMS) como referencia, calculadas al mismo nivel de teoría.

5.2.2 Procedimiento experimental.

Los espectros de RMN se midieron a 298 K en un espectrómetro Bruker AVANCE III 500, 11.7 Tesla, a 500 MHz para las señales ^1H y a 125MHz para las señales ^{13}C . Los desplazamientos químicos δ (en ppm) se obtuvieron a partir de una referencia de TMS. Los espectros HSQC y HMBX nos permitieron realizar la asignación no ambigua de los desplazamientos ^{13}C . De esta forma se obtuvieron los desplazamientos químicos ^1H y ^{13}C para una solución 10^{-3}M de tenoxicam. Para los espectros de ^1H y ^{13}C RMN de tenoxicam en la solución equimolar deuterada de DMSO- H_2O , 50 mg de Tenoxicam se disolvieron en 1 ml de solución DMSO- $\text{d}_6/\text{D}_2\text{O}$ 4:1 (v/v). Alícuotas de soluciones deuteradas de HCl o NaOH se añadieron apropiadamente para cambiar el pH del medio, manteniendo la relación equimolar entre disolventes. El espectro de ^1H RMN de Tenoxicam en agua deuterada, se obtuvo para una solución 10^{-3}M del fármaco en un sistema compuesto por D_2O y ácido perclórico deuterado ($\text{pH} = 0,56$). El pH se incrementó mediante la adición de una solución de deuteróxido de sodio 0,3 M. Debido a la baja solubilidad del Tenoxicam en D_2O , no pudo registrarse su espectro RMN ^{13}C .

5.3 Resultados

5.3.1 Equilibrios de tautomerización del tenoxicam en diferentes medios.

Dado que el uso de la ecuación 5.1 y la minimización de acuerdo a la ecuación 5.2 requiere la asignación experimental no ambigua de los desplazamientos químicos de la especie neutra de tenoxicam, la Correlación Bidimensional Múltiple Heteronuclear (2D-HMBC por sus siglas en inglés) fue usada para realizar la asignación de los desplazamientos ^{13}C del fármaco (Figura 5.2). En la Tabla 5.1 se muestran los desplazamientos experimentales ^1H y ^{13}C de los núcleos del tenoxicam, obtenidos en los medios deuterados DMSO DMSO/ H_2O y H_2O . Puede observarse que existen cambios pequeños pero perceptibles en los desplazamientos químicos registrados en los diferentes medios. Así mismo, puede observarse que no existe tendencia en el cambio de los desplazamientos químicos conforme la polaridad del medio cambia, por ejemplo, a medida que la proporción de agua se incrementa, el valor del desplazamiento químico de $\text{H5}'$ también incrementa, desde 7.31 en

DMSO hasta 7.45 en H₂O. En contraste, el valor del desplazamiento de H6 disminuye con la cantidad de agua, desde 8.03 en DMSO puro, hasta 7.91 en H₂O puro. Así mismo, el valor de desplazamiento químico más alto para H13 (2.89) se observa en la mezcla equimolar DMSO/H₂O.

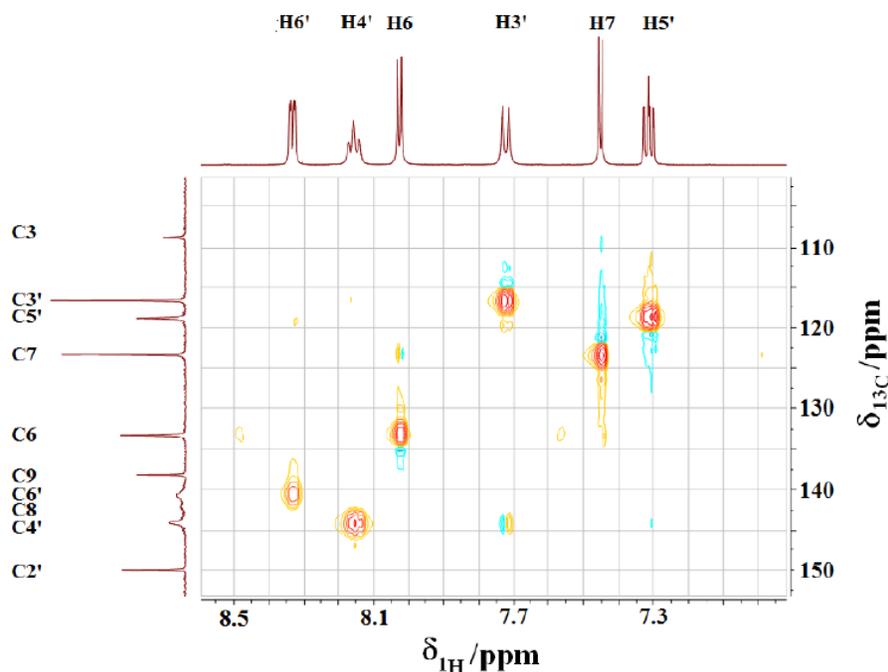


Figura 5.2 Gradientes 2D-HMBC para tenoxicam a pH de 3.7 en la mezcla equimolar DMSO/H₂O

Dado que de los funcionales considerados para calcular los desplazamientos químicos del tenoxicam, con el funcional de la densidad O3LYP se obtuvieron los menores valores de residuales cuadráticos, el siguiente análisis de resultados lo realizamos con los desplazamientos químicos calculados con este funcional. No obstante, conclusiones muy similares pueden obtenerse a partir de los desplazamientos químicos calculados con los otros funcionales (Tablas 5.2, 5.3 y 5.4).

Tabla 5.1. Desplazamientos químicos experimentales ^1H y ^{13}C del tenoxicam en los tres medios estudiados (numeración correspondiente a la figura 5.1).

	$\delta^1\text{H}$ (ppm)			$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ^(a)	
	DMSO	Mezcla	H ₂ O	DMSO	H ₂ O
3				108.93	108.76
4				163.07	164.92
6	8.03	7.95	7.91	132.73	133.44
7	7.46	7.41	7.46	122.87	123.50
8				137.65	138.03
9				141.70	143.30
13	2.9	2.89	2.96	39.17	39.98
14				165.60	166.06
2'				149.50	149.60
3'	7.73	7.65	7.52	116.10	116.75
4'	8.16	8.19	8.3	143.56	145.51
5'	7.31	7.34	7.45	118.43	119.16
6'	8.34	8.28	8.26	140.24	139.37

^(a)Debido a la pobre solubilidad del tenoxicam, los desplazamientos ^{13}C NMR no se determinaron en agua.

En el ajuste multivariable (ecuación 5.2), utilizando los desplazamientos químicos $\delta^{13}\text{C}$, observamos (Tabla 5.5) que tanto la solución de DMSO como la mezcla DMSO/H₂O están enriquecidas con el tautómero zwitterion (con fracciones mol de 0.61 y 0.73 respectivamente), mientras que el enol es la segunda especie en abundancia relativa (0.39 en DMSO y 0.27 en DMSO/H₂O) y el tautómero ceto no está presente en los dos medios (ya que el valor estimado para su población fue prácticamente cero). Así mismo, las relaciones tautoméricas zwitterion/enol con las cuales se obtuvieron los menores valores de residuales cuadráticos fueron 1.56 en DMSO (mSRC = 3.730) y 2.70 en DMSO/H₂O DMSO (mSRC = 3.894). Es de notarse que, tal y como se esperaba, la población del tautómero zwitterion aumenta a medida que la cantidad de agua en la mezcla aumenta también.

Tabla 5.2. Fracciones mol obtenidas para los tautómeros zwitterion y enol mediante ajuste multivariable usando los desplazamientos químicos $\delta^{13}\text{C}$ calculados con diferentes funcionales en los medios indicados.

	<i>DMSO</i>	<i>DMSO/ H₂O</i>
B3LYP	0.53, 0.47 (8.712)	0.65,0.35 (8.660)
O3LYP	0.61, 0.39 (3.730)	0.73,0.27 (3.864)
OLYP	0.60, 0.35 (4.116)	0.70,0.23 (4.553)
OPBE	0.65, 0.30 (4.328)	0.75, 0.18 (4.563)
OPW91	0.65, 0.30 (4.248)	0.75, 0.18 (4.491)
PW91	0.59, 0.49 (4.868)	0.70, 0.17 (5.280)

Tabla 5.3. Fracciones mol obtenidas para los tautómeros zwitterion y enol mediante ajuste multivariable usando los desplazamientos químicos $\delta^1\text{H}$ calculados con diferentes funcionales en los medios indicados.

	<i>DMSO</i>	<i>DMSO/ H₂O</i>	<i>H₂O</i>
B3LYP	0.64, 0.36 (0.008)	0.72, 0.28 (0.004)	0.90, 0.10 (0.006)
O3LYP	0.65, 0.35 (0.012)	0.74, 0.26 (0.007)	0.93, 0.07 (0.008)
OLYP	0.69, 0.31 (0.018)	0.77, 0.23 (0.013)	0.95, 0.05 (0.013)
OPBE	0.67, 0.33 (0.022)	0.75, 0.25 (0.015)	0.93, 0.07 (0.015)
OPW91	0.66, 0.34 (0.012)	0.75, 0.25 (0.015)	0.94, 0.06 (0.015)
PW91	0.68, 0.32 (0.022)	0.76, 0.24 (0.015)	0.94, 0.06 (0.012)

Tabla 5.4. Fracciones mol obtenidas para los tautómeros zwitterion y enol mediante ajuste multivariable usando los desplazamientos químicos $\delta^1\text{H}$ calculados con diferentes funcionales en los medios indicados. No se consideró al tautómero ceto en el análisis multivariable.

	<i>DMSO</i>	<i>DMSO/ H₂O</i>	<i>H₂O</i>
B3LYP	0.71, 0.29 (0.020)	0.77, 0.23 (0.009)	0.92, 0.08 (0.006)
O3LYP	0.72, 0.28 (0.021)	0.78, 0.21 (0.011)	0.94, 0.06 (0.008)
OLYP	0.75, 0.25 (0.027)	0.81, 0.19 (0.016)	0.96, 0.04 (0.013)
OPBE	0.71, 0.29 (0.029)	0.78, 0.22 (0.017)	0.93, 0.07 (0.014)
OPW91	0.72, 0.28 (0.021)	0.77, 0.23 (0.027)	0.92, 0.08 (0.030)
PW91	0.73, 0.27 (0.030)	0.79, 0.21 (0.018)	0.94, 0.06 (0.012)

Al usar los desplazamientos químicos $\delta^1\text{H}$ del tenoxicam en el análisis estadístico mencionado, se observa que la población de tautómero zwitterion se incrementa con la cantidad de agua en el medio, tal y como se indicó en el análisis de los desplazamientos $\delta^{13}\text{C}$. Sin embargo, contrario a los resultados obtenidos con los desplazamientos $\delta^{13}\text{C}$, la fracción más grande obtenida para tenoxicam con $\delta^1\text{H}$, después de la zwitterion, fue la fracción ceto. Las relaciones tautoméricas zwitterion/ceto calculadas fueron 1.86, 2.85 y 13.29 en DMSO, DMSO/H₂O y H₂O respectivamente. No obstante, es de notarse que existen el doble de datos en el análisis estadístico con $\delta^{13}\text{C}$ que con $\delta^1\text{H}$ (doce y seis respectivamente). Adicionalmente, hay más átomos de carbono en el sitio de tautomerización (C3, C4, C14 y todos los carbonos del anillo piridina) que hidrógeno (sólo aquellos hidrógenos contenidos en el anillo piridina). Por estas razones, se consideró que los resultados con los desplazamientos $\delta^{13}\text{C}$ son más significativos que los obtenidos con los desplazamientos $\delta^1\text{H}$. Por tanto, consideramos que es la enol y no la ceto, la especie que coexiste con la zwitterion en los diferentes medios estudiados. Consecuentemente, realizamos el análisis multivariable con los desplazamientos químicos $\delta^1\text{H}$ del tenoxicam, considerando que sólo tenemos en solución a los tautómeros zwitterion y enol. Las relaciones tautoméricas zwitterion/enol obtenidas mediante esta consideración son 2.57, 3.55 y 15.67 en DMSO, DMSO/H₂O y H₂O respectivamente. Estas difieren a lo mucho en una parte en diez de las obtenidas cuando el análisis estadístico se realiza con los desplazamientos $\delta^{13}\text{C}$.

Debido a lo anterior, las relaciones tautoméricas en DMSO (1.56) y en DMSO/H₂O (2.70) las tomamos del análisis estadístico realizado con los desplazamientos $\delta^{13}\text{C}$. Dado que, debido a la poca solubilidad del tenoxicam en agua, no fue posible registrar sus desplazamientos químicos $\delta^{13}\text{C}$, la relación tautomérica zwitterion/enol en solución acuosa (15.67) se tomó a partir de los resultados obtenidos en el análisis estadístico usando los desplazamientos $\delta^1\text{H}$ registrados en este disolvente.

Tabla 5.5. Fracciones mol estimadas para los tautómeros Zwitterion (Z), Enol (E) y Ceto (C) del Tenoxicam en los medios estudiados. Estos resultados fueron obtenidos usando el funcional O3LYP.

	DMSO			Mezcla			Agua		
	Z	E	C	Z	E	C	Z	E	C
$\delta^{13}\text{C}$	0.61	0.39	0.00	0.73	0.27	0.00			
$\delta^1\text{H}$	0.65	0.00	0.35	0.74	0.00	0.26	0.93	0.00	0.07
$\delta^1\text{H}^{(a)}$	0.72	0.28	--	0.79	0.21	--	0.94	0.06	--

^(a) Los desplazamientos químicos del tautómero ceto no se consideraron en el análisis multivariable.

Al comparar los resultados obtenidos a partir de los desplazamientos químicos calculados con el funcional O3LYP y los obtenidos a partir de los desplazamientos químicos calculados con los otros funcionales considerados en esta parte del proyecto, observamos que las constantes de tautomerización obtenidas a partir de las fracciones mol calculadas mediante el análisis multivariable 5.2, varían muy poco al cambiar el funcional con el cual se calculen los desplazamientos químicos de los tautómeros (Tabla 5.6).

Tabla 5.6. Constantes de tautomerización obtenidas con los desplazamientos químicos calculados con varios funcionales de la densidad.

	Log Kz		
	DMSO	DMSO/H ₂ O	H ₂ O
B3LYP	0.16	0.37	1.06
O3LYP	0.19	0.43	1.19
OLYP	0.18	0.37	1.38
OPBE	0.26	0.48	1.12
OPW91	0.26	0.48	1.06
PW91	0.16	0.37	1.19

5.3.2 Cálculo de las constantes microscópicas del tenoxicam en solución, a partir de su constante de tautomerización.

Como se ha puntualizado en la presente tesis de doctorado, una de las aplicaciones más importantes de la constante de tautomerización es que conjuntamente con los pK_a 's

macroscópicos, determinan las anheladas constantes microscópicas de acidez. Las constantes macroscópicas (de acidez) de este fármaco (K_{a1} y K_{a2}), las determinamos monitoreando la variación de los desplazamientos químicos de tenoxicam al modificar el pH del medio, tanto en solución acuosa como en la mezcla equimolar DMSO/H₂O. En la figura 5.3 se muestra la dependencia experimental de los desplazamientos químicos RMN ¹H respecto a la variación del pH en solución acuosa para los núcleos de hidrógeno H6, H3', H4' y H5' del tenoxicam. La respuesta es la curva típica sigmoïdal que se observa en una valoración ácido base. Por tanto, usamos los desplazamientos químicos de los núcleos H3', H4' y H5', medidos a diferentes valores de pH para obtener los valores de las macro-constantes usando el programa de ajuste estadístico HYPNMR [116]. Los resultados generales se muestran en la Tabla 5.7. Es de notarse que los resultados de las constantes macroscópicas obtenidos en este estudio ($pK_{a1}=1.36$, $pK_{a2}=5.46$) son comparables con los reportados previamente mediante otras técnicas experimentales [33].

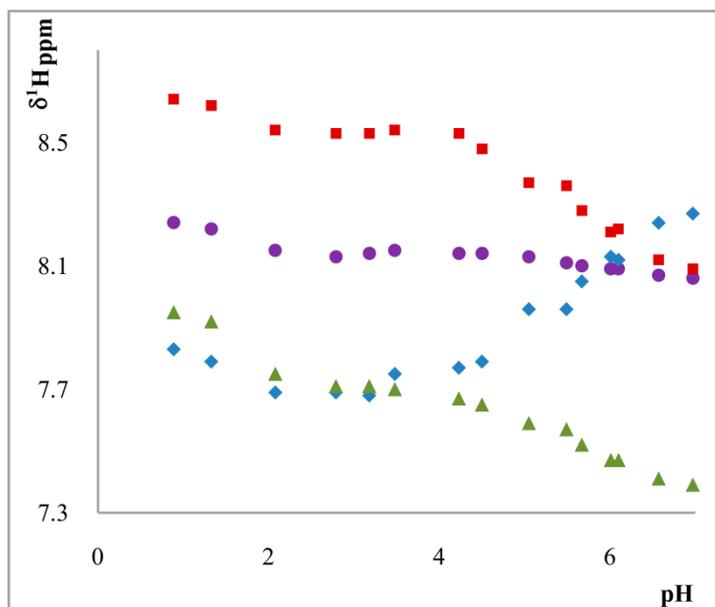


Figura 5.3 Cambio de algunos desplazamientos químicos RMN ¹H NMR respecto al valor de pH H6 (●), H3' (◆), H4' (■), H5' (▲).

Aprovechando la disponibilidad de las macro-constantes en la mezcla equimolar DMSO/H₂O reportadas en otro estudio [34], así como de la constante de tautomerización

aquí calculada, también obtuvimos los valores del conjunto completo de micro-constantes del tenoxicam en este medio (DMSO/H₂O). Las micro-constantes obtenidas en agua las comparamos con las reportadas por otros autores (Tabla 5.7)

Tabla 5.7. Comparación de las micro y macro-constantes del tenoxicam en solución acuosa y en la mezcla equimolar DMSO-H₂O obtenidas en este estudio, con las reportadas por varios autores.

	Solución Acuosa				Mezcla		
	Ref [34]	Ref [33]	Ref [41]	Ref [36]	Este estudio	Ref [34]	Este estudio
<i>pKa1</i>	1.34(0.07) ^a	1.07	1.1	1.08	1.36(0.10) ^a	1.92(0.15) ^a	
<i>pKa2</i>	5.26(0.03) ^a	5.34	5.12	5.31	5.46(0.04) ^a	4.42(0.07) ^a	
<i>Log K_z</i>		2.17	1.46	1.62	1.19		0.10
<i>pKa11</i>		1.07	1.12	1.09	1.39		2.18
<i>pKa12</i>		3.24	2.58	2.71	2.58		2.27
<i>pKa21</i>		5.34	5.1	5.32	5.49		4.68
<i>pKa22</i>		3.17	3.64	3.7	4.29		4.58

^a Entre paréntesis la desviación estándar de los valores obtenidos experimentalmente

Los datos reportados en las referencias [33] y [36] se obtuvieron mediante técnicas experimentales, haciendo diferentes suposiciones: las constantes de la referencia [33] se obtuvieron mediante la suposición de que los efectos electrostáticos que incrementan la acidez del OH del grupo enólico en piroxicam, son de la misma magnitud que en tenoxicam, en donde adicionalmente se ha considerado que la *K_{a22}* (microscópica) del piroxicam es de magnitud semejante a la *K_{a2}* (macroscópica) del isoxicam y meloxicam (ver sección 3.6). En la referencia [36] el valor de *K_z* se obtuvo analizando el efecto de una gran cantidad de sustituyentes (no susceptibles a desprotonación) sobre la constante de acidez *K_{a1}* en derivados del tenoxicam, con la finalidad de encontrar al sustituyente que mejor mimetizará al anillo piridil original, presente en la estructura del fármaco (ver sección 3.6). En la tabla 5.7 puede observarse que el valor de *logK_z* aquí obtenido, es muy similar al de la referencia [36]. Un aspecto de gran importancia en este proyecto, es que la constante de tautomerización de la referencia [41] corresponde a la publicación realizada respecto al estudio efectuado en el Capítulo 4 de la presente tesis de doctorado y posee un valor muy similar al determinado mediante el análisis estadístico propuesto (ver Tabla 5.7), por lo que se observa una gran consistencia entre los resultados obtenidos con las dos

metodologías aquí consideradas, las cuales hacen uso de aproximaciones y propiedades distintas para el cálculo de las micro-constantes de los oxicams.

CAPITULO 6

“Discusión”

Las propiedades químicas (como los coeficientes de absorción UV-Visible y los desplazamientos químicos de Resonancia Magnética Nuclear) de los cinco oxicams considerados en este estudio son muy sensibles al pH y la polaridad del medio. Esta sensibilidad se debe principalmente a los micro-equilibrios químicos presentes entre las diferentes especies prototrópicas que poseen estos fármacos. Por tanto, mediante la manipulación del pH y el valor de constante dieléctrica del medio, fue posible aislar a dichas especies y asignarles, de manera no ambigua, una banda de absorción específica para cada una de ellas, apoyándonos en cálculos TD-DFT para cada asignación. Lo anterior nos permitió detectar el número de micro-especies químicas de cada uno de los oxicams, así como asociar a cada una de las banda experimental registradas, una estructura de mínima energía para cada micro-especie. Detectamos 4 especies para piroxicam, tenoxicam meloxicam y lornoxicam; una especie catiónica univalente, una especie neutra enol, una especie neutra zwitterion y una especie aniónica univalente. Para isoxicam sólo encontramos evidencia de la especie enol y anión (univalente). Para ninguno de los oxicams encontramos evidencia de alguna otra especie o estructura (como la conformación abierta de piroxicam reportada por algunos autores) adicional a las mencionadas.

Las conformaciones de mínima energía encontradas en el estudio de absorción UV-Visible se utilizaron para determinar las 5 micro-constantes de los oxicams estudiados:

En primera instancia, determinamos las 4 micro-constantes de acidez mediante los ciclos termodinámicos directo y de intercambio protónico. Con el ciclo de intercambio protónico se obtuvieron en general pK_a 's mucho más próximos a los experimentales, debido a que no contempla a la especie protón (para la cual hay una gran incertidumbre experimental respecto a su energía libre de solvatación) y presumiblemente, debido a una cancelación sustancial de errores. De los modelos continuos utilizados, el modelo de disolvente CPCM-UAKS parece ser el más conveniente en el cálculo de pK_a 's mediante el ciclo de intercambio protónico para esta familia de fármacos. La cantidad de micro y macro equilibrios propuestos en este estudio es consistente con la cantidad de micro-especies encontradas en el estudio de absorción UV-Visible. Así mismo, se obtuvieron valores para las micro-constantes de cada uno de los oxicams estudiados, comparables con los reportados en la literatura. Dada la complejidad que implica la determinación de las micro-

constantes de acidez, la aplicación de este tipo de metodologías resulta muy conveniente, con la limitante de que es necesario disponer de las micro y macro-constantes de un compuesto de referencia para poder así calcular las micro-constantes de los otros miembros de la familia de compuestos, permitiendo incluso, obtener valores de micro-constantes de acidez confiables para compuestos cuya reactividad ácido-base aún no ha sido explorada experimentalmente, tal y como se mostró en el presente proyecto, con los fármacos sudoxicam, híbrido de piroxicam-rutaecarpina, propoxicam y sus derivados cuaternarios.

En segunda instancia, con las geometrías de mínima energía obtenidas, calculamos la constante de tautomerización de tenoxicam en medios de diferente polaridad mediante un modelo estadístico de análisis multivariable, el cual hace uso de los desplazamientos químicos detectados experimentalmente, así como de los obtenidos a partir de la teoría de funcionales de la densidad. En este estudio encontramos que la especie zwitterion es la más abundante en medios polares (H_2O) y de media polaridad (DMSO y la mezcla DMSO/ H_2O). El tautómero enol coexiste en diferentes proporciones con el zwitterion en estos medios, pero no encontramos evidencia de la existencia de tautómero ceto, el cual ha sido sugerido en otros reportes. Todos estos resultados son totalmente consistentes con los obtenidos en el estudio de las propiedades de absorción UV-Visible de los oxicams, específicamente del tenoxicam, en donde la estructura detectada en medios de alta polaridad correspondió a la zwitterion, además de que no fue necesario considerar un tautómero ceto, para explicar las bandas de absorción UV-Visible detectadas para tenoxicam en los diferentes medios considerados. Por tanto, los resultados obtenidos con el modelo multivariable propuesto son acordes a lo químicamente esperado (a medida de que la polaridad aumenta, aumenta la abundancia relativa de la especie más polar). Las constantes de tautomerización obtenidas mediante el modelo multivariable propuesto, son comparables con las reportadas en estudios previos en solución acuosa. Un aspecto relevante del modelo utilizado, es que las constantes obtenidas son muy similares independientemente del funcional utilizado en el cálculo de los desplazamientos químicos del tenoxicam.

Con base en lo anterior, el modelo de ajuste multivariable propuesto en el presente proyecto de doctorado, el cual hace uso de los desplazamientos medidos experimentalmente así

como de los calculados mediante métodos de la química teórica, parece ser una alternativa viable para calcular las constantes de tautomerización, las cuales son fundamentales para revelar el total de los micro-equilibrios químicos presentes en moléculas que presentan prototropías similares a la de los oxicams, estas moléculas pueden ser incluso otros fármacos. Este método tiene como únicas asunciones las ecuaciones 5.1 y 5.2 (las cuales son válidas a concentraciones bajas del fármaco) y aparentemente es casi independiente con el nivel de teoría con el cual se obtengan los desplazamientos químicos de las especies participantes en el equilibrio (Tabla 5.6). Así mismo, mostramos que una vez determinada la constante de tautomerización (del tenoxicam), la determinación del resto de las micro-constantes se convierte en un problema de rutina.

Es de resaltar la similitud que existe entre las constantes microscópicas determinadas mediante el ciclo termodinámico de intercambio protónico (capítulo 4, Tabla 4.4) y las calculadas a partir de la constante de tautomerización determinada mediante el ajuste multivariable (capítulo 5, Tabla 5.7), siendo que cada metodología hace uso de procedimientos y propiedades totalmente distintas. Estos resultados (los cuales a su vez están en buen acuerdo con los reportados en otros estudios experimentales) indican que las metodologías aquí consideradas son apropiadas para la determinación de micro-constantes de equilibrio.

La utilidad de los modelos y procedimientos utilizados en el presente proyecto se hace evidente, especialmente para el caso de meloxicam, cuya prototropía ha sido un tema de controversia no resuelto. La manipulación del medio y el pH nos permitió detectar cuatro bandas de absorción distintas, presumiblemente a cuatro especies prototrópicas diferentes, las cuales fueron confirmadas mediante la comparación de los máximos de absorción UV-Visible con las energías de excitación teóricas calculadas para dichas especies. Empleando las conformaciones de mínima energía para cada especie prototrópica de meloxicam en el ciclo termodinámico de intercambio protónico, obtuvimos dos valores de pK_a semejantes a los reportados en la literatura, en los cuales se considera que este fármaco posee un comportamiento prototrópico semejante al mostrado en la figura 1.2. Estas dos evidencias establecen que el meloxicam posee cuatro micro-especies y 5 micro-equilibrios químicos.

Finalmente, reportamos los primeros valores de cada una de las constantes asociadas a estos micro-equilibrios.

Conclusiones

En este estudio logramos identificar cada una de las especies prototrópicas de los oxicams involucradas en los micro-equilibrios mostrados en la figura 1.2, mediante un estudio comparativo de los máximos de absorción de los oxicams en varios medios, con las energías de excitación calculadas en el marco de la TD-DFT. Mediante la aplicación del ciclo termodinámico de intercambio protónico calculamos las constantes de acidez, obteniendo valores semejantes a los reportados en la literatura y corroboramos que las especies propuestas en el estudio inicial UV-Visible (primera parte del proyecto) son las involucradas en los micro-equilibrios de los oxicams. Finalmente, propusimos un modelo NMR teórico-experimental con el cual fue posible calcular las poblaciones tautoméricas de tenoxicam, así como su constante de tautomerización en tres medios de diferente polaridad. Los resultados obtenidos fueron consistentes con la dependencia propuesta en la figura 1.2 del equilibrio de tautomerización con la polaridad del medio; a medida que la polaridad del medio aumenta, la abundancia relativa del tautómero zwitterion es mayor. Los resultados obtenidos para la constante de tautomerización en agua son semejantes a los reportados en estudios previos, así como al obtenido a partir de las micro-constantes de acidez calculadas mediante el ciclo de intercambio protónico. Así mismo, observamos que, mediante el modelo multivariable utilizado, el valor calculado para el $\log K_z$ varía muy poco al cambiar el método de cálculo. Mediante la aplicación de las metodologías aquí propuestas, logramos revelar el comportamiento prototrópico del meloxicam, el cual no había sido resuelto. Todos los resultados arriba mencionados, nos permitieron revelar *los micro-equilibrios químicos en solución de fármacos de la familia de los oxicams*.

Apéndices

Apéndice 1: El Modelo del Continuo Polarizable

El Modelo Continuo Polarizable es un modelo de solvatación de un soluto en un disolvente, formando una solución extremadamente diluida. En este modelo, el disolvente es representado por un medio dieléctrico continuo isotrópico y uniforme, de constante dieléctrica ϵ ; la molécula del soluto se encuentra dentro de una cavidad la cual está inmersa en el medio (disolvente).

Cuando la molécula de soluto es insertada dentro de la cavidad, su distribución de carga polariza al medio dieléctrico. Los medio polarizado re-polarizan al soluto, en un complejo re-arreglo soluto-disolvente, hasta que el equilibrio es alcanzado. En este punto, el proceso de re-polarización ha modificado la distribución de cargas inicial (en el vacío) de la molécula del soluto. El Hamiltoniano electrónico efectivo para este sistema es [117]:

$$\hat{H}_f = -\frac{\hbar^2}{2m_i} \sum_i \nabla_i^2 - \sum_{\alpha} \sum_i \frac{Z_{\alpha} e}{r_{i-\alpha}} + \sum_i \sum_{i>j} \frac{e^2}{r_{i-j}} + \Phi^{int} = \hat{H}_0 + \hat{\Phi}^{int} \quad (\text{A1.1})$$

Donde Φ^{int} es el potencial de interacción del soluto con el disolvente. La ecuación de Schrödinger asociada a A1.1 es:

$$\hat{H}_f \Psi_f = E_f \Psi_f \quad (\text{A1.2})$$

Formalmente, toda la información relevante respecto al efecto del disolvente sobre el soluto se encuentra en la función de onda Ψ_f ; no obstante, tratando al disolvente sólo como un medio dieléctrico isotrópico lineal, el potencial de interacción Φ^{int} es reducido sólo a sus componentes electrostáticas clásicas [117].

La polarización del disolvente por el soluto puede expresarse en términos del vector de polarización $P(r)$ para un dieléctrico isotrópico [118]:

$$P(r) = \frac{\epsilon - 1}{4\pi\epsilon} \nabla \Phi_{tot}(r) \quad (\text{A1.3})$$

Donde $P(r)$ es el vector de polarización y $\Phi_{tot}(r)$ es el potencial electrostático total, el cual contiene las contribuciones del potencial electrostático generado por la distribución de cargas de la molécula Φ^M y el potencial generado por la polarización del medio Φ^σ :

$$\Phi^{tot} = \Phi^M + \Phi^\sigma \quad (A1.4)$$

El potencial electrostático molecular contiene a su vez, tanto la contribución de la distribución de carga electrónica y como de las cargas nucleares:

$$\Phi_1^M = \sum_{\alpha} \frac{Z_{\alpha}}{r_{1-\alpha}} - \int \frac{\rho(x, y, z)}{r_{1-2}} dv \quad (A1.5)$$

donde α denota a los núcleos, i a los electrones del soluto y $\rho(x, y, z)$ es la densidad de probabilidad electrónica. El potencial generado por la distribución de cargas del disolvente Φ^σ depende de la forma en que se construya la cavidad. Dos propiedades que debe cumplir dicha cavidad son: a) debe excluir al disolvente; b) debe reproducir tanto como sea posible, la forma molecular del soluto. Las cavidades que no respetan esta última condición, generan deformidades en la distribución de carga del soluto después de la repolarización, lo que se traduce en una mala predicción de propiedades [117]. Es común por tanto, construir cavidades mediante la superposición de esferas de Van der Waals de cada uno de los átomos en la molécula de soluto, multiplicados por un factor de escala (Figura A1).

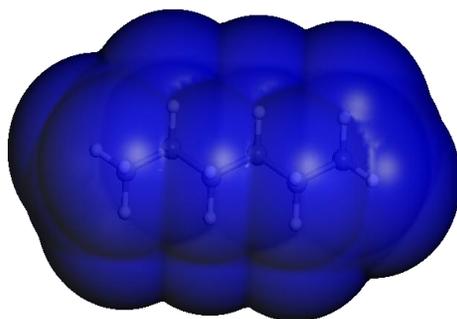


Figura A1. Cavidad generada para la molécula de hexano mediante la superposición de esferas de Van der Waals de sus átomos constituyentes, multiplicadas por un factor de escala de 1.2.

Una forma de representar el potencial electrostático debido al medio, una vez generada la cavidad del disolvente, es mediante el modelo de Cargas Superficiales Aparentes (CSA). Las cargas se encuentran dispersas en la superficie de la cavidad y generan el potencial electrostático [118]:

$$\Phi^\sigma = \int \frac{\sigma(s)}{|r-s|} d^2s \quad (\text{A1.6})$$

Donde s es la variable de posición extendida sobre la superficie de la cavidad y σ la carga superficial. En este modelo, una distribución de carga (aparente) aparece en la superficie de discontinuidad entre las diferentes regiones del medio dieléctrico (dentro de la cavidad $\epsilon=1$ y fuera de la cavidad $\epsilon=\epsilon$). Dicha distribución de carga puede expresarse en términos de la diferencia en los vectores de polarización por unidad de volumen dentro de la cavidad (P_1) y fuera de la cavidad (P_2) [118]:

$$\sigma = -(P_1 - P_2) \cdot \eta_{12} \quad (\text{A1.7})$$

Donde η_{12} es la normal de la región uno a la dos. Ambos vectores de polarización (P_1 y P_2) pueden obtenerse a partir de 1.3, no obstante, la polarización del medio dentro de la cavidad es nula (dentro de la cavidad el soluto se encuentra al vacío y el disolvente ha quedado excluido) [117]. Tomando en cuenta esta consideración en A1.7, e insertando A1.4 en A1.3, la carga superficial aparente está dada por la siguiente expresión:

$$\sigma(s) = \frac{\epsilon-1}{4\pi\epsilon} \nabla \Phi^M = \frac{\epsilon-1}{4\pi\epsilon} \frac{\partial(\Phi^M + \Phi^\sigma)}{\partial\eta} \quad (\text{A1.8})$$

con η como el vector perpendicular a la superficie con dirección fuera de la cavidad. Finalmente, insertando A1.8 en A1.3 se obtiene la contribución del disolvente al potencial de interacción total. Una forma de simplificar el tratamiento del potencial electrostático A1.6 es dividir la superficie de la cavidad en pequeños elementos de área, los cuales poseen una carga discreta situada en su centro. Estas cargas son comúnmente llamadas tesituras (Figura A2) [118].

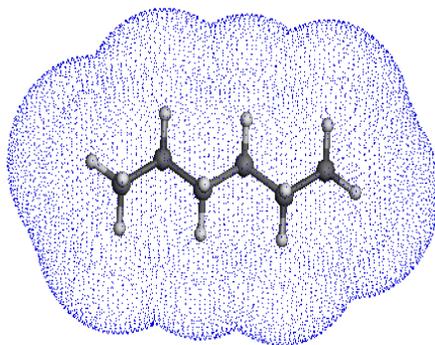


Figura A2. Cargas discretas esparcidas al exterior de la cavidad generada para la molécula de hexano.

Entre mayor tesitura se utilicen para representar el medio, se obtendrá un mejor potencial de interacción. En estos términos el potencial debido a la polarización del medio tiene la siguiente expresión:

$$\Phi^{\sigma} = \sum_k \frac{Q_k}{r - s_k} \quad (\text{A1.9})$$

Donde Q_k es la carga de la k -ésima tesitura y S_k es su posición. Empleando A1.8, la carga de la tesitura es:

$$Q_k = \frac{\epsilon - 1}{4\pi\epsilon} A_k \nabla V^{elec} \cdot \eta_k = \frac{\epsilon - 1}{4\pi\epsilon} A_k \nabla (\Phi^M + \Phi^{\sigma}) \cdot \eta_k \quad (\text{A1.10})$$

En A1.10, A_k es el área de la tesitura y η_k es el vector perpendicular a cada elemento de superficie en los que se ha dividido la cavidad. Los valores de las cargas obtenidos mediante A1.10 se utilizan para obtener el potencial electrostático del disolvente (A1.9) y el potencial de interacción total:

$$\Phi^{Int} = \sum_i \Phi^{\sigma}(r_i) + \sum_{\alpha} Z_{\alpha} \Phi^{\sigma}(r_{\alpha}) \quad (\text{A1.11})$$

Las ecuaciones A1.1, A1.9 y A1.10 se encuentran acopladas y deben de resolverse mediante el método iterativo autoconsistente (la carga de la tesitura depende del potencial electrostático total, el cual depende de la distribución de cargas del soluto más la distribución de cargas de las tesituras; la distribución de cargas del soluto se obtiene a partir

de la función de onda de la molécula polarizada por el disolvente). Inicialmente se considera que el potencial electrostático total (Φ^{tot}) corresponde al potencial electrostático molecular Φ^M (despreciando la contribución inicial del potencial de polarización del disolvente) y posteriormente se calcula la carga de la tesitura mediante A1.10 con dicho potencial. Con esta carga es posible calcular un valor para el potencial de polarización del disolvente Φ^σ mediante A1.9 y posteriormente, un nuevo potencial electrostático total (sumándole el de la molécula en el vacío) para calcular una nueva carga Q_k y un nuevo potencial Φ^σ , hasta alcanzar la convergencia en las cargas [117]. Con las nuevas cargas de las tesituras y con la distribución de cargas de la molécula se obtiene el potencial de interacción total (A1.11), el cual es utilizado para obtener una nueva función de onda molecular, resolviendo el problema de valores propios para el Hamiltoniano A1.1. Con la nueva función de onda se genera un nuevo potencial electrostático molecular para iniciar nuevamente el ciclo. Al finalizar la convergencia se obtiene una función de onda electrónica que contiene la contribución electrostática del efecto del disolvente sobre el soluto.

El modelo COSMO [119] es muy similar al PCM en el sentido en que construye una cavidad con la forma molecular del soluto y que sitúa cargas superficiales esparcidas sobre la superficie de dicha cavidad. No obstante, para determinar la magnitud de la carga de cada tesitura se considera que dicha carga corresponde a la de un conductor eléctrico y no a la de un dieléctrico; posteriormente, las cargas se multiplican por la función $(\epsilon - 1)/(\epsilon - k)$ para aproximarlas a las de un dieléctrico. Se ha determinado que la constante k depende de la forma de la cavidad, así como de la distribución de las cargas aparentes en la superficie de dicha cavidad. Se recomienda $k=0.5$ para solutos eléctricamente neutros y $k=0$ para iones.

Apéndice 2: La Teoría de Funcionales de la Densidad Dependiente del Tiempo.

La Teoría de Funcionales de la Densidad Dependiente del Tiempo (TD-DFT) extiende las ideas básicas de la Teoría de Funcionales de la Densidad en el estado fundamental, al tratamiento de excitaciones y de los más generales fenómenos dependientes del tiempo. La variable básica de la TD-DFT es la densidad electrónica de un cuerpo $\eta(r, t)$, dependiente del espacio y del tiempo. Las ventajas son idénticas respecto al caso independiente del tiempo: La función de onda de muchos cuerpos, dependiente de las $3N$ coordenadas electrónicas, es un objeto matemático muy complejo, mientras que la densidad es una función sólo de las 3 coordenadas espaciales (más el tiempo). Es posible obtener $\eta(r, t)$ a partir de un sistema ficticio de electrones no interactuantes, el modelo de Kohn-Sham. Dichos electrones sienten el potencial efectivo de Kohn-Sham dependiente del tiempo. No obstante, las soluciones de las ecuaciones de Kohn-Sham no se obtienen a partir de un principio variacional, si no a partir de un punto estacionario determinado por la acción mecánico-cuántica.

De forma general, un sistema de N electrones obedece la ecuación de Schrödinger Independiente del Tiempo

$$i \frac{\partial}{\partial t} \Psi(r_i, t) = \hat{H}(r_i, t) \Psi(r_i, t) \quad (\text{A2.1})$$

Donde r_i son los grados de libertad espaciales y de espín de la i -ésima partícula del sistema. El Hamiltoniano electrónico $H(r_i, t)$ dependiente del tiempo (bajo la aproximación de Born Oppenheimer) puede escribirse de la forma:

$$\hat{H}(r_i, t) = \hat{T}(r_i) + \hat{W}(r_i) + \hat{V}_{ext}(r_i, t) \quad (\text{A2.2})$$

El primer término de la derecha corresponde a la energía cinética de los electrones, mientras que el segundo a las interacciones electrón-electrón. Adicionalmente, los electrones del sistema se encuentran bajo la influencia del potencial dependiente del tiempo $\hat{V}_{ext}(r, t)$. El Hamiltoniano A2.2 es bastante general, por lo que describe la gran mayoría de

los fenómenos químicos, incluyendo átomos, moléculas y sólidos en campos electromagnéticos arbitrarios y dependientes del tiempo.

En el caso independiente del tiempo, el estado fundamental de un sistema mecánico-cuántico puede determinarse mediante la minimización del funcional de la energía:

$$E[\phi] = \int \phi \hat{H} \phi d\tau \quad (\text{A2.3})$$

En contraparte, en el caso dependiente del tiempo no existe un principio variacional en base a la energía total, dado que en este tipo de sistemas, la energía no es una propiedad que se conserve. En lugar de buscar una solución en el estado de mínima energía, la solución en el sistema dependiente del tiempo podrá encontrarse en un punto estacionario; dicho punto estacionario está dado por la acción mecánico-cuántica [120]:

$$A[\phi] = \int_{t_0}^{t_1} dt \int \phi(t) \left[i \frac{\partial}{\partial t} - \hat{H}(t) \right] \phi(t) d\tau \quad (\text{A2.4})$$

La función ϕ bajo la cual $A[\phi] = 0$ corresponde al punto estacionario. Consecuentemente, es posible encontrar una solución a la ecuación de Schrödinger A2.1 mediante la acción A2.4.

La solución de un sistema dependiente del tiempo mediante la TD-DFT se obtiene a partir de una densidad $\eta(r, t)$; para lo cual, en analogía a los teoremas de Hohenberg y Kohn, es necesario establecer un mapeo entre la densidad $\eta(r, t)$ y el potencial externo $\hat{V}_{ext}(r, t)$ (conocer la densidad es suficiente para determinar al potencial externo). No obstante, cualquier solución en términos de dicha densidad, debe estar construida a partir de la acción A2.4. Así mismo, dado que la forma del funcional relacionado a las interacciones electrón-electrón es aún desconocido, es necesario construir un sistema ficticio cuya densidad reproduzca exactamente la densidad real (en analogía que en el caso fundamental), estableciendo así, ecuaciones tipo Kohn-Sham dependientes del tiempo. Estos tres aspectos son fundamentales para obtener una solución a partir de la densidad $\eta(r, t)$ y están asentados en los teoremas de Runge y Gross [121], los cuales son una extensión a los teoremas de Hohenberg y Kohn, para sistemas dependientes del tiempo:

-Primer teorema de la TD-DFT: Para cualquier potencial de una partícula $v(r, t)$, el cual puede expandirse en series de Taylor alrededor de $t=t_0$, el mapeo $v(r, t) \rightarrow \eta(r, t)$ se encuentra definido resolviendo la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo, con un estado inicial $\phi(t_0) = \phi_0$ y calculando las correspondientes densidades $\eta(r, t)$. Este mapeo puede invertirse hasta una función dependiente del tiempo $C(t)$, la cual es meramente aditiva.

Por tanto, excepto por el requisito de ser expandible en serie de Taylor alrededor de $t=t_0$, no existe ninguna restricción respecto a los potenciales externos admisibles. Así mismo se establece al problema dependiente del tiempo, como un problema de valores iniciales. El valor inicial generalmente escogido es la densidad del estado fundamental. Este teorema es considerado como el teorema fundamental de la TD-DFT, no obstante existen dos teoremas indispensables para obtener una solución práctica al problema de muchos cuerpos interactuantes expuestos a un potencial externo dependiente del tiempo [121]:

-Segundo teorema de la TD-DFT: La integral de acción puede ser representada como un funcional de la densidad $A[\eta]$.

$$A[\eta] = B[\eta] - \int_{t_0}^{t_1} dt \int \eta(r, t) v(r, t) d\tau \quad (\text{A2.5})$$

Donde $B[\eta]$ es el funcional universal de la densidad dependiente del tiempo. $A[\eta]$ tiene un punto estacionario en la densidad exacta del sistema, por lo tanto, la densidad exacta puede determinarse mediante la ecuación de Euler:

$$\frac{\delta A[\eta]}{\delta \eta(r, t)} = 0 \quad (\text{A2.6})$$

-Tercer teorema de la TD-DFT: La densidad exacta del sistema dependiente del tiempo puede obtenerse mediante:

$$\eta(r, t) = \sum_j \phi_j^*(r, t) \phi_j(r, t) \quad (\text{A2.7})$$

donde los orbitales de una partícula $\phi_j(r, t)$ satisfacen la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo:

$$\left(i \frac{\partial}{\partial t} + \frac{1}{2} \nabla^2 \right) \phi_j(r, t) = v_{ef}[rt, \eta(r, t)] \phi_j(r, t) \quad (\text{A2.8})$$

y el potencial efectivo de un cuerpo $v_{ef}[rt, \eta(r, t)]$ está dado como:

$$v_{ef}[rt, \eta(r, t)] = v(r, t) + \int \eta(r, t) w(r, r) d\tau + v_{xc}(r, t) \quad (\text{A2.9})$$

Con:

$$v_{xc}(r, t) = \frac{\delta A_{xc}}{\delta \eta(r, t)} \quad (\text{A2.10})$$

siendo $w(r, r)$ el término de interacción electrónica meramente electrostática, cuyo análogo en la TFD del estado fundamental es el funcional de interacción Coulómbica; A_{xc} es el término de intercambio y correlación de la acción, cuya expresión es desconocida. El potencial A2.9 corresponde al potencial efectivo de Kohn-Sham para sistemas dependientes del tiempo [121].

TD-DFT de Respuesta Lineal

La ecuación A2.8 es muy compleja de resolver, incluso si el potencial A2.10 fuera conocido. No obstante, en las circunstancias en donde la perturbación debida al potencial externo es pequeña, no es necesario resolver todas las ecuaciones de Kohn-Sham dependientes del tiempo A2.8. En lugar de ello, es posible utilizar la teoría de perturbaciones para determinar el comportamiento del sistema. En estos términos se considera que la densidad cambia de forma lineal con la perturbación a lo que se determina respuesta lineal. La TD-DFT de respuesta lineal (LR) es el esquema más utilizado para el cálculo de propiedades ópticas, por ejemplo, las transiciones electrónicas relacionadas al espectro de absorción UV-Visible de moléculas.

En primera instancia se supone que a $t < t_0$ el potencial dependiente del tiempo es cero, lo que implica que el potencial externo corresponde únicamente al potencial nuclear $v^{(0)}$, por lo que el sistema se encuentra en su estado fundamental con densidad $\eta^{(0)}$. Al tiempo t_0 se activa la perturbación v_1 , de tal forma que el potencial externo total es $v_{ext} = v^{(0)} + v^{(1)}$. En estos términos, v_1 generará un cambio en la densidad inicial. Por tanto (si la perturbación es muy pequeña), es posible expandir a la densidad en series perturbativas respecto al potencial perturbativo:

$$\eta(r, t) = \eta^{(0)}(r) + \eta^{(1)}(r, t) + \eta^{(2)}(r, t) + \dots \quad (\text{A2.11})$$

Donde $\eta^{(1)}(r, t)$ es la componente de la densidad total $\eta(r, t)$ que depende de forma lineal a $v^{(1)}$, $\eta^{(2)}(r, t)$ depende cuadráticamente (a $v^{(1)}$), etc. Dado que hemos establecido que el potencial dependiente del tiempo es muy débil, su perturbación al estado $\eta^{(0)}(r)$ también es débil, por lo que truncaremos a la serie A2.11 sólo al término de primer orden, cuya expresión es:

$$\eta^{(1)}(r, t) = \int \chi(r, r', t - t') v^{(1)}(r') d^3 r' \quad (\text{A2.12})$$

La cantidad χ es la función de respuesta lineal densidad-densidad, la cual depende del intervalo $t - t'$, siendo t el tiempo de medición y t' el tiempo en el cual se lleva a cabo la perturbación. Adicionalmente, el sistema depende separadamente en el punto r de medición y en el punto r' de perturbación.

Transformando a la función de respuesta lineal del espacio de tiempo al espacio de frecuencias ω obtenemos:

$$\eta^{(1)}(r, t) = \int \chi(r, r', \omega) v^{(1)}(r', \omega) d^3 r' \quad (\text{A2.13})$$

La evaluación de dicha cantidad mediante teoría de perturbaciones es computacionalmente muy demandante, no obstante, es posible recurrir a la TD-DFT para simplificar el proceso. En el régimen de Kohn-Sham, la densidad del sistema de cuerpos interactuantes se obtiene

a partir de un sistema ficticio de cuerpos sin interacción. Por tanto, podemos obtener la respuesta lineal A2.13 para un sistema Kohn-Sham (de electrones que no interactúan):

$$\eta^{(1)}(r, t) = \int \chi_{KS}(r, r', \omega) v_{KS}^{(1)}(r', \omega) d^3 r' \quad (A2.14)$$

La función de respuesta en A2.14 corresponde a la de un sistema ficticio de electrones no interactuantes, la cual, consecuentemente, es mucho más fácil de calcular. Dicha función de respuesta puede expresarse en términos de los orbitales no perturbados de Kohn-Sham [120]:

$$\chi_{KS}(r, r', \omega) = \lim_{\eta \rightarrow +0} \sum_{jk} (f_k - f_j) \frac{\varphi_j(r) \varphi_j^*(r') \varphi_k(r') \varphi_k^*(r)}{\omega - (\varepsilon_j - \varepsilon_k) + i\eta} \quad (A2.15)$$

Donde f_m es el número de ocupación de m -ésimo orbital en el estado fundamental de Kohn-Sham.

El potencial $v_{KS}^{(1)}$ en A2.14 contiene sólo las contribuciones lineales de la dependencia del potencial efectivo de Kohn-Sham respecto a la perturbación:

$$\begin{aligned} v_{KS}^{(1)} &= v^{(1)}(r', t) + v_{Coul}^{(1)}(r', t) + v_{xc}^{(1)}(r', t) \\ v^{(1)}(r, t) &= v^{(1)}(r', t) \\ v_{Coul}^{(1)}(r, t) &= \int \eta^{(1)}(r', t) w(r, r') d^3 r' \\ v_{xc}^{(1)}(r, t) &= \int dt \int \frac{\delta v_{xc}(r, t)}{\delta \eta(r', t')} \eta^{(1)}(r', t') d^3 r' \end{aligned} \quad (A2.16)$$

Definiendo el Kernel f_{xc} ,

$$f_{xc}(r, t, r', t') = \frac{\delta v_{xc}(r, t)}{\delta \eta(r', t')} \quad (A2.17)$$

utilizando A2.17 y A2.14 y transformando al espacio de frecuencias, la perturbación lineal de la densidad del sistema de Kohn-Sham es:

$$\begin{aligned} \eta^{(1)}(r, t) = & \int \chi_{KS}(r, r', \omega) v^{(1)}(r', \omega) d^3 r' \\ & + \int d^3 x \int \chi_{KS}(r, x, \omega) [w(r, r') + f_{xc}(x, r', \omega)] \eta^{(1)}(r', t) d^3 r' \end{aligned} \quad (\text{A2.18})$$

Mediante A2.13 y A2.18, la función de respuesta lineal del sistema interactuante en el régimen de Kohn-Sham es:

$$\chi_{KS}(r, r', \omega) = \chi_{KS}(r, r', \omega) + \int d^3 x \int \chi(r, x, \omega) [w(r, r') + f_{xc}(x, r', \omega)] \chi_{KS}(x', r', \omega) d^3 x' \quad (\text{A2.19})$$

La ecuación A2.19 es formalmente la representación exacta de la función de respuesta lineal en el sentido de que si disponemos del potencial exacto de Kohn-Sham, con la solución autoconsistente de A2.19 se obtiene la función de respuesta χ del sistema interactuante.

Es conveniente escribir a la función de respuesta A2.19 en términos de la representación de Lehman [120]:

$$\chi_{KS}(r, r', \omega) = \lim_{\eta \rightarrow +0} \sum_m \frac{\langle \int \Psi_0 \hat{n}(r) \Psi_m d\tau \rangle \langle \int \Psi_0 \hat{n}(r) \Psi_m d\tau \rangle}{\omega - (E_m - E_0) + i\eta} - \frac{\langle \int \Psi_0 \hat{n}(r') \Psi_m d\tau \rangle \langle \int \Psi_0 \hat{n}(r') \Psi_m d\tau \rangle}{\omega - (E_m - E_0) + i\eta} \quad (\text{A2.20})$$

en donde Ψ_0 es la función del estado fundamental y $\{\Psi_m\}$ es el conjunto completo de estados con energía E_m . La expresión A2.20 para la función de respuesta tiene polos en las frecuencias correspondientes a las excitaciones electrónicas del sistema interactuante:

$$\Omega = E_m - E_0 \quad (\text{A2.21})$$

Dado que el potencial externo no tiene polos, esto implica que $\eta^{(1)}(r')$ tiene polos en las excitaciones electrónicas del sistema. En el mismo sentido la densidad de respuesta lineal del sistema Kohn-Sham tiene polos en las excitaciones del sistema sin interacciones electrón-electrón:

$$\Delta \mathcal{E} = \varepsilon_j - \varepsilon_k \quad (\text{A2.22})$$

Debido a esta estructura de polos, es posible realizar una expansión de la función de respuesta en series de Laurent alrededor de las energías de excitación:

$$\chi_{KS}(r, r', \omega) = \lim_{\eta \rightarrow +0} \sum_{jk} (f_k - f_j) \frac{\varphi_{j0}(r) \varphi_{j0}^*(r') \varphi_{k0}(r') \varphi_{k0}^*(r)}{\omega - (\varepsilon_j - \varepsilon_k) + i\eta} + \text{órdenes superiores} \quad (\text{A2.23})$$

Despreciando los términos de orden superior, se obtiene la aproximación monopolar a las energías de excitación (SPA, por sus siglas en ingles) [120]:

$$\Omega = \Delta\varepsilon + K(\Delta\varepsilon) \quad (\text{A2.24})$$

Siendo $K(\Delta\varepsilon)$ una corrección dada por:

$$K(\Delta\varepsilon) = 2 \int \int \varphi_{j0}(r) \varphi_{j0}^*(r') \varphi_{k0}(r') \varphi_{k0}^*(r) \times [w(r, r') + f_{xc}(x, r', \Delta\varepsilon)] d^3r d^3r' \quad (\text{A2.25})$$

Se ha documentado que mediante la SPA se obtienen energías de excitación comparables a las experimentales tanto para átomos como para moléculas.

Espectroscopia electrónica; Fuerza del oscilador

Cuando una transición electrónica ocurre en una molécula, los núcleos son sometidos a un cambio en la fuerza Coulómbica, como resultado de la redistribución electrónica que acompaña a la transición. En consecuencia, los núcleos sufren un cambio en sus modos vibracionales, por lo que un espectro de absorción electrónico de una molécula genera un conjunto característico de niveles de energía vibracionales asociados a cada transición. Un estado vibracional y electrónico específico es denominado estado vibrónico [122].

Dado que la masa del electrón es muy pequeña respecto a la del núcleo, la transición electrónica ocurre dentro de un marco de núcleos fijos. Por tanto, las posiciones nucleares permanecen inalteradas durante la transición, pero sufren una redistribución, una vez que los electrones adoptan la nueva configuración. En consecuencia, la molécula posee otra curva de energía potencial la cual se encuentra en un nivel más alto en energía, en relación al estado no excitado. En estos términos, durante la transición electrónica las distancias

internucleares permanecen prácticamente inalteradas, por lo que en el instante posterior a la transición, la molécula no se encuentra en un mínimo de su superficie de energía potencial (del estado excitado). Este tipo de transiciones son denominadas verticales [122].

El principio de Franck-Condon establece que una transición desde el estado electrónico más bajo en su respectivo estado vibracional, ocurre hacia el estado electrónico excitado, cuyo estado vibracional sea el que más se asemeje al del estado fundamental [123].

La descripción mecánico-cuántica de la transición vibrónica se basa en la evaluación del momento dipolar de transición entre el estado vibrónico fundamental y un estado vibrónico más alto en energía [122,123]. El operador del momento dipolar eléctrico de una molécula depende de la distribución de cargas nucleares y electrónicas:

$$\hat{\mu} = -e \sum_i r_i + \sum_{\alpha} Z_{\alpha} R_{\alpha} = \hat{\mu}_e + \hat{\mu}_N \quad (\text{A2.26})$$

Dentro de la aproximación Born-Oppenheimer el estado vibrónico está descrito por la función de onda $\Psi(r, R) = \Psi_{\varepsilon}(r; R) \Psi_{\nu}(R)$ donde r y R denotan las coordenadas electrónicas y nucleares respectivamente, mientras que $\Psi_{\varepsilon}(r; R)$ es la función electrónica y $\Psi_{\nu}(R)$ la función nuclear. La transición desde un estado electrónico ε en su estado vibracional ν , hasta el estado electrónico ε' en su estado vibracional ν' es:

$$\begin{aligned} \int \Psi(r, R) \hat{\mu} \Psi'(r, R) d\tau &= \int \int \Psi_{\varepsilon}^*(r; R) \Psi_{\nu}^*(R) (\hat{\mu}_e + \hat{\mu}_N) \Psi_{\varepsilon}'(r; R) \Psi_{\nu}'(R) d\tau_{\varepsilon} d\tau_N \\ \int \Psi(r, R) \hat{\mu} \Psi'(r, R) d\tau &= \int \Psi_{\nu}^*(R) \Psi_{\nu}'(R) \left\langle \int \Psi_{\varepsilon}^*(r; R) \hat{\mu}_e \Psi_{\varepsilon}'(r; R) d\tau_{\varepsilon} \right\rangle d\tau_N \\ &+ \int \Psi_{\nu}^*(R) \hat{\mu}_N \Psi_{\nu}'(R) \left\langle \int \Psi_{\varepsilon}^*(r; R) \Psi_{\varepsilon}'(r; R) d\tau_{\varepsilon} \right\rangle d\tau_N \quad (\text{A2.27}) \end{aligned}$$

Las funciones de onda $\Psi_{\varepsilon}(r; R)$ y $\Psi_{\varepsilon}'(r; R)$ (del estado vibrónico fundamental y del estado vibrónico excitado, respectivamente) son funciones propias del Hamiltoniano electrónico, con diferente valor propio y por tanto, son ortogonales entre sí, por tanto, la segunda integral en A2.27 desaparece. En estas circunstancias el momento dipolar de transición se expresa como:

$$\int \Psi \rho \Psi' d\tau = \int \Psi_v^*(R) \Psi_v'(R) \left\langle \int \Psi_\varepsilon^*(r; R) \mu_\varepsilon \Psi_\varepsilon'(r; R) d\tau_\varepsilon \right\rangle d\tau_N \quad (\text{A2.28})$$

La integral $\int \Psi_v^*(R) \Psi_v'(R) d\tau_N$ en A2.28 corresponde al traslape entre dos estados vibrónicos particulares. La transición entre los momentos dipolares de dos estados vibrónicos será más intensa mientras mayor sea dicho traslape. El cuadrado de la integral de traslape ente dos estados vibrónicos es conocido como factor de **Franck-Condon**.

Así mismo, la integral entre corchetes en A2.28 es proporcional a la intensidad de una transición electrónica. En términos de está integral se define a la fuerza del oscilador f , como la relación entre la probabilidad para que se lleve a cabo la transición electrónica en cuestión, respecto a la probabilidad de una transición de referencia correspondiente a la de un oscilador isotrópico tridimensional en la que uno de los números cuánticos vibracionales v_x o v_y o v_z , cambia de 0 a 1. El oscilador se considera armónico, con carga y masa igual a la del electrón y frecuencia vibracional igual a la frecuencia de la transición electrónica en cuestión. La fuerza del oscilador tiene la siguiente expresión [123]:

$$f = \frac{8\pi^2 \nu m_e}{3he^2} \int \Psi_\varepsilon^*(r; R) \mu_\varepsilon \Psi_\varepsilon'(r; R) d\tau_\varepsilon \quad (\text{A2.29})$$

Donde m_e es la masa del electrón, ν la frecuencia asociada a la transición y h la constante de Planck. Entre mayor es la fuerza del oscilador asociada a una transición entre dos niveles electrónicos, más intensa esta será.

Es posible relacionar a la fuerza del oscilador con el coeficiente de absortividad molar A asociado a alguna transición electrónica específica [124]:

$$f = \left(\frac{4cm_e \varepsilon_0}{N_A e^2} \right) A \quad (\text{A2.30})$$

siendo c la velocidad de la luz, ε_0 la permisividad eléctrica del vacío y N_A el número de Avogadro. Asignándole su valor respectivo a cada constante fundamental, la relación entre la fuerza del oscilador y el coeficiente de absortividad molar puede expresarse como:

$$f = 6.257 \times 10^{-19} A (m^2 mol^{-1} s^{-1}) \quad (\text{A2.31})$$

Apéndice 3: Marco teórico de los desplazamientos químicos de Resonancia Magnética Nuclear.

La Resonancia Magnética Nuclear corresponde a una respuesta de las moléculas (y sólidos) magnéticamente activas; principalmente de aquellas que presentan momento angular de espín neto diferente de cero. El momento angular de espín de una partícula (cargada) le confiere un momento magnético.

Por tanto, cuando un núcleo no posee un número par tanto de protones como de neutrones, los espines de las partículas en el núcleo no se cancelan, por lo que este tendrá momento magnético asociado, el cual es proporcional a su momento angular de espín:

$$\mu = \gamma_N \hat{M} \quad (\text{A3.1})$$

siendo μ el momento magnético, \hat{M} el momento angular de espín y γ_N la relación giromagnética nuclear, la cual es específica para cada tipo de núcleo. Dado que los posibles valores propios del momento angular de espín son $\hat{M} = \hbar m_s$ con $m_s = +1/2$ (α) y $m_s = -1/2$ (β), el momento magnético nuclear está dado por $\mu = \gamma_N \hbar m_s$. Así mismo, la energía E de un momento magnético μ en un campo magnético externo B es $E = \mu B$ [124]; por tanto, es posible obtener la energía de un estado particular de espín en un campo magnético mediante:

$$E = \gamma_N \hbar m_s B; \quad E_\alpha = \gamma_N \hbar \alpha B \quad E_\beta = \gamma_N \hbar \beta B \quad (\text{A3.2})$$

En ausencia del campo, los estados con diferente espín están degenerados, pero en presencia de este, la degeneración es removida. En estas circunstancias, la brecha de energía entre los estados de espín es:

$$\Delta E = E_\alpha - E_\beta = (1/2)\gamma_N \hbar B - (-1/2)\gamma_N \hbar B = \gamma_N \frac{\hbar}{2\pi} B = h\nu \quad (\text{A3.3})$$

De donde se obtiene:

$$\nu = \gamma_N \frac{B}{2\pi} \quad (\text{A3.4})$$

En A3.4, ν es denominada frecuencia de **resonancia** [125] y determina la energía electromagnética necesaria para realizar la transición entre los niveles de espín nucleares.

Un efecto adicional del campo magnético externo, es que este perturba el momento angular orbital de los electrones, lo que genera una corriente electrónica la cual produce un campo magnético inducido adicional B_{ind} (Figura A3.2). Cuando el campo magnético aplicado es homogéneo y la molécula irradiada se encuentra en libre rotación (estado gaseoso o líquido), la relación del campo aplicado (externo) con el inducido es $B_{ind} = -\sigma B_{apl}$, siendo σ la **constante de apantallamiento**. Por tanto, el campo que experimenta un núcleo a nivel local es:

$$B_{loc} = -\sigma B_{apl} + B_{apl} = B_{apl}(1 - \sigma) \quad (\text{A3.5})$$

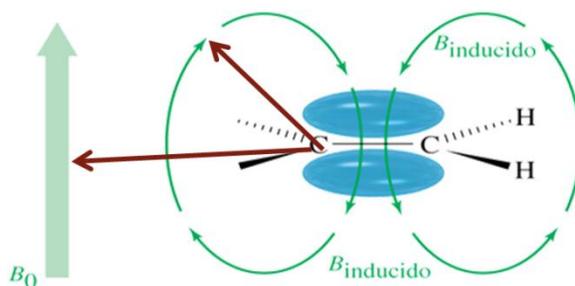


Figura A3.2. Representación del campo electrónico inducido por la aplicación de un campo magnético externo sobre una molécula de etileno.

La frecuencia de resonancia de un núcleo que experimenta el efecto de los campos magnéticos aplicado e inducido, puede expresarse en términos de la constante de apantallamiento σ :

$$\nu = \gamma_N \frac{B_{loc}}{2\pi}$$

$$\nu = \gamma_N \frac{B_{apl}}{2\pi} (1 - \sigma) \quad (\text{A3.6})$$

Dado que la relación giromagnética γ_N es una constante para cada núcleo y que la magnitud del campo externo es una propiedad impuesta, será posible establecer la frecuencia de resonancia, una vez que la constante de apantallamiento sea determinada. No obstante, para obtener el valor de dicha constante es necesario conocer la estructura electrónica de la molécula, así como determinar cómo el campo magnético aplicado modifica a dicha estructura.

Adicionalmente, dado que por lo general la estructura electrónica de una molécula es no homogénea, cada núcleo (sin importar que se trate del mismo elemento), tendrá un valor distinto de constante de apantallamiento, así como una frecuencia de resonancia específica:

$$\nu_i = \gamma_N \frac{B_{apl}}{2\pi} (1 - \sigma_i) \quad (\text{A3.7})$$

Para formular los operadores correspondientes a la perturbación del campo magnético sobre la estructura electrónica de la molécula, es conveniente expresar al campo magnético B_{tot} en términos de su vector potencial A_{tot} [126]

$$B_{tot} = \nabla \times A_{tot} \quad (\text{A3.8})$$

En primera instancia es necesario considerar que la inducción de un flujo de electrones por influencia del campo magnético externo implica un cambio en la energía cinética de dichos electrones. Para representar este efecto, se formula un operador de energía cinética distinto al de una molécula en ausencia del campo; este operador es denominado operador de momento cinético [127] y tiene la siguiente expresión:

$$\hat{\pi} = -\nabla_i + A_{tot} \quad (\text{A3.9})$$

Considerando el operador de momento cinético, el Hamiltoniano electrónico de una molécula en un campo magnético es:

$$\hat{H} = \frac{\hat{p}_i^2}{2} + \hat{V} \quad (\text{A3.10})$$

donde \hat{V} representa las interacciones electrostáticas electrón-electrón y electrón-núcleo.

Así mismo, dado que la presencia del campo magnético aplicado remueve la degeneración de los estados de espín nucleares, el momento magnético asociado al momento angular de espín de cada uno de los núcleos también induce el flujo de electrones. Por tanto, el vector potencial A_{tot} , debe contener ambas contribuciones; $A_{tot} = A_{apl} + A_N$, donde A_{apl} es el vector potencial del campo magnético aplicado (externo) y $A_N = \sum_K A_K$ es el vector potencial asociado al campo magnético generado por el momento magnético de cada uno de los K núcleos (magnéticamente activos) de la molécula. Contemplando estos efectos, el Hamiltoniano electrónico perturbado por el campo magnético aplicado y el generado por los momentos magnéticos nucleares es:

$$\begin{aligned} \hat{H} &= \left(\frac{1}{2} \right) \left[p^2 + \hat{p}eA + (eA)^2 + \hat{p}eA_N + e^2AA_N + (eA_N)^2 \right] + V \\ \hat{H} &= H_o + \frac{1}{2} \hat{p}eA + \frac{1}{2} (eA)^2 + \sum_K \frac{1}{2} \hat{p}eA_K + \sum_K \frac{1}{2} e^2AA_K + \sum_K \sum_{K \neq L} \frac{1}{2} e^2A_KA_L \\ \hat{H} &= \hat{H}_0 + \hat{H}_{10} + \hat{H}_{20} + \sum_K \hat{H}_{01_k} + \sum_K \hat{H}_{11_k} + \sum_K \sum_{K \neq L} \hat{H}_{02_{KL}} \end{aligned} \quad (\text{A3.11})$$

Recurriendo a la teoría de perturbaciones independiente del tiempo para estados no degenerados se tiene:

$$\begin{aligned} E &= E_0 + E_{10} + E_{20} + \sum_K E_{01_k} + \sum_K E_{11_k} + \sum_K \sum_{K \neq L} E_{02_{KL}} \\ \varphi &= \varphi_0 + \varphi_{10} + \varphi_{20} + \sum_K \varphi_{01_k} + \sum_K \varphi_{11_k} + \sum_K \sum_{K \neq L} \varphi_{02_{KL}} \end{aligned} \quad (\text{A3.12})$$

donde E_0 es la energía del sistema no perturbado, E_{10} corresponde a la perturbación de primer orden en el campo magnético aplicado y de orden cero en los momentos magnéticos nucleares, E_{20} es la perturbación de segundo orden debida al campo magnético aplicado y de orden cero debida a los momentos magnéticos nucleares, E_{01} es el conjunto de

perturbaciones de primer orden debidas al momento magnético de cada uno de los K núcleos, E_{11} son el conjunto de perturbaciones debidas al campo magnético aplicado y al momento magnético de cada uno de los núcleos, y E_{02} es el conjunto de perturbaciones de segundo orden debidas al momento magnético de cada uno de los núcleos en la molécula. La contribución de las perturbaciones de orden mayor a dos son despreciables [127]. La energía de cada perturbación tiene la siguiente expresión:

$$\begin{aligned}
 E_0 &= \int \varphi_0 \hat{H}_0 \varphi_0 d\tau \\
 E_{10} &= \int \varphi_0 \hat{H}_{01} \varphi_0 d\tau \\
 E_{20} &= \int \varphi_0 \hat{H}_{20} \varphi_0 d\tau - \sum_{n,m=0,1;\forall n+m>0} \left\langle \int \varphi_0 \hat{H}_{10} \varphi_{nm} d\tau \right\rangle \left\langle \int \varphi_{nm} \hat{H}_{10} \varphi_0 d\tau \right\rangle \\
 E_{01_k} &= \int \varphi_0 \hat{H}_{01_k} \varphi_0 d\tau \\
 E_{11_k} &= \int \varphi_0 \hat{H}_{11_k} \varphi_0 d\tau - 2 \left[\sum_{n,m=0,1;\forall n+m>0} \left\langle \int \varphi_0 \hat{H}_{10} \varphi_{nm} d\tau \right\rangle \left\langle \int \varphi_{nm} \hat{H}_{01_k} \varphi_0 d\tau \right\rangle \right] \\
 E_{02_k} &= \int \varphi_0 \hat{H}_{02_k} \varphi_0 d\tau - 2 \left[\sum_{n,m=0,1;\forall n+m>0} \sum_L \left\langle \int \varphi_0 \hat{H}_{01_k} \varphi_{nm} d\tau \right\rangle \left\langle \int \varphi_{nm} \hat{H}_{01_L} \varphi_0 d\tau \right\rangle \right] \quad (A3.13)
 \end{aligned}$$

Si la molécula no posee electrones desapareados, se demuestra que tanto E_{10} como E_{01} son iguales a cero [127]. En esta situación, la energía de la molécula en un campo magnético es:

$$E = E_0 + E_{20} + E_{11} + E_{02} \quad (A3.14)$$

Para identificar a cada contribución de la energía (perturbada), expandimos dicha energía como una serie de potencias en términos del campo aplicado y de los momentos magnéticos nucleares (que son los dos tipos de perturbaciones):

$$E = E_0 + \frac{1}{2} B_{apl} E_{20} B_{apl} + \sum_K B_{apl} E_{11} \mu_K + \frac{1}{2} \sum_K \sum_{K \neq L} \mu_K E_{02} \mu_L + \dots \quad (A3.15)$$

en donde:

$$E_{20} = \frac{d^2 E(B, M)}{dB^2} \quad E_{11} = \frac{d^2 E(B, M)}{dB dM_K} \quad E_{02} = \frac{d^2 E(B, M)}{dM_K dM_L} \quad (A3.16)$$

Cada una de estas derivadas parciales está relacionada con algunas propiedades magnéticas moleculares, las cuales discutiremos a continuación.

Propiedades Magnéticas Moleculares.

Existen propiedades relacionadas con la respuesta de una molécula (en este caso considerando sólo moléculas de capa cerrada) a un campo magnético aplicado. Estas propiedades están definidas en términos de las segundas derivadas A3.16, por lo que se les conoce como propiedades de respuesta de segundo orden. Una de estas propiedades es la susceptibilidad magnética χ la cual representa la facilidad de una molécula para magnetizarse (inducirle dipolos magnéticos) en presencia de un campo magnético externo, independientemente si ésta posee dipolos magnéticos permanentes. Otra propiedad de importancia es la constante de apantallamiento σ , de la cual ya hemos discutido. Finalmente, las constantes de acoplamiento J están relacionada con el acoplamiento entre el momento magnético de cada uno de los núcleos de la molécula, generados por la interacción de su momento angular de espín con el campo magnético aplicado. Por tanto, cada propiedad está relacionada con los distintos acoplamientos (por pares) entre el campo magnético aplicado, el campo magnético generado por los núcleos y el momento angular orbital de los electrones. Para establecer las expresiones relacionadas a cada una de estas propiedades, es necesario realizar un análisis de la energía asociada a cada acoplamiento.

El primer acoplamiento a considerar es el relacionado con el momento angular orbital y el campo magnético aplicado, el cual induce el flujo electrónico. La energía relacionada a la inducción de un dipolo mediante una inducción magnética β , en donde dicha inducción se incrementa desde 0 hasta β , es $E = -\frac{1}{2}\xi \cdot \beta^2$; siendo ξ la magnetizabilidad de la molécula.

Adicionalmente, considerando que la relación entre la inducción magnética y el campo aplicado es $\beta = \lambda B_{apl}$ con λ como la permisividad magnética del medio, la energía de inducción es:

$$E = -\frac{1}{2}\xi\lambda^2 B_{apl}^2 \quad (\text{A3.17})$$

Para una molécula en libre rotación, la permisividad y la magnetizabilidad de la molécula, dan origen a la susceptibilidad magnética χ , en donde si dicha susceptibilidad es lo suficientemente pequeña ($\chi \ll 1$), ésta puede obtenerse mediante $\chi = \xi\lambda_0$, siendo λ_0 la permisividad magnética del vacío. Utilizando esta igualdad y la ecuación A3.17, la energía de inducción de un campo sobre una molécula puede expresarse como:

$$E = \frac{1}{2} B_{apl} \chi B_{apl} \quad (\text{A3.18})$$

El segundo acoplamiento corresponde a la interacción de los momentos magnéticos nucleares con el campo total, para lo cual debemos considerar la energía de un dipolo magnético en un campo: $E = -\mu \cdot B$, por tanto, la energía de la interacción entre los dipolos magnéticos nucleares y el campo es:

$$E = -\mu \cdot B \quad E = -\mu \cdot B_{loc} = -\mu(1 - \sigma) B_{apl} \quad (\text{A3.19})$$

en donde hemos utilizado A3.5, siendo σ la constante de apantallamiento.

Respecto al acoplamiento núcleo-núcleo, el acoplamiento directo D_{KL} entre los momentos magnéticos nucleares desaparece para moléculas en libre rotación, no obstante, la presencia de los electrones genera un acoplamiento adicional, denominado acoplamiento indirecto reducido núcleo-núcleo. Este acoplamiento se debe principalmente a que mientras el momento magnético de espín de un núcleo favorece una orientación de espín de un electrón en un orbital particular, el otro electrón el cual posee la orientación opuesta de espín respecto al primer electrón, favorecerá cierta orientación del espín nuclear de algún otro núcleo cercano. La energía de acoplamiento núcleo-núcleo de una molécula en libre rotación tiene la siguiente expresión.

$$E = \frac{1}{2} \mu_K (J_{KL} + D_{KL}) \mu_L = \frac{1}{2} \mu_K J_{KL} \mu_L \quad (\text{A3.20})$$

siendo J_{KL} la constante de acoplamiento indirecto núcleo-núcleo. Sumando las contribuciones a la energía A3.18, A3.19 y A3.20 tenemos:

$$E = E_0 + \frac{1}{2} B_{apl} \chi B_{apl} - \sum_K B_{apl} (1 - \sigma_K) \mu_K + \frac{1}{2} \sum_K \sum_{K \neq L} \mu_K J_{KL} \mu_L \quad (\text{A3.21})$$

Comparando A3.13, A3.16 y A3.21, obtenemos las expresiones para cada una de las propiedades de respuesta de una molécula en un campo magnético:

$$\begin{aligned} \chi &= \frac{d^2 E(B, M)}{dB^2} = \int \varphi_0 \hat{H}_{20} \varphi_0 d\tau - \sum_{n,m=0,1; \forall n+m>0} \left\langle \int \varphi_0 \hat{H}_{10} \varphi_{nm} d\tau \right\rangle \left\langle \int \varphi_{nm} \hat{H}_{10} \varphi_0 d\tau \right\rangle \\ \sigma_K &= \frac{d^2 E(B, M)}{dB dM_K} + 1 = \int \varphi_0 \hat{H}_{11_K} \varphi_0 d\tau - 2 \left[\sum_{n,m=0,1; \forall n+m>0} \left\langle \int \varphi_0 \hat{H}_{10} \varphi_{nm} d\tau \right\rangle \left\langle \int \varphi_{nm} \hat{H}_{01_K} \varphi_0 d\tau \right\rangle \right] + 1 \\ J_{KL} &= \frac{d^2 E(B, M)}{dM_K dM_L} = \int \varphi_0 \hat{H}_{02_K} \varphi_0 d\tau - 2 \left[\sum_{n,m=0,1; \forall n+m>0} \sum_L \left\langle \int \varphi_0 \hat{H}_{01_K} \varphi_{nm} d\tau \right\rangle \left\langle \int \varphi_{nm} \hat{H}_{01_L} \varphi_0 d\tau \right\rangle \right] \end{aligned} \quad (\text{A3.22})$$

Problema de Gauge

Existe un aspecto de gran relevancia a discutir en el cálculo de las propiedades de respuesta mediante las funciones de onda (aproximadas) comúnmente utilizadas en el cálculo de estructura electrónica de moléculas. Hemos expresado al Hamiltoniano A3.11 en términos del vector potencial del campo magnético \mathbf{A} , no obstante, es posible obtener una expresión para dicho Hamiltoniano en términos del campo magnético \mathbf{B} asociado a cada vector potencial. No obstante, la inversa de la ecuación A3.8 no es única, ya que es posible agregar el gradiente de una función escalar arbitraria ∇f sin afectar la validez de A3.8 $\mathbf{B} = \nabla \times (\mathbf{A} + a \nabla f)$, siendo a una constante también arbitraria (esto se debe a que el rotacional del gradiente de cualquier función escalar es igual a cero $\nabla \times \nabla f = 0$, mientras que la del vector potencial, que es una función vectorial, es diferente de cero $\nabla \times \nabla A \neq 0$). Una posible expresión para el vector potencial para un campo magnético homogéneo, es [126]:

$$A_{apl} = \frac{1}{2} B_{apl} \times (r - R) \quad (A3.23)$$

donde R es un punto fijo en el espacio denominado “gauge origin” (indicador del origen), con el cual, el vector potencial es arbitrario solo en la elección de dicho punto. En contraparte, el campo magnético generado por los momentos magnéticos nucleares no es homogéneo y el vector potencial asociado a los momentos magnéticos nucleares no puede expresarse en términos de la ecuación A3.23. La forma del vector potencial nuclear es la siguiente (ver referencia [127] para demostración):

$$A_N = \frac{\mu_N \times (r - \wp_N)}{|r - \wp_N|^3} \quad (A3.24)$$

En donde el origen del gauge para A_N es \wp_N que corresponde a la posición del núcleo en el espacio tridimensional.

Insertando A3.23 y A3.24 en A3.11 obtenemos el Hamiltoniano electrónico en términos del campo magnético aplicado y de los momentos magnéticos nucleares:

$$\begin{aligned} \hat{H} = & \hat{H}_0 + \hat{B}_{apl}(r - R)\hat{B}_{apl}(r - R) + \sum_k \hat{\mu}_K(r - R)\hat{B}_{apl} \frac{(r - \wp_N)}{|r - \wp_N|^3} \\ & + \frac{1}{2} \sum_K \sum_{K \neq L} \hat{\mu}_K \left[\frac{(r - \wp_{N_K})}{|r - \wp_{N_K}|^3} \right] \hat{\mu}_L \left[\frac{(r - \wp_{N_L})}{|r - \wp_{N_L}|^3} \right] \end{aligned} \quad (A3.25)$$

donde cada sumando de A3.25, corresponde a un término perturbativo del Hamiltoniano electrónico en un campo magnético:

$$\begin{aligned} \hat{H}_{20} = & \hat{B}_{apl}(r - R)\hat{B}_{apl}(r - R) \\ \hat{H}_{11} = & \sum_k \hat{\mu}_K(r - R)\hat{B}_{apl} \frac{(r - \wp_N)}{|r - \wp_N|^3} \\ \hat{H}_{02} = & \frac{1}{2} \sum_K \sum_{K \neq L} \hat{\mu}_K \left[\frac{(r - \wp_{N_K})}{|r - \wp_{N_K}|^3} \right] \hat{\mu}_L \left[\frac{(r - \wp_{N_L})}{|r - \wp_{N_L}|^3} \right] \end{aligned} \quad (A3.26)$$

La suma de estos tres términos es comúnmente denominada Hamiltoniano de espín (para moléculas con electrones desapareados, el Hamiltoniano de espín contiene también los términos asociados al acoplamiento del momento magnético de los electrones con el campo, con el momento magnético de los núcleos y el acoplamiento magnético electrón-electrón).

Debido a A3.25, las propiedades de respuesta dadas en términos de las ecuaciones A3.22 son válidas si se dispone de la función de onda exacta del sistema, ya que ésta no depende del origen de gauge seleccionado; sin embargo, esta invariancia no está garantizada cuando se utilizan funciones de onda aproximadas. En principio hay dos maneras de tratar este inconveniente: resolver la ecuación de Schrödinger con un Hamiltoniano A3.11, lo más preciso posible, lo que implica acercarse a la aproximación de la expansión infinita en la función de onda; o por otro lado, encontrar un origen de gauge óptimo en el cual el error respecto a la solución exacta sea lo más pequeño posible. Puede demostrarse [127] que el cambio en el origen de gauge en el Hamiltoniano \hat{H} , desde R hasta R' es equivalente a la transformación unitaria (transformación de Gauge):

$$\hat{H} \rightarrow \hat{H}' = U^+ \hat{H} U \quad U = \exp(i\Lambda) \quad \Lambda = B \times (R' - R) \cdot R \quad (\text{A3.27})$$

Con los vectores propios de \hat{H}' expresados como:

$$\varphi(B, r) = \exp[i(B \times (R' - R) \cdot R)] \varphi(r) \quad (\text{A3.28})$$

siendo $\varphi(r)$ un vector propio de \hat{H} . Una formulación ampliamente utilizada para construir los vectores $\varphi(B, r)$ para funciones de onda aproximadas como combinación lineal de funciones de un cuerpo, es agregar el factor exponencial $\exp[i(B \times (R' - R) \cdot R)]$ a cada orbital atómico utilizado en la expansión. El origen de gauge de cada orbital atómico se escoge en la posición de su núcleo respectivo. Los orbitales así construidos se denominan orbitales de London y a la aproximación, como Orbitales Invariantes a la Transformación de Gauge o Gauge Invariant Atomic Orbitals (GIAO) [128]. Un orbital de London tiene la siguiente forma:

$$\chi(B, r) = \exp[i(B \times (R' - R) \cdot R)] \chi(r) \quad (\text{A3.29})$$

Donde $\chi(B, r)$ es el orbital de London y $\chi(r)$ es un orbital atómico. Particularmente, el uso de orbitales de London mejora la predicción de las constantes de apantallamiento de varios tipos de moléculas [99,100,112,113], por lo que el método GIAO es muy utilizado en este tipo de cálculos.

Bibliografía

- [1] Ho, J.; Coote, M. L. *Theor. Chem. Acc.* **2010**, 125, 3-21.
- [2] Hawkey, C.J *Lancet* **1999**, 353, 307-314
- [3] Wiseman, E. H. y Lombardino, J.G. in *Chronicles of Drug Discovery Cap. 8* (eds Bindra, J.S. y Lednicer, D.), J. Wiley and Sons. Inc, New York: **1982**,173-200.
- [4] Joseph G. Lombardino and John A. Lowe III, The role of the Medicinal Chemist in Drug Discovery, *Nature Reviews* **2004**, 3, 853-862.
- [5] Donna O. Carpenter, *Pharmacist's Drugs Handbook*, Springhouse corporation and American Society of Health, North Carolina, **2001**, 919-933.
- [6] Barracchini A, Franceschini N, Amicosante G, Oratore A, Minisola G, Pantaleoni G, Di Giulio A. *J Pharm Pharmacol.* **1998**, 12, 1417-1423.
- [7] Bianchi, M.; Panerai, A. E. *Pharm. Res.* **2002**, 45, 101-105.
- [8] Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE (February 2007) *Clin. Exp. Immunol.* **2007**, 147, 227-235.
- [9] Cotran; Kumar, Collins. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. W.B Saunders Company, Philadelphia: **1998**.
- [10] Smith, W. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1997**, 400B, 989-1011.
- [11] Vane, J. R. *Nature*, **1971**, 232-235.
- [12] Vane, J.R. *Am. J. Med.* **1998**, 104, 2S-8S.
- [13] Grossman, E.M.; Longo, W.E.; Panesar, N.; Mazuski, J.E.; Kaminski, D.L. *Carcinogenesis* **2000**, 21, 1403-1409.
- [14] Goldman, A.P. ; Williams, C.S.; Sheng, H.; Lamps, L.W.; William, V.P.;Pairet, M.; Morrow, J.D.; DuBois, R.N. *Carcinogenesis* **1998**, 19, 2195-2199.
- [15] Lúcio, M.; Ferreira, H.; L.F.C. Lima, J.; Reis, S.; *Anal. Chim. Acta* **2007**, 597, 163-170.
- [16] Van Antwerpen, P.; Dufasne, F.; Lequeux, M.; Boudjeltia, K. Z.; Lessgyer, I.; Babar, S.; Moreau, P.; Moguilevsky, N.; Vanhaeverbeek, M.; Ducobu, J.; Nève, J.; *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, 570, 235-243.

- [17] Magalhes, L. M.; Segundo, M. A.; Reis, S. L. F. C. Lima, J.; Manuel Estela, J.; Cerd, V. *Anal. Chem.*, **2007**, 79, 3933-3939.
- [18] Bayerl, C.; Pagung, R.; Jung, E.G. *Photodermatol.Photoimmunol. Photomed.* **1998**, 14, 167-169.
- [19] Bordner, J.; Hammen, P.D.; Whipple, E.B. *J. Am. Chem.Soc.* **1989**, 111, 6572-6578.
- [20] Geckle, J.M.; Rescek, D.M.; Whipple, E.B. *Magn. Resonance Chem.* **1989**, 27, 150-154.
- [21] K. F. de Souza, J. A. Martins, F. B.T. Pessine, R. Custodio, *Spectrochim. Acta A* 75 (2010) 901–907. de Souza, K. F. ; Martins, J. A.; Pessine, F. B.T.; Custodio, R. *Spectrochim. Acta A* 2010, 75, 901-907 R.B. Alencastro, M.D.M. Neto, *Int. J.Quantum Chem.* **1995**, 56, 123-136.
- [22] Murray, R., *Anal. Chem.* **1995**, 67, 462a.
- [23] Oxford Dictionary of Biochemistry, <http://www.answers.com/topic/macroscopic-equilibrium-constant>.
- [24] Takacs-Novak, K.; Kokosi, J.; Podanyi, B.; Noszal, B.; Tsai, R.-S.; Lisa, G.; Carrupt, P.-A.; Testa, B. *Helv. Chim. Acta* **1995**, 78, 553-562.
- [25] Skoog D. A.; West S.M. *Fundamentos de química analítica*, Thompson Learning, México D.F., **2005**, pp 373-391.
- [26] Legget, D.J.; McBryde, W.A.E. *Anal. Chem.* **1975**, 47, 1065-1083.
- [27] Legget, D.J. *Computational Methods for Determination of Formation Constants*, Plenum Press, New York, **1985**.
- [28] Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Talanta* **1996**, 43, 1739-1753.
- [29] Frassinetti, Ch.; Ghelli, S.; Gans, P.; Sabatini, A.; Moruzzi, M. S.; Vacca, A. *Anal. Biochem.* **1995**, 231, 374–382.
- [30] Takács-Novák, K.; Tam, K. Y. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* **2000**, 21, 1171–1182
- [31] Macomber R. S. *A Complete Introduction to Modern NMR Spectroscopy*, John Wiley and Sons, Canada, **1998**, pp 158-172.
- [32] Skoog, D. A.; Holler, F. H.; Nieman, T. A. *Principios de Análisis Instrumental 5^{ta} edición*, Mc Graw Hill, Madrid, **1992** pp. 322-330.

- [33] R. S. Tsai, P.-A. Carrupt, N. el Tayar, Y. Giroud, P. Andrade, B. Testa, F. Brée, J.-P. Tillement, *Helv. Chim.* **1993**, 76, 842-854.
- [34] Rodriguez-Barrientos, D.; Rojas-Hernandez, A.; Gutierrez, A.; Moya-Hernandez, R.; Gomez-Balderas, R.; Ramirez-Silva, M. T. *Talanta* **2009**, 80, 754-762.
- [35] Luger, P.; Daneck, K.; Engel, W.; Trummlitz, G.; Wagner, K. *Eur. J. Pharm Sci.* **1996**, 4, 175-187.
- [36] Kóczyán, K.; Völgyi, G.; Kökösi, J.; Noszál, B. *Helv. Chim. Acta* **2007**, 90, 1681–1690.
- [37] Pliego, J. R. *Chemical Physics Letters* **2003**, 367, 145–149.
- [38] Ho, J.; Coote, M. L. *Theor. Chem. Acc.* **2010**, 125, 3–21.
- [39] Silva, C. O.; da Silva, E. C.; Nascimento, M. A. C. *J. Phys. Chem. A* **2000**, 104, 2402-2409.
- [40] Franco-Pérez, M.; Reyes-García, L. I.; Moya-Hernández, R.; Gómez-Balderas, R. *Int. J. Quantum Chem.*, **2012**, DOI: 10.1002/qua.24298.
- [41] Ho, J.; Coote, M. L.; Franco-Pérez, M.; Gómez-Balderas R., *J. Phys. Chem. A* **2010**, 114, 11992–12003.
- [42] M. Franco-Pérez, R. Moya-Hernández, A. Rojas-Hernández, A. Gutiérrez, R. Gómez-Balderas, *J. Phys. Chem. B*, **2011**, 115, 13593-13598.
- [43] Zsabo A. Ostlund N. S., *Modern Quantum Chemistry, Introduction to Advanced Electronic Structure*, Dover Publications: Mineola New York, **1996**, pp 39-150.
- [44] Landau L.D.; Lifshitz E.M., *Quantum Mechanics Non-relativistic Theory, Course of theoretical physics*, 3th edition, Pergamon Press, New York, **1991**, pp 25-99.
- [45] Levine I. N., *Química Cuántica*, 5ta edición, Prentice Hall, Madrid, **2001**. pp 217.
- [46] Parr, R. G.; Yang, W. *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*, Oxford University Press: New York, **1989**, pp 169-200.
- [47] Eschrig H. *The Fundamentals of Density Functional Theory*, Teubner Verlagsgesellschaft: Stuttgart-Leipzig, **1996**, pp 74-95.
- [48] Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* 1993, 98, 5648–5652.
- [49] Adamo, C.; Barone, V. *J. Chem. Phys.* **1999**, 110, 6158-6170.

- [50] Cohen, A. J.; Handy, N. C. *Mol. Phys.* **2001**, 99, 607-615.
- [51] Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A., Jr.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. *Gaussian 03*, Revision C.02; Gaussian; Wallingford, CT, 2004.
- [52] Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A., Jr.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; 12002 *J. Phys. Chem. A*, Vol. 114, No. 44, 2010 Ho et al. Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J. *Gaussian 09*, R. A.; Gaussian: Wallingford, CT, 2009.
- [53] David, K.S. ; Hemeryck, A.; Tancrez, N.; Toupet, L.; Williams, J.A.G.; Ledoux, I.; Zyss, J.; Boucekkine, A.; Guégan, J.P.; Bozec, H.L.; Maury, O. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 12243-12255.
- [54] Ciofini, I.; Lainé, P.P.; Bedioui, F.; Adamo, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 10763-10777.
- [55] Tiwary, A.S.; Mukherjee, A.K. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **2008**, 859, 107-112.
- [56] Miao, T.F.; Li, S.; Cai, J. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **2008**, 855, 45-51.
- [57] Adamo, C.; Barone, V. *J. Chem. Phys.* **1999**, 110, 6158-6170.
- [58] Kolev, T.; Stamboliyska, B.; Yancheva D. *Chem. Phys.* **2006**, 324, 489-496.

- [59] Jacquemin, D.; Perpète, E.A.; Scuseria, G.E.; Ciofini, I.; Adamo, C. *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, 4, 123-135.
- [60] Andzelm, J.; Rinderspacher, B. C.; Rawlett, A. M.; Dougherty, J.; Baer, R.; Govind, N. *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, 5, 2835-2846.
- [61] Delchev, V. B. *J. Mol. Model.* **2010**, 16, 749-757.
- [62] Andrade, S. M.; Costa, S. M. B. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1999**, 1, 4213-4218.
- [63] Banerjee, R.; Chakraborty, H.; Sarkar, M. *Spect. Acta Part A* **2003**, 59, 1213-1222.
- [64] Banerjee, R.; Sarkar, M. *J. of Lumin.* **2002**, 99, 255-263.
- [65] Andrade, S. M.; Costa, S. M. B. *Prog., Colloid Polym. Sci.* **1996**, 100, 195-199.
- [66] Andrade, S. M.; Costa, S. M. B.; Pansu, R. *Photochem. Photobiol.* **2000**, 71, 405-412.
- [67] Gil, M.; Douhal, A. *Chem. Phys.* **2008**, 350, 179-185.
- [68] Ernzerhof M. ; Perdew, J. P. *J. Chem. Phys.* **1998**, 109, 3313-3320.
- [69] Francl, M. M.; Pietro, W. J.; Hehre, W. J.; Binkley, J. S.; DeFrees, D. J.; Pople, J. A.; Gordon, M. S. *J. Chem. Phys.* **1982**, 77, 3654-3665.
- [70] Cossi, M.; Rega, N.; Scalmani, G.; Barone, V. *J. Comp. Chem.* **2003**, 24, 669-681.
- [71] Viart, N.; Rehspringer, J. L. *JNCS*, **1996**, 195, 223-231.
- [72] Chakraborty, H.; Sarkar, M. *Biophys. Chem.* **2007**, 125, 306-313.
- [73] Pliego, J. R., Jr.; Riveros, J. M. *J. Phys. Chem. A* **2001**, 105, 7241-7247.
- [74] Lim C, Bashford D, Karplus M, *J. Phys. Chem.* **1991**, 95, 5610-5620.
- [75] Tawa, G.J.; Topol, I.A.; Burt, S.K.; Caldwell, R.A.; Rashin, A.A. *J Chem Phys* **1998**, 109, 4852-4863.
- [76] Zhan CG, Dixon DA, *J. Phys. Chem. A*, **2001**, 105, 11534-11557.
- [77] Tissandier, M.D.; Cowen, K.A.; Feng, W.Y.; Gundlach, E.; Cohen, M.H.; Earhart, A.D.; Coe, J.V.; Tuttle, T.R. Jr. *J Phys Chem A* **1998**, 102, 7787-7794.
- [78] Camaioni, D.M.; Schwerdtfeger, C.A. *J PhysChem A* **2005**, 109, 10795-10797.

- [79] Curtiss, L. A.; Redfern, P. C.; Raghavachari, K.; Rassolov, V.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1999**, 110, 4703-4709.
- [80] Head-Gordon, M.; Pople, J. A.; Frisch, M. J. *Chem. Phys. Lett.* **1988**, 153, 503-506.
- [81] Saebø, S.; Almlöf, J. *Chem. Phys. Lett.* **1989**, 154, 83-89.
- [82] Head-Gordon, M.; Head-Gordon, T.; *Chem. Phys. Lett.* **1994**, 220, 122-128.
- [83] Boese, A. D.; Martin, J. M. L. *J. Chem. Phys.* **2004**, 121, 3405-3416.
- [84] Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. A* **2004**, 108, 6908-6918.
- [85] Zhao, Y.; Schultz, N. E.; Truhlar, D. G. *J. Chem. Theory and Comput.* **2006**, 2, 364-382.
- [86] Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1997**, 107, 8554-8560.
- [87] Schmider, H. L.; Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1998**, 108 9624-9631.
- [88] Barone, V.; Cossi, M. *J. Phys. Chem. A* **1998**, 102, 1995-2001.
- [89] Marenich, A. V. ; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 6378-6396.
- [90] Klamt, A.; Jonas, V.; Burger, T.; Lohrenz, J. *J. Phys. Chem.* **1998**, 102, 5074-5085.
- [91] Nicolas, C.; Verny, M.; Giraud, I.; Ollier, M.; Rapp, M.; Maurizis, J.-C.; Madelmont, J.-C. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 5235-5239.
- [92] Vidal, A.; Chezal, J.-M.; Mounetou, E. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 405-409.
- [93] Bubenyak, M.; Noszal, B.; Koczian, K.; Takacs, M.; Beni, S.; Hermecz, I.; Kokosi, J. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 5711-5713.
- [94] NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69; Linstrom, P. J.; Mallard, W. G., Eds.; National Institute of Standards and Technology: Gaithersburg MD, 20899, <http://webbook.nist.gov>, (retrieved August 12, **2010**).
- [95] Janke, E. M. B.; Schlund, S.; Paasche, A.; Engels, B.; Dede, R.; Hussain, I.; Langer, P.; Rettig, M.; Weisz, K. *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 4878-4881.
- [96] Sečkářová, P.; Marek, R.; Maliňáková, K.; Kolehmainen, E.; Hocková, D.; Hocek, M.; Sklenář, V. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 6259-6263.
- [97] Auer, A. A.; Gauss, J.; Stanton, J. F. *J. Chem. Phys.* **2003**, 118, 10407-10417.

- [98] Allen, M. J.; Keal, T. W.; Tozer, D. *J. Chem. Phys. Lett.* **2003**, 380, 70-77.
- [99] Keal, T. W.; Tozer, D. J. *J. Chem. Phys.* **2003**, 119, 3015-3024.
- [100] Poater, J.; van Lenthe, E.; Baerends, E. J. *J. Chem. Phys.* **2003**, 118, 8584-8593.
- [101] Allen, M. J.; Keal, T. W.; Tozer, D. *J. Chem. Phys. Lett.* **2003**, 380, 70-77.
- [102] Keal, T. W.; Tozer, D. J. *J. Chem. Phys.* **2003**, 119, 3015-3024.
- [103] Poater, J.; van Lenthe, E.; Baerends, E. J. *J. Chem. Phys.* **2003**, 118, 8584-8593.
- [104] Harris, C. D.; Holder, A. J.; David Eick, J.; Chappelow, C. C.; Stansbury, J.W. *J. Mol. Graphics Mod.* **2000**, 18, 567-580.
- [105] Gryff-Keller, A.; Szczeciński, P. *J. Mol. Struc. (THEOCHEM)* **2010**, 967, 94-98.
- [106] Kaatze, U.; Pottel, R.; Schafer, M. *J. Phys. Chem.* **1989**, 93, 5623-5627.
- [107] Yang, L. J.; Yang, X. Q.; Huang, K. M.; Jia, G. Z.; Shang, H. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, 10, 1261-1270.
- [108] Perdew, J. P.; Wang, Y. *Phys. Rev. B* **1992**, 45, 13244-13249.
- [109] Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M. *Phys. Rev. Lett.* **1996**, 77, 3865-3868.
- [110] Swart, M.; Ehlers, A. W.; Lammertsma, K. *Mol. Phys.* **2004**, 102, 2467-2474.
- [111] Handy, N. C.; Cohen, A. J. *Mol. Phys.* **2001**, 99, 403-412.
- [112] Vila, J. A.; Baldoni, H. A.; Scheraga, H. A. *J. Comput. Chem.* **2009**, 30, 884-892.
- [113] Zhang, Y.; Wu, A.; Xu, X.; Yan, Y. *Chem. Phys. Lett.* **2006**, 421, 383-388.
- [114] Ditchfield, R. *Mol. Phys.* **1974**, 29, 789-807.
- [115] Wolinski, K.; Hilton, J. F.; Pulay, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 8251-8260.
- [116] Frassinetti, Ch.; Ghelli, S.; Gans, P.; Sabatini, A.; Moruzzi, M. S.; Vacca, A. *Anal. Biochem.* **1995**, 231, 374-382.
- [117] Tomasi, J.; Persico, M. *Chem. Rev.* **1994**, 94, 2027-2094.
- [118] Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 2999-3093.
- [119] Klamt, A.; Schürmann, G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1993**, 2, 799-805.

- [120] Fiolhais, C.; Nogueira, M. F.; Eberhard, M.; Gross, K.U. *A Primer in Density Functional Theory*, Springerlink, San Sebastián España, **2002**, pp 144-181.
- [121] Runge, E.; Gross, E. K. U. *Phys. Rev. Lett.*, **1984**, 52, 997-1000.
- [122] Atkins, P.W.; Friedman R.S. *Molecular Quantum Mechanics*, 3th edición, Oxford University Press, New York, **1996**, pp. 358-370.
- [123] Levine, I.N. *Molecular spectroscopy*, John Wiley and sons, New York, **1975**, pp 296-314.
- [124] Atkins, P.W; Paula, J. *Physical Chemisrty* 8th Edition, Oxford University Press, New York, **2006**, pp 513-553
- [125] Levine, I.N. *Molecular spectroscopy*, John Wiley and sons, New York, **1975**, pp 323-366.
- [126] Atkins, P.W.; Friedman R.S. *Molecular Quantum Mechanics*, 3th edición, Oxford University Press, New York, **1996**, pp. 411-442.
- [127] Helgaker, T.; Jaszunski, M.; Ruud K. *Chem. Rev*, **1999**, 99, 293-352.
- [128] Schreckenbach, G.; Ziegler, T. *Theor. Chem. Acc.*, **1998**, 99, 71-82.

“PUBLICACIONES”

UV–Visible Properties of Oxicams in Solution: A TD-DFT and Experimental Study

Marco Franco-Pérez, Luis I. Reyes-García, Rosario Moya-Hernández, and Rodolfo Gómez-Balderas*

Microspecies involved in prototropic equilibria of isoxicam, piroxicam, meloxicam, tenoxicam, and lornoxicam are characterized by time-dependent density functional theory (TD-DFT) and UV-vis spectrophotometry, their relative Gibbs free energies in solution and Maxwell–Boltzmann populations are theoretically calculated. TD-DFT calculations of the most intense transition energies for the microspecies involved in equilibria are compared with those obtained in solvents of different dielectric constants (1,4-dioxane, ethanol,

water, and formamide) and at various pH conditions. Our TD-DFT results allow establishing the predominant oxicam microspecies at the experimental conditions. Geometry optimizations are performed at level of theory PCM-PBE0/6-31+G(d, p), and transition energies are computed using the protocol PCM-PBE0/6-311++G(d, p). © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

DOI: 10.1002/qua.24298

Introduction

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) act principally by inhibiting prostaglandin synthesis, mediated by prostaglandin-H synthase enzyme.^[1,2] NSAIDs from the oxicam family, such as isoxicam, piroxicam, meloxicam, tenoxicam, and lornoxicam (Fig. 1), are well documented as highly effective class of drugs against various arthritis and postoperative inflammations, acute pains in the muscular skeletal system, and so forth.^[3] However, these substances produce undesirable effects in the organism, probably associated with inhibition of one isoform of the enzyme cyclooxygenase-1.^[4] In addition to the role as anti-inflammatory drugs, chemoprevention^[5,6] and chemosuppression functionalities have been investigated,^[7,8] as well as their free radical scavenging abilities.^[9–11] Some NSAIDs are also good UV-sensitizer^[12–14] and UV-protector of skin,^[15] and side effects such as photoallergy have been observed for piroxicam.^[16] Photochemical properties of oxicams certainly are sensitive to the polarity and pH of the medium due to their acid–base and tautomeric behavior in solution, which involves various isomers participating in a complex set of prototropic microequilibria,^[17–19] see Figure 2.

Microequilibria involve four different microforms, namely cation (H_2Ox^+), neutral species zwitterion and enol (HOx), and anion (Ox^-), shown in Figure 2. These prototropic microequilibria are characterized by the microconstants K_{a11} , K_{a12} , K_{a21} , and K_{a22} , associated with proton interchange between $\text{H}_2\text{Ox}^+ \leftrightarrow$ zwitterion, zwitterion \leftrightarrow Ox^- , $\text{H}_2\text{Ox}^+ \leftrightarrow$ enol, and enol \leftrightarrow Ox^- , respectively. They can be manipulated by varying the pH conditions of the medium. On the other hand, tautomerization equilibria zwitterion \leftrightarrow enol, characterized by the constant K_z , might be altered by modifying the polarity of the solution, according to Figure 2.^[18,20]

By means of *ab initio* quantum chemistry protocols,^[21,22] UV-vis spectrophotometry,^[20,23,24] and nuclear magnetic resonance,^[22,24] the five microequilibria displayed in Figure 2 have

been characterized for piroxicam, tenoxicam, and lornoxicam. For isoxicam, only the microequilibrium of deprotonation of the enolic oxygen O17 (Fig. 1), has been confirmed. Regarding meloxicam, reports show inconsistencies, several studies suggest the existence of those prototropic species in Figure 2,^[25–28] whereas other researchers^[20,29,30] consider that meloxicam displays only the deprotonation equilibrium of the enolic oxygen (O17), similar to isoxicam.

Photochemical properties of piroxicam have received more attention than other oxicams, but there are still some issues for unambiguously connecting the electronic spectra with the microspecies in solution, main results are compiled in Table 1. It has been possible to associate the maximum of the absorption of piroxicam UV-vis spectrum ($\lambda_{\text{exp}}^{\text{max}} = 329$ nm) with the enol species in dioxane solution.^[31] Banerjee et al.^[32,33] observed an interesting absorption behavior of piroxicam in ethanol solutions varying the concentration and pH. By increasing the concentration, from 10 to 90 μM , they observed a hypsochromic effect (blue shift) from $\lambda_{\text{exp}}^{\text{max}} = 362$ to $\lambda_{\text{exp}}^{\text{max}} = 330$ nm. Titration of diluted solution (10 μM) with acidified water produces a similar blue shift. Presumably, the anionic piroxicam present at low concentrations is neutralized at acid pH, favoring the neutral form. On the other side, titration of 90 μM solution with alkali results in a red shift comparable in magnitude with the blue shift. Therefore, the neutral piroxicam, present at high concentrations, is deprotonated by the alkali and the $\lambda_{\text{exp}}^{\text{max}} = 362$ nm is attributed to the anionic

M. Franco-Pérez, L. I. Reyes-García, R. Moya-Hernández, R. Gómez-Balderas
Laboratorio de Fisicoquímica Analítica, Depto. de Química, Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FES Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli, Estado de México 54700, México
E-mail: rodolfo.gomez@unam.mx

Contract grant sponsors: DGAPA-UNAM; Contract grant number: PAPIIT IN222011, FES Cuautitlán, PACIVE. CONACyT, Doctoral scholarships granted to M.F.-P and L.I.R.-G.

© 2012 Wiley Periodicals, Inc.

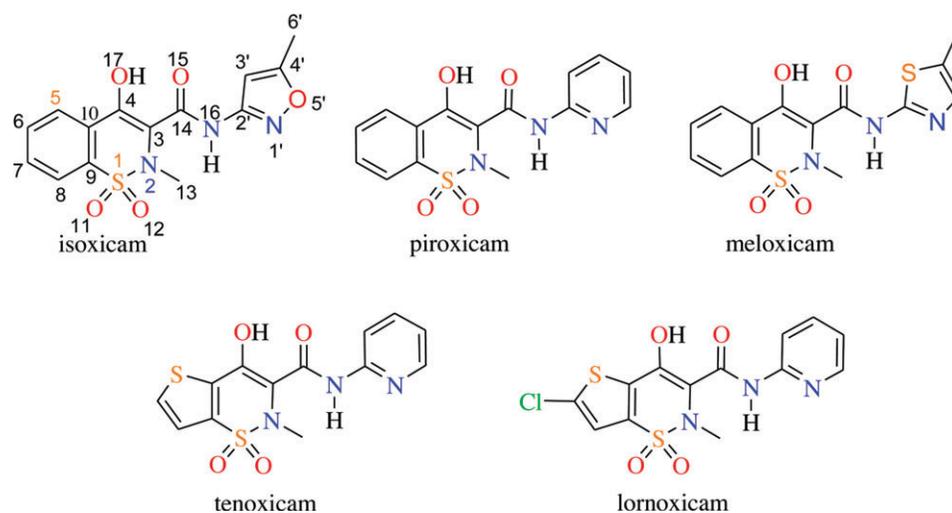


Figure 1. Chemical structures of the five oxicams considered in this study. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

species. Despite that the absorption band of 330 nm, observed in the 90 μM solution, resembles that observed in dioxane ($\lambda_{\text{exp}}^{\text{max}} = 329$ nm, formerly associated to the enol), Banerjee assigned this band to a global zwitterion/enol neutral species.^[32,33] Similar experiments, for meloxicam, produce analogous results: anionic species are present at low concentration or alkali pH, neutral species are favored by higher concentrations or acid pH.^[33]

Results on the absorption properties of piroxicam in aqueous solutions have been reported at different pH conditions (Table 1). At low pHs, Andrade et al.^[34,35] observed a spectrum that resembles that found for piroxicam in dioxane. Thus, they concluded that the enol tautomer is responsible for that spectrum. In the basic pH region, the UV-vis spectrum shows two main bands, attributed to the anionic form of piroxicam, because the pKa value is under 6.0.^[23] Another investigation by Gil et al.^[36] detected an UV-vis maximum in 359 nm at pH

of 3.0, Gil assumed that the cationic species, instead of the neutral piroxicam of Andrade, is responsible for this band.

The dependence of the UV-vis spectrum of piroxicam with the polarity of the medium has also been investigated by Andrade and Costa.^[31] By controlling the ratio of dioxane/water, they varied the solvent polarity. Then, when the absorption spectra were compared with those observed in pure solvents, they concluded that the absorption spectra of piroxicam depend on the capability of the solvent to form hydrogen bonds. According to their results, a closed enol conformer (enol-cc) of piroxicam would be responsible for the absorption spectra in aprotic mediums like dioxane (Scheme 1). In contrast, an open enol conformer (enol-oc) would be related to the absorption band in protic solvents (Scheme 1), because the formation of an intramolecular bond stabilizes the structure. A maximum absorption band of 359 nm, with a second strong signal at 286 nm, was recorded in dioxane/water solutions. The spectrum was assigned to the open conformation; it resembles that identified in alkaline water with $\lambda_{\text{exp}}^{\text{max}}$ of 356 nm, as the anionic species.^[35] In an experimental and time-dependent density functional theory (TD-DFT) spectroscopic study, de Souza et al.^[37] reported that the enol-cc of piroxicam is responsible for the electronic transitions observed in nonpolar aprotic solvents like carbon tetrachloride.

As it has been discussed, isolating the microspecies in solution will require either to manipulate the solvent polarity or to change the pH. A tautomer, in the first case, or a pH-dependent species, in the second case, can be formed preferentially. Nevertheless, it can be really troublesome to isolate UV-vis signals for neutral tautomers.^[38] In this context, by means of quantum chemistry protocols, the spectroscopic features of particular molecular structures can be computed. Then, by

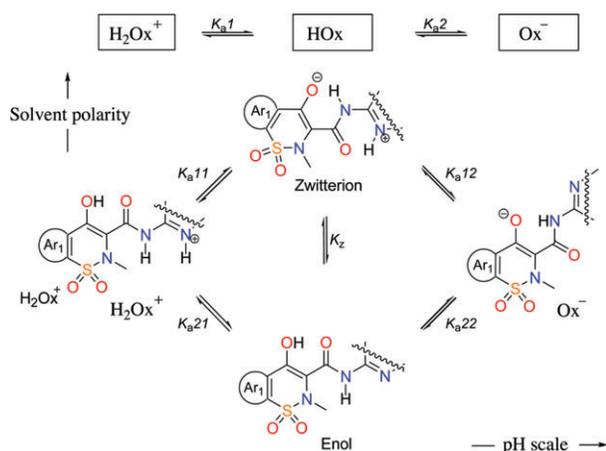
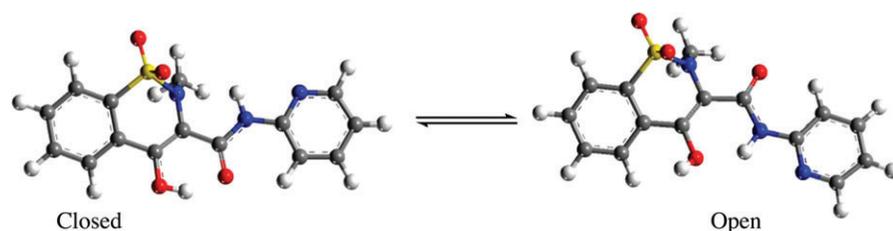


Figure 2. NSAIDs ionization general scheme as a function of polarity and pH of solvent. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

Table 1. Spectroscopic features of microspecies of piroxicam at different experimental conditions.

Solvent	Relevant conditions	Suggested species	$\lambda_{\text{exp}}^{\text{max}}$ (nm)	References
1,4-dioxane	None	Enol-cc	329	[32]
EtOH	90 μM or acidified 10 μM	Enol/zwitterion	330	[34]
EtOH	10 μM or alkaline 90 μM ^[a]	Anion	362	[33]
H ₂ O	pH = 10.0 ^[a]	Anion	356	[35,36]
H ₂ O	Nonimposed pH ^[a]	Enol-oc	359	[32]
H ₂ O	pH = 1.8–2.5	Enol-cc	330	[35,36]
H ₂ O	pH = 3.0	Cation	359	[37]

^[a]A second band at 286 nm is also reported for these solutions.



Scheme 1. Molecular graph of the closed and open conformers of piroxicam. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

searching for these features within the experimental spectra the microspecies may be identified, quantum chemistry can assist to discern whether zwitterion or enol microspecies is responsible for an experimental signal assigned to a global neutral species. Furthermore, theoretical relative Gibbs free energies and Maxwell–Boltzmann populations can be computed for the species present in solution.

Recent advances in TD-DFT allow the accurate treatment of the electronic excitation spectra for a wide range of systems.^[39–42] TD-DFT methods provided results with similar quality to those obtained by more sophisticated and time-consuming post Hartree–Fock methods, particularly with the PBE0 density functional.^[43,44] With this improved performance, it has been possible to study the effect of the isomerization on the absorption spectra of numerous compounds, for instance some organic dyes and RNA nucleosides.^[45,46]

To improve the level of knowledge on molecular structures, spectroscopic properties and equilibria established in solution of oxicams, in this article, we carried out a systematic investigation of the UV-vis spectroscopic properties of isoxicam, piroxicam, meloxicam, tenoxicam, and lornoxicam by means of quantum chemistry protocols, based on TD-DFT. To assign computed electronic transitions to experimental absorption bands, we recorded the UV-vis spectrum of several systems in solvents with different polarities and pHs conditions. Our results allow establishing the predominant oxicam microspecies at the conditions for the five drugs under study as well as discuss about the neutral species present in different solvents, by means of their relative Gibbs free energy in solution.

Methodology

Quantum chemistry methods

All DFT^[47] and TD-DFT^[48,49] calculations were performed with the Gaussian 09 quantum chemistry computational package.^[50] For each microspecies shown in Figure 2 of the five oxicams considered in this study, the conformational stability related to the rotations present in the C3–C14 and N16–C2' bonds (see Fig. 3), as well as the conformational analysis of the thiazine half-chair (S1–C8, Fig. 3), was carried out using the hybrid version of the Perdew, Burke and Ernzerhof pure functional by Adamo (PBE0)^[43] and the 6-31+G(d, p) basis set.^[51] Minimum energy conformation of each microspecies was reoptimized using the same functional and basis set in conjunction with the polarizable continuum model (PCM)^[52] to

obtain the minimum energy structures in solution for all the microspecies. For those systems where there is mixture of two solvents, the medium was modeled using the default Gaussian 09 settings of the more abundant component. We confirm that all the structures corresponded to a minimum on the potential energy surface by an analysis of vibrational frequencies at the same level of theory.

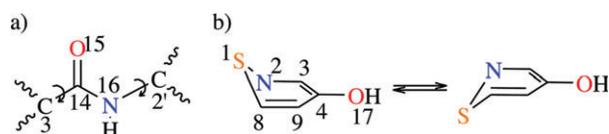


Figure 3. a) Explored rotations for the microspecies of the five oxicams under study. b) Thiazine ring half-chair conformations. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

Vertical electronic excitation energies ($\lambda_{\text{theor}}^{\text{excit}}$, nm) of the studied oxicams were calculated for each prototropic species in the minimum energy conformation. For this task, the upmost three excitations were used in all the calculations. The level of theory for calculating excitation energies was PBE0/6-311++G(d,p)//PBE0/6-31+G(d). For a limited set of systems, consisting of the enol species in 1,4-dioxane, the widely used B3LYP functional was also used to assess its performance in computing the excitation energies in conjunction with the basis set 6-311++G(d,p) on B3LYP/6-31+G(d) geometries. Solution environments, where the experimental absorption measurements are performed, were treated with PCM under the same considerations for treating mixture of solvents. To compare with experimentally detected $\lambda_{\text{exp}}^{\text{max}}$, we only considered the theoretical excitation energies $\lambda_{\text{theor}}^{\text{excit}}$ with the highest oscillator strengths. Gibbs free energy in solution of the neutral species (zwitterion and enol) were computed as $G_{\text{soln}}^* = G_{\text{gas}}^* + \Delta G_{\text{soln}}^*$ where G_{gas}^* is the Gibbs free energy at 298.15 K in gas phase obtained for the gas phase optimized geometries, and ΔG_{soln}^* is the solvation Gibbs free energy of the species obtained with the PCM, and the B3LYP^[53] density functional with the 6-31+G(d) basis set. Gibbs free energy in solution where then used to obtain the Maxwell–Boltzmann distribution for the neutral species of the oxicams, in all the media here considered.

Experimental procedure

UV-vis spectra and maximum absorption bands ($\lambda_{\text{exp}}^{\text{max}}$, nm) of the five oxicams under study were obtained at the concentrations of 27 and 100 μM . To consider the effect of the polarity of the medium, we prepared this concentrations in solvents ranging from low dielectric constant to high dielectric constant, namely: 1,4-dioxane ($\epsilon = 2.2$), ethanol ($\epsilon = 24.9$), deionized water ($R = 18.2 \text{ m}\Omega$, $\epsilon = 78.4$), and formamide ($\epsilon = 109.6$). To manipulate the pH conditions of the medium, pure solvents were mixed with a pH-controlled aqueous solution, where the organic solvent was the main molar component.

Solutions were prepared according to Table 2 at the aforementioned two concentrations. pH of the aqueous phase was imposed to a determined value, using HCl or NaOH conveniently to such end. It is well known that operational pH scales for organic solvents and mixture of solvents differ from the

Table 2. Mixtures prepared at different pHs.	
Solvent	pH of H ₂ O fraction
Ethanol/water	2.5
Ethanol/water	10.0
Water	0.6
Water	Isoxicam, 2.6
	Piroxicam, 3.7
	Meloxicam, 2.6
	Tenoxicam, 3.2
Water	Lornoxicam, 3.0
	10.0
Formamide/water	0.6
Formamide/water	10.0

For each oxicam the pH of its isoelectric point was established as indicated.

aqueous pH scale.^[54] Given that slight changes in pH scales for ethanol^[54] and formamide^[55] are documented, the pKa values obtained in water may accurately predict the species in solution, but we will identify the microspecies on the basis of their absorption maximum wave length for systems with solvent mixture.

Measurements in the acidic formamide solutions were carried out in less than 1 min to avoid the hydrolysis of formamide according to results of Viart et al.^[56] All absorption spectra were recorded in a PerkinElmer Lambda 35 UV-vis spectrophotometer. Baseline corrections were done with the corresponding pure or mixture solvent before running each set of spectra. Repeatability was tested by performing experiments at room temperature, for three times in three different days, no variations on bands were observed.

Results and Discussion

Theoretical predictions assessment

It is important to evaluate the error incurred by selected functionals in calculating the $\lambda_{\text{theor}}^{\text{excit}}$ at the used level of theory, and how $\lambda_{\text{theor}}^{\text{excit}}$ compares with the experimental determinations. Table 3 presents the results of the assessment, as

Table 3. Theoretical and experimental electronic spectra transitions in 1,4-dioxane of the enol-cc oxicams under study.					
Oxicam	E (eV) ^[a]	$\lambda_{\text{theor}}^{\text{excit}}$ (nm) ^[a]	E (eV) ^[b]	$\lambda_{\text{theor}}^{\text{excit}}$ (nm) ^[b]	$\lambda_{\text{exp}}^{\text{max}}$ (nm)
Isoxicam	3.85	322	3.72	344	321
Piroxicam	3.71	333	3.58	347	327
Meloxicam	3.34	369	3.17	392	344
Tenoxicam	3.53	351	3.34	367	344
Lornoxicam	3.43	362	3.29	377	353

[a] PCM-PBE0/6-311++G(d,p)//PCM-PBE0/6-31G+(d,p). [b] PCM-B3LYP/6-311++G(d,p)//PCM-B3LYP/6-31G+(d,p).

it can be seen PBE0 gives better predictions than B3LYP for the selected systems. PBE0 excitations energies for meloxicam are 25 nm from the experimental measurements, whereas B3LYP value is 48 nm from the experiment. For the rest of oxicams, PBE0 and B3LYP give values within 10 and 25 nm, respectively, the later incurring bigger errors. We would recommend the PBE0 functional for calculating excitation energies.

The overall behavior of all the 39 calculated values at the PBE0/6-311++G(d,p)//PBE0/6-31+G(d) level of theory for the five oxicams in all the worked media are represented in Figure 4. A good agreement is found between $\lambda_{\text{theor}}^{\text{excit}}$ and $\lambda_{\text{exp}}^{\text{max}}$ ($R^2 = 0.93$). The media absolute deviation (MAD) and mean absolute

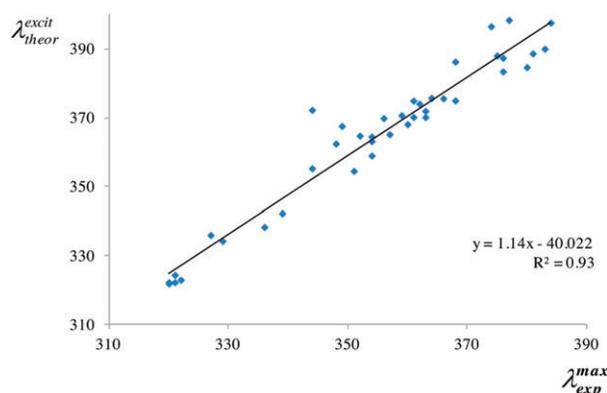


Figure 4. Correlation profile between the theoretically calculated and experimental UV-vis transitions. All the species and all the solvents (pure and mixed) are considered. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

error (MAE) for the data set is 4.5 and 7.08 nm, respectively. $\lambda_{\text{theor}}^{\text{excit}}$ is always larger than the $\lambda_{\text{exp}}^{\text{max}}$, the largest observed error (~ 25 nm) was for meloxicam in dioxane. In general, theoretical excitation energies are better calculated for isoxicam in all the media considered, MAD = 3.7 nm, MAE = 4.0 nm.

Absorption behavior and microspecies in 1,4-dioxane

Given the very low dielectric constant ($\epsilon = 2.2$) of 1,4-dioxane, the population of the enol conformer would be favored in solution for any oxicam, with respect to the other microspecies. Abundance of the enol-cc should be expected because of 1,4-dioxane is a nonprotic solvent, the open conformer prefers protic solvents. Table 4 shows the relative Gibbs free energies as well as the Maxwell-Boltzmann populations in solution, it is clear that in 1,4-dioxane the population if the enol-cc is favored over the zwitterion and the open structures. TD-DFT and experimental wave lengths of maximum absorption bands are very close for the enol species (Table 5), thus we can infer that the enol should be responsible for the UV-vis spectrum features. Absorption band position of the five oxicams is independent of concentration for this solvent. The experimental absorption spectra recorded in 1,4-dioxane for all the oxicams are shown in supporting information (Supporting Information, Fig. S1).

Table 4. Solution relative Gibbs free energies (kcal/mol) and Maxwell–Boltzmann distributions of the oxicam neutral species.

	Isoxicam		Piroxicam		Meloxicam		Tenoxicam		Lornoxicam	
Gas phase										
Enol-cc	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00
Enol-oc	14.00	0.00	14.45	0.00	13.70	0.00	14.45	0.00	14.53	0.00
Zwitterion	–	–	8.66	0.00	8.11	0.00	7.5	0.00	6.67	0.00
1,4-dioxane										
Enol-cc	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00
Enol-oc	13.25	0.00	13.73	0.00	13.00	0.00	13.93	0.00	14.04	0.00
Zwitterion	–	–	4.55	0.00	5.13	0.00	3.22	0.00	4.20	0.00
Ethanol										
Enol-cc	0.00	1.00	1.29	0.10	0.00	0.60	2.69	0.01	3.40	0.00
Enol-oc	8.51	0.00	8.92	0.00	8.20	0.00	12.53	0.00	9.85	0.00
Zwitterion	–	–	0.00	0.90	0.25	0.40	0.00	0.99	0.00	1.00
Water										
Enol-cc	0.00	1.00	1.35	0.09	0.27	0.39	2.68	0.01	3.37	0.00
Enol-oc	8.42	0.00	9.71	0.00	7.77	0.00	12.22	0.00	12.20	0.00
Zwitterion	–	–	0.00	0.91	0.00	0.61	0.00	0.99	0.00	1.00
Formamide										
Enol-cc	0.00	1.00	1.87	0.04	0.49	0.31	3.21	0.00	3.87	0.00
Enol-oc	7.75	0.00	8.18	0.00	7.40	0.00	9.27	0.00	9.31	0.00
Zwitterion	–	–	0.00	0.96	0.00	0.69	0.00	1.00	0.00	1.00

Absorption behavior and microspecies in ethanol

A first remarkable fact, when solvent is ethanol, is that the absorption band position depends on concentration, which modify both the maximum and the shape of the spectrum (Fig. S2). These facts might indicate that as concentration changes the predominant species in solutions also changes. Smaller wave lengths were detected for the more concentrated solutions of 100 μM . A bathochromic effect ($\Delta\lambda \sim 27$

nm) was observed when concentration decreased from 100 to 27 μM . By comparing the theoretically calculated transitions with the experimental data, we can straightforward identified the microspecies present at each concentration. According to Table 6, the calculated transitions for the neutral enol species correspond to the observed in concentrated solution (bigger difference of 16 nm), whereas those predicted for the oxicam anion correspond to the dilute solutions, meloxicam showing the bigger error of 25 nm.

Table 5. Theoretical and experimental electronic spectra most intense transitions, in 1,4-dioxane, of the oxicams under study.

Oxicam	Species	Transition	E (eV) ^[a]	$\lambda_{\text{theor}}^{\text{excit}}$ (nm) ^[a]	$\lambda_{\text{exp}}^{\text{max}}$ (nm)
Isoxicam	Enol-cc	HOMO \rightarrow LUMO	3.85	322	321
Piroxicam	Enol-cc	HOMO \rightarrow LUMO	3.71	333	327
		HOMO(-1) \rightarrow LUMO			
Meloxicam	Enol-cc	HOMO) \rightarrow LUMO	3.34	369	344
Tenoxicam	Enol-cc	HOMO) \rightarrow LUMO	3.53	351	344
Lornoxicam	Enol-cc	HOMO) \rightarrow LUMO	3.43	362	353

[a] PCM-PBE0/6-311++G(d,p)//PCM-PBE0/6-31G+(d,p).

nm) was observed when concentration decreased from 100 to 27 μM . By comparing the theoretically calculated transitions with the experimental data, we can straightforward identified the microspecies present at each concentration. According to Table 6, the calculated transitions for the neutral enol species correspond to the observed in concentrated solution (bigger difference of 16 nm), whereas those predicted for the oxicam anion correspond to the dilute solutions, meloxicam showing the bigger error of 25 nm.

In addition, it is worth noticing that the wavelengths of the experimental enol-cc species in 1,4-dioxane (Table 5) agree well, both theoretically and experimentally, with those in the concentrated ethanol solution (Table 6). Consequently, the enol-cc species must predominate under concentrated conditions. Dependence of the absorption spectra of the five oxi-

cams with the concentration and pH in ethanol are shown in Supporting Information, Figure S2. It is interesting to observe that data in Table 4 indicate that in ethanol the neutral most stable microspecies is the zwitterion over the enol-cc, following the solutions relative energy criterion. The calculated $\lambda_{\text{theor}}^{\text{excit}}$ of the zwitterions, which are as near as those of the anions to the experimental $\lambda_{\text{exp}}^{\text{max}}$ measured in ethanol dilute solutions (Table 6), seems to support the zwitterion to be present in dilute solutions. However, a closer

Table 6. PCM-PBE0/6-311++G(d,p)//PCM-PBE0/6-31G+(d,p) TD-DFT most intense transitions (HOMO-LUMO) and experimental electronic spectra in ethanol.

Oxicam species	E (eV)	$\lambda_{\text{theor}}^{\text{excit}}$ (nm)	$\lambda_{\text{exp}}^{\text{max}}$ (nm)	
			100 μM	27 μM
Isoxicam				
Enol-cc	3.87	320	320	
Enol-oc	3.88	319		
Anion	3.42	362		354
Piroxicam				
Zwitterion	3.32	374		
Enol-cc	3.72	333	329	
Enol-oc	3.72	333		
Anion	3.33	372		361
Meloxicam				
Zwitterion	3.39	366		
Enol-cc	3.38	365	349	
Enol-oc	3.30	375		
Anion	3.31	374		366
Tenoxicam				
Zwitterion	3.26	381		
Enol-cc	3.53	361	351	
Enol-oc	3.54	350		
Anion	3.23	383		375
Lornoxicam				
Zwitterion	3.22	385		
Enol-cc	3.43	361	352	
Enol-oc	3.44	360		
Anion	3.15	394		377

inspection of the behavior in terms of the pH is given in the next section, supporting the presence of the enol-cc species. Failure of relative Gibbs free energies in predicting the enol-cc over the zwitterion might expose limitations of the model used to calculate the solution energies, when the species are too close in energy as in this case.

Acidified and alkalinized ethanol solutions When the dilute 27 μM ethanol solution is acidified, the maximum of absorption is blue-shifted: isoxicam 34, piroxicam 32, meloxicam 17, tenoxicam 24, and lornoxicam 25 nm (Fig. 5). This hypsochromic shift moves each oxicam maximum toward the corresponding in concentrated ethanol solution. pH changes have effects on charged species along the pH scale (Fig. 2). Therefore, acidifying the diluted solutions converts the oxicam from its anion to the neutral enol microspecies. Conversely, when the concentrated 100 μM ethanol solution is alkalinized, the maximum absorption band of the system is red-shifted. Each oxicam maximum is moved toward that observed for the pure ethanol dilute solution. Hence, alkalinizing the solution change the microspecies from the neutral into the anionic. In addition, given that the molecular structure of isoxicam allows solely the protonation/deprotonation of the enol group,^[23] we can infer that for the rest of the oxicams we are also observing enol-anion equilibrium.

To explore the existence of an enol-oc in diluted solutions, we compared the predicted $\lambda_{\text{theor}}^{\text{excit}}$ for the optimized open structures with the experimental measurements (Table 6). For all oxicams under study, the value of $\lambda_{\text{theor}}^{\text{excit}}$ is nearer the observed maximum for the 100 μM solution, than the observed for the 27 μM ethanol solution. Therefore, it seems that is the anion instead of the open enol, formerly suggested by Andrade,^[34] the species responsible for the experimental spectrum. Quantum chemistry calculations carried out on the open molecular structure of the five oxicams, at the PBE0/6-311++G(d,p)//B3LYP/6-31+G(d,p) plus PCM to consider the solvent effects,

demonstrated that, in general, the enol closed structures are approximately 10 kcal/mol more stable than the corresponding open structure. Thus, the open structures are predicted inexistent under these conditions, with such a difference in relative energies the Maxwell-Boltzmann distribution predicts 100% of the enol closed structure in solution. Consequently, the open structure will not be considered in further analysis. Summarized results for the five oxicams in ethanol are shown in Table 6.

Absorption behavior in water

Behavior of oxicams in aqueous solution has been previously characterized by UV-vis spectroscopy.^[20,23,24] As long as the oxicam amount in solution is lower than its saturation limit, the observed spectrum will be independent of the concentration but strongly dependent on the pH of the solution. Values of acid dissociation constants in aqueous solution (pKa1, pKa2) for the studied oxicams are: isoxicam (pKa1 = 3.93),^[23] piroxicam (1.86, 5.46),^[24] meloxicam (1.09, 4.18),^[25] tenoxicam (1.07, 5.34),^[24] and lornoxicam (0.85, 5.59).^[23]

To identify the microspecies responsible for electronic transitions in water, a first observation is that isoxicam possess just 1 pKa. Its theoretical excitation energy in water is 322 nm, very close to the experimental 320 nm (pH = 2.6). Moreover, the experimental spectrum resembles the obtained in 1,4-dioxane as well as the recorded in 100 μM ethanol solution (Supporting Information, Figs. S1, S2, and S3). Thus, the neutral enol species is present under these conditions in water in line with the pKa value of isoxicam, Maxwell-Boltzmann distribution predicts 100% of enol-cc in solution.

Now, it is interesting to discuss the behavior of microspecies at the isoelectric point (the pH where the neutral species predominate) for those oxicams that possess 2 pKas. We calculate the Maxwell-Boltzmann distributions and apply our methodology to elucidate whether the zwitterion or the enol species is present in solution. Data in Table 4 indicate that for all the oxicams the zwitterion species is preferred in water solution. For piroxicam, tenoxicam, and lornoxicam, the zwitterion calculated transition energies are in better agreement with the experimental value, than those of the enol conformer (Table 7). For instance, the piroxicam zwitterion $\lambda_{\text{theor}}^{\text{excit}} = 371$ nm is closer to $\lambda_{\text{exp}}^{\text{max}} = 361$ nm than the piroxicam enol-cc $\lambda_{\text{theor}}^{\text{excit}} = 332$ nm. Furthermore, the higher dielectric constant of water ($\epsilon = 78.4$) would favor the zwitterion over the enol microspecies. The last should be more abundant in less polar solvents, as it was observed that happens in 1,4-dioxane ($\epsilon = 2.2$). Meloxicam

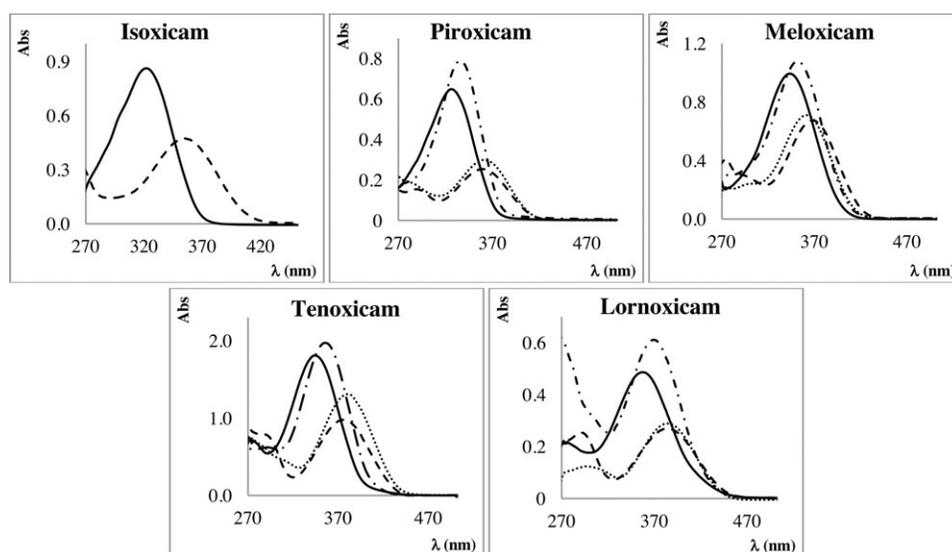


Figure 5. Individual absorption spectra of the enol (line), zwitterion (dotted), anion (dashed), and cation (dash-dotted) of oxicams, detected in aqueous solutions at different pH values; only the spectra of the enol species corresponds to those observed in 1,4-dioxane solution.

Table 7. PCM-PBE0/6-311++G(d,p)//PCM-PBE0/6-31G+(d,p) TD-DFT most intense transitions (HOMO-LUMO) and experimental electronic spectra in water.

Species	E (eV)	$\lambda_{\text{theor}}^{\text{excit}}$ (nm)	$\lambda_{\text{exp}}^{\text{max}}$ (nm)	
			pH = 0.6	pH = 10.0
Isoxicam				
Enol-cc	3.88	320	320	320
Enol-oc	3.88	319		
Anion	3.44	361		348
Zwitterion	–	–		
Cation	–	–		
Piroxicam				
Enol-cc	3.74	332		
Enol-oc	3.72	333		
Anion	3.37	368		356
Zwitterion	3.34	371		
Cation	3.71	334	336	
Meloxicam				
Enol-cc	3.39	365		
Enol-oc	3.32	373		
Anion	3.33	373		362
Zwitterion	3.46	358		
Cation	3.63	341	339	
Tenoxicam				
Enol-cc	3.54	350		
Enol-oc	3.55	350		
Anion	3.25	382		368
Zwitterion	3.28	379		
Cation	3.50	355	354	
Lornoxicam				
Enol-cc	3.43	361		
Enol-oc	3.45	359		
Anion	3.16	392		374
Zwitterion	3.23	384		
Cation	3.38	367	363	

deserves a comment, although the theoretically predicted transition band for the zwitterion is 358 nm and the prediction for enol is also close in 365 nm to the experimental of 360 nm (Table 5), in polar solvents, the zwitterion is expected to be favored. In fact, the distribution calculated favors the zwitterion with 60% of population (Table 4). Thus, we assigned the observed electronic transitions to the zwitterion microspheres.

Acidified and alkalinized aqueous solutions. The theoretical excitation energies calculated for the oxamic cation forms are very close to experimental values in aqueous solution at pH = 0.6 (Table 7), these results are expected when the pKa values of oxamic is considered, at this pH conditions, the predominant species are H_2Ox^+ . Even for meloxicam, whose cationic species is not considered in some studies.^[20,29,30] Experimentally, in aqueous solution at pH = 0.6, a new absorption maximum is detected for piroxicam, meloxicam, tenoxicam, and for lornoxicam but not for isoxicam. Note the last one has only the enolic deprotonation pKa, hence it has no cationic species. The new band at this acid pH confirms that meloxicam displays the same prototropic behavior than piroxicam, tenoxicam, and lornoxicam (Fig. 2). On the other hand, the band observed in aqueous solution at pH values near 2.0 by Andrade et al.^[35] and supposedly associated with the enol, is

due to the cationic species of piroxicam. Our relative Gibbs energies show that, because of the high polarity of water, enol species are not abundant in neutral aqueous solution where the zwitterion is dominant (Table 4). Even more, from the first pKa of piroxicam, the dominant species must be the cation.

For piroxicam in aqueous solution, the reported spectrum by Gil group at pH = 3.0^[36] closely resembles that detected for the zwitterion species in this study, also the pKa of piroxicam and the acid pH straightforward indicate that the cationic species is not favored but a neutral one. Furthermore, our theoretical excitation energy calculation in Table 7 for the zwitterion specie (371 nm) is closer than our calculation for the cation form (334 nm) to their experimental register (359 nm). Thus, the zwitterion form, and not the reported cationic specie of the drug, is present in solution under Gil group conditions.

Finally, given the pKa values of this set of oxamic, at pH = 10 predominate, in aqueous solution, the anion for any of the drugs. Theoretical excitation calculated energies for the minimum energy conformation as well as experimental values are reported in Table 7. The spectra for these aqueous solutions closely resemble those of the 27 μM ethanol (see Table 6), confirming the anionic species present in ethanol at low concentrations as was discussed before.

Absorption behavior of oxamic in formamide

Results derived from formamide solutions indicate that the spectra obtained are independent of the solution concentrations (27 and 100 μM). We have seen that, given the small dielectric constant of 1,4-dioxane, it was possible to isolate the enol species. Formamide is a solvent with a very high dielectric constant ($\epsilon = 109.6$) and favors the formation of ionic species in solution. Hence, the anion can be expected in a formamide

Table 8. PCM-PBE0/6-311++G(d,p)//PCM-PBE0/6-31G+(d,p) TD-DFT most intense transitions (HOMO-LUMO) and experimental electronic spectra in formamide.

Species	E (eV)	$\lambda_{\text{theor}}^{\text{max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{exp}}^{\text{max}}$ (nm)	
			pH = 0.6	pH = 10.0
Isoxicam				
Anion	3.43	361		363
Zwitterion	–	–		
Enol-cc	3.87	321	323	
Piroxicam				
Anion	3.36	369		359
Zwitterion	3.33	371	364	
Enol-cc	3.72	333		
Meloxicam				
Anion	3.32	374		368
Zwitterion	3.39	366	361	
Enol-cc	3.38	366		
Tenoxicam				
Anion	3.24	383		376
Zwitterion	3.26	380	380	
Enol-cc	3.52	352		
Lornoxicam				
Anion	3.16	392		384
Zwitterion	3.22	385	383	
Enol-cc	3.42	362		

solution. When we compare the theoretically calculated wave length, for the most intense transition, with the experimental determination, there is a good agreement with a maximum difference of 12 nm (Table 8, Supporting Information, Fig. S4).

Acidified and alkalinized formamide solutions. When formamide solution is acidified, experimentally we observe a hypsochromic effect for isoxicam, meloxicam, and lornoxicam (Table 8). This tendency is correctly reproduced by the calculated transitions, under the assumption that in acid solution the neutral species is the zwitterion. Following this assumption, calculations predict that piroxicam and tenoxicam should present bathochromic effect, and so is confirmed by the experiments (Table 8). If the enol were considered to evaluate these hypsochromic or bathochromic shifts, theoretical results would predict much larger displacements, compared with those observed experimentally. Thus, it supports the observation that transitions are due to zwitterion rather than enol species in agreement with our previous report on the abundance of tautomers in solution.^[22] The only exception to this observation is the isoxicam, because it possesses only 1 pKa.

Spectroscopical features of formamide alkaline solution are practically the same to the oxicam solution in formamide. Hence, the oxicam anion is also the species present in alkaline medium as can be inferred from the pKa values.

Absorbing species detected for the five oxicams

Analyzing all our theoretical and experimental data, we identify four different UV-vis absorption spectra for piroxicam, tenoxicam, meloxicam, and lornoxicam and just two for isoxicam, these spectra are presented in Figure 5. Manipulating the conditions of the media, the species responsible for each absorption spectrum was experimentally isolated and by our theoretical protocol, the transition energy of the minimum energy structure (in solution) of these species was computed as well as the relative Gibbs free energies and Maxwell-Boltzmann distributions in pure solvents. The excitation energies, in general, agree well with the experimental absorption bands in each media. All this information allows associating each experimental spectrum, with a specific minimum energy structure obtained through theoretical protocols for the five oxicams considered.

Conclusions

The absorptions properties of the five oxicams considered in this study are very sensitive to the pH and the polarity of the medium. This sensitivity is principally due to the microequilibria between different prototropic species of the drugs. Actually, by manipulating the pH and the dielectric constant value of the media, the prototropic species of five oxicams were isolated. The assignation of the detected signals assisted by TD-DFT calculation, solution relative Gibbs free energies and Maxwell-Boltzmann distributions allow us to associate each experimental band to a specific minimum energy structure of each prototropic species. Using this information, the prototropic behavior of the five oxicams in Figure 1 was revealed in the different media considered, indicating five pos-

sible microequilibria for piroxicam, tenoxicam, lornoxicam (as reported by Tsai and coworkers^[20]), and meloxicam, but only the deprotonation of the enol form for isoxicam. Finally, the obtained results discard the presence of an open conformation of piroxicam in ethanol and aqueous solutions.

Acknowledgment

The authors gratefully acknowledge to DGTIC-UNAM, for supercomputing resources.

Keywords: oxicams · anti-inflammatory drugs · TD-DFT · electronic spectrum · microspeciation

How to cite this article: M. Franco-Pérez, L. I. Reyes-García, R. Moya-Hernández, R. Gómez-Balderas, *Int. J. Quantum Chem.* **2012**, DOI: 10.1002/qua.24298

 Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

- [1] J. R. Vane, *Nature* **1971**, 231, 232.
- [2] J. R. Vane, R. M. Botting, *Am. J. Med.* **1998**, 104, 25.
- [3] C. J. Hawkey, *Lancet* **1999**, 353, 307.
- [4] H. P. Rang, M. M. Dale, J. M. Ritter, *Pharmacology*; C. Livingstone: New York; **1995**, pp. 244–263.
- [5] M. B. Sporn, N. Suh, *Carcinogenesis* **2000**, 21, 525.
- [6] G. J. Rowse, S. R. Ritland, S. J. Gendler, *Carcinogenesis* **1999**, 20, 51.
- [7] E. M. Grossman, W. E. Longo, N. Panesar, J. E. Mazuski, D. L. Kaminski, *Carcinogenesis* **2000**, 21, 1403.
- [8] A. P. Goldman, C. S. Williams, H. Sheng, L. W. Lamps, V. P. William, M. Pairet, J. D. Morrow, R. N. DuBois, *Carcinogenesis* **1998**, 19, 2195.
- [9] M. Lúcio, H. Ferreira, J. L. Lima, S. Reis, *Anal. Chim. Acta* **2007**, 597, 163.
- [10] P. Van Antwerpen, F. Dufrasne, M. Lequeux, K. Z. Boudjeltia, I. Lessgyer, S. Babar, P. Moreau, N. Moguilevsky, M. Vanhaeverbeek, J. Ducobu, J. Nève, *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, 570, 235.
- [11] L. M. Magalhes, M. A. Segundo, S. Reis, J. L. Lima, J. M. Estela, V. Cerd, *Anal. Chem.* **2007**, 79, 3933.
- [12] R. Anderson, H. A. Eftychis, A. Weiner, G. H. Findlay, *Dermatologica* **1987**, 175, 229.
- [13] G. Serrano, J. M. Fortea, J. M. Latasa, O. SanMartin, J. Bonillo, M. A. Miranda, *J. Am. Acad. Dermatol.* **1992**, 26, 545.
- [14] M. Gebhardt, Z. U. Wollina, *Rheumatol.* **1995**, 54, 405.
- [15] C. Bayerl, R. Pagung, E. G. Jung, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **1998**, 14, 167.
- [16] G. B. Serrano, A. Aliaga, E. Garallo, C. Pelufo, *J. A. Acad. Dermatol.* **1984**, 11, 113.
- [17] J. Bordner, P. D. Hammen, E. B. Whipple, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 6572.
- [18] J. M. Geckle, D. M. Rescek, E. B. Whipple, *Magn. Reson. Chem.* **1989**, 27, 150.
- [19] E. Redenti, M. Zanol, P. Ventura, G. Fronza, A. Comotti, P. Taddei, A. Bertoluzza, *Biospectroscopy* **1999**, 5, 243.
- [20] T. -K. Novak, J. Kokosi, B. Podanyi, B. Noszal, R. -S. Tsai, G. Lisa, P.-A. Carrupt, B. Testa, *Helv. Chim. Acta* **1995**, 78, 553.
- [21] J. Ho, M. Coote, M. Franco-Pérez, R. Gómez, *J. Phys. Chem. A*, **2010**, 114, 11992.
- [22] M. Franco-Pérez, R. Moya-Hernández, A. Rojas-Hernández, A. Gutiérrez, R. Gómez-Balderas, *J. Phys. Chem. B*, **2011**, 115, 13593.
- [23] R. S. Tsai, P. A. Carrupt, N. El Tayar, Y. Giroud, P. Andrade, B. Testa, F. Brée, J. P. Tillement, *Helv. Chim. Acta* **1993**, 76, 842.
- [24] D. Rodríguez-Barrientos, A. Rojas-Hernandez, A. Gutierrez, R. Moya-Hernandez, R. Gomez-Balderas, M. T. Ramirez-Silva, *Talanta* **2009**, 80, 754.
- [25] P. Luger, K. Daneck, W. Engel, G. Trummelitz, K. Wagner, *Eur. J. Pharm. Sci.* **1996**, 4, 175.

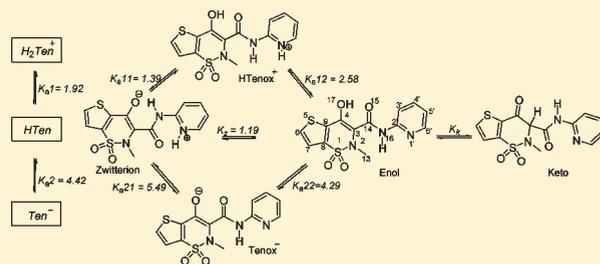
- [26] S. Defazio, R. Cini, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2002**, 1888.
- [27] S. Walter, E. Liedl, P. Weiss-Greiler, H. Viernstein, A. Wolschann, *Int. J. Pharm.* **2009**, 381, 146.
- [28] H. Ki, H. Choi, *Arch. Pharm. Res.* **2007**, 30, 215.
- [29] R. Banerjee, M. Sarkar, *J. Lumin.* **2002**, 99, 255.
- [30] H. Chakraborty, M. Sarkar, *Biophys. Chem.* **2007**, 125, 306.
- [31] S. M. Andrade, S. M. B. Costa, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1999**, 1, 4213.
- [32] R. Banerjee, H. Chakraborty, M. Sarkar, *Spectrochim. Acta Part A* **2003**, 59, 1213.
- [33] R. Banerjee, M. Sarkar, *J. Lumin.* **2002**, 99, 255.
- [34] S. M. Andrade, S. M. B. Costa, *Prog. Colloid Polym. Sci.* **1996**, 100, 195.
- [35] S. M. Andrade, S. M. B. Costa, R. Pansu, *Photochem. Photobiol.* **2000**, 71, 405.
- [36] M. Gil, A. Douhal, *Chem. Phys.* **2008**, 350, 179.
- [37] (a) K. F. de Souza, J. A. Martins, F. B. T. Pessine, R. Custodio, *Spectrochim. Acta A* **2010**, 75, 901; (b) K. F. de Souza, J. A. Martins, F. B. T. Pessine, R. Custodio, *Spectrochim. Acta A* **2010**, 75, 901; (c) R. B. Alencastro, M. D. M. Neto, *Int. J. Quantum Chem.* **1995**, 56, 123.
- [38] K. Takács-Novák, K. Y. Tam, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* **2000**, 21, 1171.
- [39] K. S. David, A. Hemeryck, N. Tancrez, L. Toupet, J. A. G. Williams, I. Ledoux, J. Zyss, A. Boucekkine, J. P. Guégan, H. L. Bozec, O. Maury, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 12243.
- [40] I. Ciofini, P. P. Lainé, F. Bedioui, C. Adamo, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 10763.
- [41] A. S. Tiwary, A. K. Mukherjee, *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **2008**, 859, 107.
- [42] T. F. Miao, S. Li, J. Cai, *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **2008**, 855, 45.
- [43] C. Adamo, V. Barone, *J. Chem. Phys.* **1999**, 110, 6158.
- [44] D. Jacquemin, E. A. Perpète, G. E. Scuseria, I. Ciofini, C. Adamo, *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, 4, 123.
- [45] J. Andzelm, B. C. Rinderspacher, A. M. Rawlett, J. Dougherty, R. Baer, N. Govind, *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, 5, 2835.
- [46] V. B. Delchev, *J. Mol. Model.* **2010**, 16, 749.
- [47] R. G. Parr, W. Yang, *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*; Oxford University Press: New York, **1989**; pp. 169–200.
- [48] E. K. U. Gross, J. F. Dobson, M. Petersilka, *Density Functional Theory, Vol. 181*; Springer:Berlin, **1996**; pp. 81–172.
- [49] M. E. Casida, C. Jamorski, K. C. Casida, D. R. Salahub, *J. Chem. Phys.* **1998**, 108, 4439.
- [50] (a) M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, *2002 J. Phys. Chem. A*, **2010**, 114, 44; (b) Ho et al., J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, Gaussian 09, R. A.; Gaussian: Wallingford, CT, **2009**.
- [51] M. M. Francl, W. J. Pietro, W. J. Hehre, J. S. Binkley, D. J. DeFrees, J. A. Pople, M. S. Gordon, *J. Chem. Phys.* **1982**, 77, 3654.
- [52] M. Cossi, N. Rega, G. Scalmani, V. Barone, *J. Comp. Chem.*, **2003**, 24, 669.
- [53] (a) A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648; (b) A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648.
- [54] T. Mussini, K. Covington, P. Longhi, S. Rodinini, *Pure Appl. Chem.* **1985**, 57, 865.
- [55] F. H. Verhoek, *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, 58, 2577.
- [56] N. Viart, J. L. Rehspringer, *J. Non-Cryst. Solids* **1996**, 195, 223.

Received: 11 March 2012
 Revised: 24 June 2012
 Accepted: 3 July 2012
 Published online on Wiley Online Library

Tautomeric Ratio and Prototropic Equilibrium Constants of Tenoxicam, a ^1H and ^{13}C NMR Theoretical and Experimental StudyMarco Franco-Pérez,[†] Rosario Moya-Hernández,[†] Alberto Rojas-Hernández,[‡] Atilano Gutiérrez,[‡] and Rodolfo Gómez-Balderas^{*,†}[†]Laboratorio de Físicoquímica Analítica, Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FES Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 54714, México[‡]Departamento de Química, Área de Química Analítica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Apartado Postal 55-534, 09340 México, D.F., México

Supporting Information

ABSTRACT: The determination of the micro-equilibrium prototropic constants is often a tough task when the tautomeric ratio favors one of the species or when the chemical exchange is not slow enough to allow the quantitative detection of the tautomeric species. There are just few experimental methods available to reveal the constants of the tautomeric micro-equilibria; its applicability depends on the nature of the tautomeric system. A combination of experimental and quantum chemistry calculated ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts is presented here to estimate the population of the species participating in the tautomeric equilibria of the tenoxicam, an important anti-inflammatory drug. A multivariate fitting of a fraction-mol-weighted contribution model, for the NMR chemical shifts of the species in solution, was used to find the populations of the tautomers of tenoxicam. To consider and evaluate the effect of the solvent polarity on the tautomers' populations, experimental determinations were carried out in DMSO- d_6 , in an equimolar DMSO-H $_2$ O mixture of deuterated solvents and in D $_2$ O. Additionally, by employing HYPNMR, it has been possible to refine the acid-base macroscopic constants of tenoxicam.



INTRODUCTION

Tenoxicam is a widely used anti-inflammatory and antiarthritic drug belonging to the oxicams family, whose pharmacological activity is related to the inhibition of the cyclooxygenase active site of the prostaglandin H synthase (PGH'S) enzyme, by competing with the substrate araquidonate.^{1,2} A particular characteristic of tenoxicam, piroxicam, and meloxicam, other drugs of the same family, is to induce membrane fusion at a concentration relevant to the physiological concentration range,^{3,4} and this property has never been seen for other families of drugs. Prototropic equilibria of oxicams are of chemical and biological fundamental interest because drug pharmacological activity and its ability to transfer through the phospholipid membranes of cells depend on their state of ionization and acid-base properties. The prototropic equilibria of tenoxicam are shown in Figure 1; besides the neutral tautomers (keto, enol, and zwitterion), the acid (H_2Ten^+) and basic (Ten^-) species are also involved.

Knowledge of the prototropic equilibria constants provides essential physicochemical information on the behavior of oxicams in solution; experimental tools are commonly employed to characterize these equilibria. There exist a number of reports on the determination of macroscopic acidity constants (K_{a1} , K_{a2} , Figure 1) for several oxicams (like tenoxicam, piroxicam, and lornoxicam), for example, by means of UV-visible spectrophotometry,^{5,6}

zone capillary electrophoresis,⁷ and nuclear magnetic resonance (NMR),^{7,8} which show consistency, independently of the experimental method employed. The so-called deductive method has been applied to determine the tautomerization constant K_z and the other microscopic constants K_{a11} , K_{a12} , K_{a21} , and K_{a22} .⁹ This method consists of measuring the acidity constant of a derivate in which one of the protonation sites has been previously complexed. For instance, the K_{a12} of piroxicam has been deduced from the acidity constant of the *o*-methyl piroxicam, a piroxicam derivative.⁹ Assuming that the electrostatic effects enhancing the acidity of the enolic OH group in piroxicam are of the same magnitude as in tenoxicam and lornoxicam, Tsai et al. calculated the tautomeric constant K_z of these two oxicams by UV-visible spectrophotometry.⁵ We have not found another experimental study about the values of the tautomerization constants K_z or K_k of tenoxicam.

The determination of the tautomerization constants in solution is often a tough task because the tautomeric ratio frequently favors one of the neutral species, making difficult the quantitative detection of the other tautomer(s). In many cases, the tautomers

Received: May 25, 2011

Revised: September 27, 2011

Published: October 10, 2011

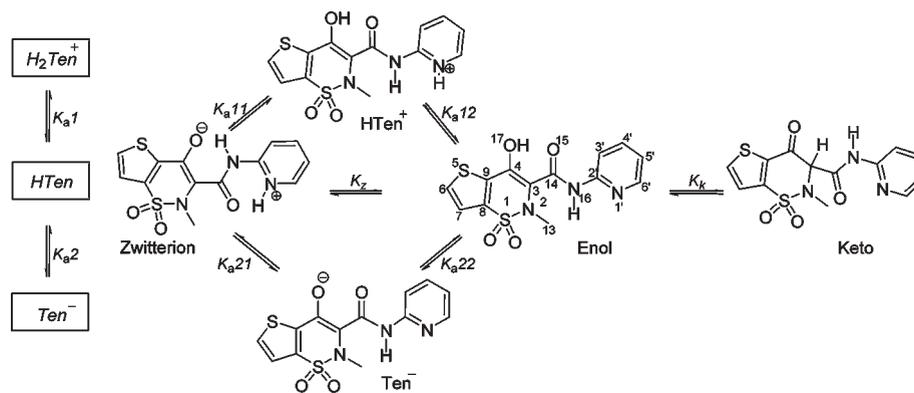


Figure 1. Prototropic equilibria for tenoxicam.

of a compound display different solubilities in a given solvent. This fact becomes an advantage for obtaining the tautomerization constant. The tautomeric ratio in aqueous solutions is determined by taking the UV–visible spectra of solutions prepared in mixtures of water and some organic solvent at different proportions. Then, extrapolating to zero concentration of organic solvent, the tautomeric ratio in water is found.⁹ However, there is no guarantee that the absorption coefficient of a particular tautomer, measured in an organic solvent, remains the same when it is either in water or in the different solvent mixtures; actually, it has been reported that for the oxamicams the spectral properties are extremely sensitive to solvent properties.^{10,11} Moreover, an unambiguous spectral assignment for the tautomers is necessary in each prepared solvent to be able to calculate the tautomeric constant.⁸ Furthermore, there is no guarantee of a linear relationship between the ratio of tautomers and the amount of organic solvent.

NMR is a versatile technique used to investigate the molecular and electronic structure of chemical compounds. A chemical exchange process, approaching the fast limit on the NMR scale, is exhibited as a field-dependent signal broadening. The polarity of the solvent may improve signal differentiation by favoring the predominance of one species over the others. Because of its high sensitivity and its ability to provide detailed information, NMR chemical shifts have been applied to investigate tautomerization equilibria.^{12,13} In general, chemical shifts are sensitive to solvent polarity and sensitive enough to geometry, allowing tautomer differentiation by NMR. Geckler et al. studied the tautomeric stability of piroxicam by NMR spectroscopy.¹⁴ At 205 K, a mole fraction of 0.19 for the zwitterion was found in a solution of *N,N'*-dimethylformamide (DMF). In the same solvent, but at room temperature, the mole fraction of the zwitterion was reduced to about 0.1, while in dimethylsulfoxide (DMSO), it was about 0.25. In contrast, in chloroform, the solution was shown to be composed mainly by the enol tautomer. Furthermore, they note that addition of small amounts of water to a DMSO solution increases zwitterionization. Results show that the zwitterion mole fraction can be favored by increasing the polarity of the medium. This zwitterionization has also been reported for the polymorphs of piroxicam. Solid-state and DFT NMR spectroscopy studies^{15,16} show that the change from the colorless crystal form to a yellow crystal form of piroxicam is due to a conversion of the enol molecular structure into the zwitterionic form by a solid-state transfer of the hydroxyl proton on the thiazine ring oxygen to produce the pyridinium center at the

pyridine nitrogen. The colorless crystal has one enol molecule per asymmetric unit in the space group $P21/c$, and the yellow has two zwitterion molecules per asymmetric unit in the space group $P\bar{1}$.

In a theoretical and experimental fluorescence spectroscopic study, Ferreira de Souza et al. performed a conformational analysis of the keto and enol tautomeric structures of piroxicam in nonpolar aprotic solvents.¹⁷ Their results suggest that the lower energy structures in the gas phase correspond to the keto and enol tautomers, the last being near 10 kcal/mol more stable than the former. Additionally, they conclude that, although the enol conformer is responsible for the piroxicam electronic transitions, the keto tautomer coexists in solution with the enol in a ratio that depends on the polarity of the medium. Even so, with the enol being the energetically most stable tautomer, it is considered as the most abundant species.

Due to the charge distribution of the tenoxicam zwitterion structure, it will show a higher dipole moment than the keto or the enol species. Consequently, it is expected to be the most abundant tautomer in polar solvents. As the polarity of the medium decreases, the populations of the keto and enol tautomers should increase. However, when the structure of the enol is more stable than the keto, the enol proportion might be higher than the keto in solution.

Lately, advances made in theoretical chemistry methods allow accurate reproductions of NMR shielding constants,¹⁸ the source of the chemical shifts. These can be obtained using theoretical high-level and density functional methods.^{19–22} It has been reported that accuracy of ¹H chemical shifts between theory and experiment is less than 1 ppm, while for ¹³C, it is somewhat less, 3–10 ppm, depending on the method and basis set.^{20–22} Taking this advantage, some studies have analyzed conformational and tautomeric mixtures of compounds using calculated shielding constants.^{23,24} However, the calculation of the populations in a conformational or tautomeric mixture, employing theoretically computed and experimental chemical shifts, has not yet been explored.

The aim of this contribution is to determine the populations of keto, enol, and the zwitterion tautomers at the pH value where the neutral species of tenoxicam are predominant (isoelectric point), using the values of the shielding constants of these species obtained by quantum chemistry methods and the corresponding chemical shifts experimentally measured. To consider and evaluate the effect of the solvent polarity on the species' populations, we have carried out our determinations in DMSO-*d*₆, in an equimolar DMSO–H₂O mixture of deuterated solvents, and in

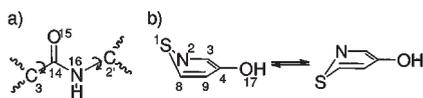


Figure 2. (a) Explored rotations for the tautomeric species of tenoxicam. (b) Thiazine ring half-chair conformations.

D₂O. Additionally, all the macro- and microconstants of the equilibria displayed in Figure 1 have been calculated. We will employ a multivariate fitting in order to obtain the species' populations in solution.

METHODOLOGY

Experimental Methods. NMR spectra were recorded at 298 K on a Bruker AVANCE III 500 NMR spectrometer, 11.7 T, 500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C, using a 5 mm BB-ID z-gradient probe. Chemical shifts δ (in parts per million) are given from internal TMS. The HSQC and HMBC spectra allowed the unambiguous assignment of the ¹³C NMR shifts; assignment was also verified by comparing with theoretical results. Thus, the NMR $\delta^{13}\text{C}$ of a 10⁻³ M DMSO-*d*₆ solution of tenoxicam was revealed. For the ¹H and ¹³C NMR tenoxicam spectrum in the equimolar solution of deuterated DMSO–H₂O, 50 mg of tenoxicam was dissolved in 1 mL of DMSO-*d*₆/D₂O 4:1 (v/v) solution. Aliquots of deuterated HCl or NaOH solutions were added properly for changing the pH of the medium, maintaining the equimolar ratio between solvents. The ¹H NMR spectrum of tenoxicam in deuterated water was obtained for a 10⁻³ M solution of the drug in a system composed by D₂O and deuterated perchloric acid (pH 0.56). The pH was increased by adding a solution of 0.3 M sodium deuteroxide. Due to the low solubility of tenoxicam in D₂O, the ¹³C NMR spectrum was not recorded.

Quantum Chemistry Methods. Chemical shifts calculations for the tautomeric and ionic species (Figure 1) were computed using molecular quantum chemistry methods within the frame of the density functional theory.²⁵ Calculations were performed with the G03²⁶ and G09²⁷ suite of programs. For each tautomer, the conformational stability related to the rotations present in the C3–C14 and N16–C2' bonds (see Figures 1 and 2), as well as the conformational analysis of the thiazine half-chair (S1–C8, Figure 2), was carried out employing the B3LYP²⁸ functional and the 6-31+G(d)²⁹ basis set. Resulting structures were optimized in the gas phase using the same functional but with a larger basis set, 6-311++G(d,p). We confirm that all of the structures corresponded to a minimum on the potential energy surface (PES) by an analysis of vibrational frequencies. Then, the B3LYP/6-311++G(d,p) geometries in water and DMSO were obtained by reoptimization of the gas phase structures, considering the solvent effect with the polarizable continuum model (PCM),³⁰ using the default G09 settings for the pure solvents. To model the equimolar DMSO–H₂O mixture, the values of 64.02 for the static dielectric constant, 4.9 for the dielectric constant at infinite frequency, and 1098 g/mL for density were employed.^{31,32} Moreover, a value of 3.05 Å was used for the molecular radius of the solvent. In order to assess the effect of the functional on the final population of each tautomeric species, we have calculated the shielding constants with the PW91,³³ B3LYP, O3LYP,³⁴ OLYP,³⁴ OPBE,^{35–37} and OPW91^{33,37} density functionals, which have been proven to give the best accuracy in comparative studies for calculating chemical shifts.^{38,39} In our calculations of

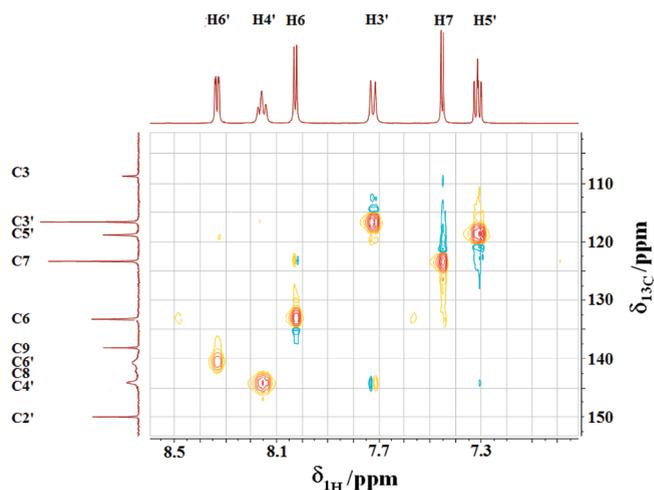


Figure 3. Two-dimensional HMBC gradients for tenoxicam at the pH 3.17 in the equimolar solution of deuterated DMSO–H₂O mixture.

shielding constants, we use the 6-311++G(d,p) basis set and the gauge invariant atomic orbital (GIAO)^{40,41} scheme as well as the PCM method to model the solution environment in which the experiment was carried out.

Determination of the Tautomeric Populations of Tenoxicam. If the species in solution are related through fast chemical exchange equilibria, the overall response to an external perturbation will be the average of the individual responses of those species involved in the equilibria, with weights equal to the mole fractions of those species. When tenoxicam is at its isoelectric point in solution, we have its neutral tautomeric species: keto (K), enol (E), and zwitterion (Z) in equilibrium. Under such circumstances, the recorded chemical shift for the *i* nucleus (δ_i) comes from the contribution of the individual chemical shifts of each tautomer (δ_i^{K} , δ_i^{E} , δ_i^{Z}) weighted by the corresponding mole fraction (f^{K} , f^{E} , f^{Z}):

$$\langle \delta_i^{\text{KEZ}} \rangle = f^{\text{K}} \delta_i^{\text{K}} + f^{\text{E}} \delta_i^{\text{E}} + f^{\text{Z}} \delta_i^{\text{Z}} \quad (1)$$

Clearly, if we could know the individual chemical shifts (δ_i^{K} , δ_i^{E} , δ_i^{Z}) of all the nuclei of the tautomers in a given solvent, and the corresponding chemical shift of the same nuclei in a mixture of tautomers in the same solvent, we could use eq 1 to compute the mole fraction of each tautomeric species by means of a multivariate fitting. However, as it has been discussed, knowing individual chemical shifts is not straightforward. This shortcoming can be overcome by theoretical calculation of the individual chemical shifts, using them as auxiliary information together with experimental measurements to obtain the mole fractions by means of a multivariate fitting based on eq 1. The resulting mole fractions will be those for which the mean of the sum of squared residuals (mSSR) takes its minimum value (eq 2).

$$\min \sum \frac{(\langle \delta_i^{\text{KEZ}} \rangle_t - [f^{\text{K}} \delta_i^{\text{K}} + f^{\text{E}} \delta_i^{\text{E}} + f^{\text{Z}} \delta_i^{\text{Z}} + \beta])^2}{N - P} \quad (2)$$

N is the number of magnetically active nuclei considered, *P* is the number of parameters included in the multivariate fitting, and β is the intercept estimator. The estimator β would be zero if the experimental chemical shifts for the individual tautomers were used. In addition, the possible values for the mole fractions should fulfill the conditions $f^{\text{K}}, f^{\text{E}}, f^{\text{Z}} \geq 0$ and $f^{\text{K}} + f^{\text{E}} + f^{\text{Z}} = 1$.

Table 1. Experimental ^1H and ^{13}C Chemical Shifts of Tenoxicam in the Three Studied Media

	$\delta^1\text{H}$ (ppm)			$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ^a	
	DMSO	mixture	water	DMSO	mixture
3				108.93	108.76
4				163.07	164.92
6	8.03	7.95	7.91	132.73	133.44
7	7.46	7.41	7.46	122.87	123.50
8				137.65	138.03
9				141.70	143.30
13	2.9	2.89	2.96	39.17	39.98
14				165.60	166.06
2'				149.50	149.60
3'	7.73	7.65	7.52	116.10	116.75
4'	8.16	8.19	8.3	143.56	145.51
5'	7.31	7.34	7.45	118.43	119.16
6'	8.34	8.28	8.26	140.24	139.37

^a Because of the low solubility of tenoxicam, ^{13}C NMR chemical shifts were not determined in water. The mixture is a DMSO– H_2O equimolar system. All solvents are deuterated.

RESULTS AND DISCUSSION

Tautomeric Equilibria of Tenoxicam. Since the use of the eq 1 and minimization through eq 2 imply the unambiguous experimental assignment of the chemical shifts of tenoxicam, 2D heteronuclear multiple bond correlation was used to assign the ^{13}C NMR spectra (Figure 3). Table 1 shows the experimental chemical shift values for ^1H and ^{13}C nuclei of tenoxicam, obtained in the DMSO, DMSO– H_2O , and H_2O deuterated solvents. In general, changes in the chemical shifts between the different media are small but perceptible, as can be noted from data in Table 1. It can be observed that chemical shifts of different nuclei behave independently of the polarity of the solvent; for example, as the amount of water increases, the chemical shift value of $\text{H}5'$ also increases from 7.31 to 7.45 ppm; in contrast, the shift of $\text{H}6$ decreases going from 8.03 to 7.91 ppm. The lowest value of $\text{H}13$ chemical shift (2.89 ppm) is in the solvent mixture. Both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^1\text{H}$ chemical shifts of the methyl moiety at position 13 in the molecule of tenoxicam have been discarded in our statistical analysis because they are too small in value as compared with to the other $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^1\text{H}$ chemical shifts, respectively.

At this point, it is convenient to advance that the tautomeric mole fractions obtained by our statistical treatment are practically the same regardless of the functional used to compute the magnetic shielding constants. Since, in general, the chemical shifts calculated with the O3LYP density functional produce the lowest mSSR, the following analysis of results is based on the chemical shifts calculated with this functional. Similar conclusions are derived with results from the other density functionals considered here (see Supporting Information, Tables S1, S2, and S3).

Applying the mentioned multivariate fitting procedure using the $\delta^{13}\text{C}$ chemical shifts of tenoxicam, we observe (Table 2) that both the DMSO and DMSO/ H_2O solutions are enriched with the zwitterion tautomer (mole fractions of 0.61 and 0.73, respectively), while the enol species is the second in abundance (0.39 and 0.27, respectively) and keto is not present (since its

Table 2. Estimated Mole Fractions for the Three Tautomers of Tenoxicam in the Studied Media (Results Obtained by Using the O3LYP Functional)

	DMSO			mixture			water		
	K	E	Z	K	E	Z	K	E	Z
$\delta^{13}\text{C}$	0.00	0.39	0.61	0.00	0.27	0.63			
$\delta^1\text{H}$	0.35	0.00	0.65	0.26	0.00	0.74	0.07	0.00	0.93
$\delta^1\text{H}^d$		0.28	0.72		0.21	0.78		0.06	0.94

^d The keto chemical shifts are not considered for the multivariate fitting.

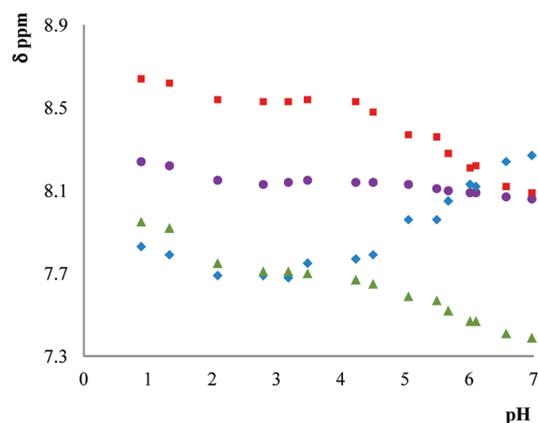


Figure 4. Dependence on pH of some ^1H NMR chemical shifts: $\text{H}6$ (purple circle), $\text{H}3'$ (blue diamond), $\text{H}4'$ (red square), $\text{H}5'$ (green triangle).

population is practically zero) in these two media ($\delta^{13}\text{C}$ was not recorded in the water solution of tenoxicam). The computed tautomeric population ratios of zwitterion/enol that provides the minimum value of mSSR in the DMSO (mSSR = 3.730) and in the DMSO/ H_2O (mSSR = 3.864) solutions are 1.56 and 2.70, respectively. Note that, as expected, the abundance of the zwitterion tautomer is increased as the amount of water increases.

Now, using the $\delta^1\text{H}$ chemical shifts of tenoxicam in the statistical analysis, we observe that the population of the zwitterion tautomer is increased with the amount of water, such as is indicated by the $\delta^{13}\text{C}$ analysis. However, opposite to the results observed with $\delta^{13}\text{C}$ shifts, the bigger fraction of tenoxicam after the zwitterion is the keto. The predicted tautomeric zwitterion/keto ratios are 1.86, 2.85, and 13.29 in DMSO, DMSO/ H_2O , and H_2O , respectively. It is worth noting that, for the applied multivariate fitting, there is two times more data for $\delta^{13}\text{C}$ than for $\delta^1\text{H}$ (12 versus 6). Besides that, there are more carbon atoms in the tautomerization site (C3, C4, C14 and all carbons of the pyridyl ring) than hydrogens (only those hydrogens of the pyridyl moiety). For these reasons, we consider that results with $\delta^{13}\text{C}$ chemical shifts are more significant than those obtained with $\delta^1\text{H}$ shifts. Therefore, we consider that is the enol instead of the keto that coexists with the zwitterion species. Consequently, we perform the multivariate fitting using the $\delta^1\text{H}$ chemical shifts, now considering that we have just the zwitterion and enol tautomers in solution. The population zwitterion/enol ratios computed taking this consideration are 2.57, 3.55, and 15.67 in DMSO, DMSO/ H_2O , and H_2O , respectively. They differ as much as one part in 10 to those observed when the statistical

Table 3. Comparison of the Micro- and Macroconstants of Tenoxicam in Aqueous Solution and in the Equimolar Mixture DMSO–H₂O, Obtained in This Study with Those Reported by Several Authors

	aqueous solution					mixture	
	ref 5	ref 3	ref 38	ref 39	this study	ref 5	this study
pK _{a1}	1.34 ± 0.07	1.07	1.1	1.08	1.36 ± 0.100	1.92 ± 0.15	
pK _{a2}	5.26 ± 0.03	5.34	5.12	5.31	5.46 ± 0.038	4.42 ± 0.07	
log K _z		2.17	1.46	1.62	1.19		0.10
pK _{a11}		1.07	1.12	1.09	1.39		2.18
pK _{a12}		3.24	2.58	2.71	2.58		2.27
pK _{a21}		5.34	5.1	5.32	5.49		4.68
pK _{a22}		3.17	3.64	3.7	4.29		4.58

analysis is carried out using the $\delta^{13}\text{C}$ shifts. Therefore, the tautomeric zwitterion/enol ratios in DMSO (1.56) and DMSO/H₂O (2.70) were taken from the multivariate fitting using the $\delta^{13}\text{C}$ chemical shifts. It was not possible to record the $\delta^{13}\text{C}$ shifts of tenoxicam in water because of its low solubility. Thus, the tautomeric mole fraction zwitterion/enol ratio in aqueous solution was taken from results using the $\delta^1\text{H}$ shifts (15.67) in this solvent.

Determination of the Macroscopic and Microscopic Constants of Tenoxicam in Aqueous Solution. Figure 4 shows the experimental dependence of ^1H NMR chemical shifts with respect to the pH variation in aqueous solution for the H6, H3', H4', and H5' hydrogen nuclei. The response is the typical sigmoidal curve observed in an acid–base titration. Consequently, we use the chemical shifts of H3', H4', and H5' nuclei, measured at different pH values, to obtain the macroscopic acidity constants of the drug (K_{a1} and K_{a2} , Figure 1) by using the statistical adjustment program HYPNMR.⁴² Results are shown in Table 2. It is noteworthy that our results ($\text{p}K_{a1} = 1.36$, $\text{p}K_{a2} = 5.46$) are very close to those previously reported in the literature by other experimental methods.⁵

Since the tautomerization constant K_z can be obtained from the tautomeric ratio value, it is possible to know the value of the microconstant equilibria involved in Figure 1 (considering that the keto tautomer is not present in the solution) using eqs 3a–3c. These results are shown in Table 3, where we have included those obtained in other studies for comparison. Additionally, using the K_{a1} and K_{a2} values of tenoxicam reported in the DMSO–H₂O equimolar mixture in a previous study,⁷ we calculate the values of the microconstants in the solvents mixture.

$$K_{a1} = K_{a11} + K_{a12} \quad (3a)$$

$$\frac{1}{K_{a2}} = \frac{1}{K_{a22}} + \frac{1}{K_{a21}} \quad (3b)$$

$$K_z = K_{a11}/K_{a12} = K_{a22}/K_{a21} \quad (3c)$$

It should be noted that only the microconstant values of ref 5 were obtained through experimentation, by the assumption that the electrostatic effects enhancing the acidity of the enolic OH group in piroxicam are of the same magnitude as in tenoxicam. The values of $\log K_z$ here obtained are closer to those in refs 43 and 44, which were obtained by theoretical and computational

methods. In general, a good agreement is observed between the microconstant values of refs 5, 43, and 44, as well as with that obtained in this study; however, the tautomeric constant K_z of ref 3 is higher by almost 1 order of magnitude.

CONCLUSIONS

The results of this study suggest that the zwitterion is the most abundant tautomer of tenoxicam in the three considered solution media. The enol tautomer is the second in abundance, and the keto tautomer probably is absent in these media. Additionally, we have seen a clear dependence of tautomeric population of tenoxicam calculated by means of eq 1 to the polarity of the media. This dependence is consistent with that initially expected in this study and with the results previously reported for other oxicams like piroxicam.¹⁴ An important feature in the use of eq 2 is that populations obtained this way are almost the same regardless of the functional employed to the calculation of the shielding constants. The observed dependence of the chemical shift to the pH allows us to obtain the macroconstants of the drug in aqueous solution, and with the tautomeric ratio obtained as well as a previous report of the macroconstants in the DMSO–H₂O mixture, we were able to compute the microconstants of tenoxicam in these two media, obtaining consistent results with previous reports.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information. Statistical analysis and tautomeric populations obtained with the PW91, B3LYP, O3LYP, OLYP, OPBE, and OPW91 density functionals. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: gomezr@gmail.com. Phone: (+52 55) 56231999.

ACKNOWLEDGMENT

We gratefully acknowledge DGCTIC-UNAM for supercomputing resources, and projects DGAPA-UNAM (PAPIIT IN222011) and FES-CUAUTITLAN (PACIVE CG11) for financial support. M.F.-P. acknowledges CONACyT for a Ph.D. scholarship.

REFERENCES

- (1) Vane, J. R.; Botting, R. M.; Bakhle, Y. S. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1988**, *38*, 97–120.
- (2) Park, J. Y.; Pillinger, M. H.; Abramson, S. B. *Clin. Immunol.* **2006**, *119*, 229–240.
- (3) Mondal, S.; Sarkar, M. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 16323–16331.
- (4) Chakraborty, H.; Mondal, S.; Sarkar, M. *Biophys. Chem.* **2008**, *137*, 28–34.
- (5) Tsai, R. S.; Carrupt, P. A.; el Tayar, N.; Giroud, Y.; Andrade, P.; Testa, B. *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 842–854.
- (6) Luger, P.; Daneck, K.; Engel, W.; Trummlitz, G.; Wagner, K. *Eur. J. Pharm. Sci.* **1996**, *4*, 175–187.
- (7) Rodriguez-Barrientos, D.; Rojas-Hernandez, A.; Gutierrez, A.; Moya-Hernandez, R.; Gomez-Balderas, R.; Ramirez-Silva, M. T. *Talanta* **2009**, *80*, 754–762.
- (8) Takacs-Novak, K.; Kokosi, J.; Podanyi, B.; Noszal, B.; Tsai, R.-S.; Lisa, G.; Carrupt, P.-A.; Testa, B. *Helv. Chim. Acta* **1995**, *78*, 553–562.

- (9) Takács-Novák, K.; Tam, K. Y. *J. Pharma. Biomed. Anal.* **2000**, *21*, 1171–1182.
- (10) Banerjee, R.; Chakraborty, H.; Sarkar, M. *Spectrochim. Acta, Part A* **2003**, *59*, 1213–1222.
- (11) Gil, M.; Douhal, A. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 8231–8237.
- (12) Janke, E. M. B.; Schlund, S.; Paasche, A.; Engels, B.; Dede, R.; Hussain, I.; Langer, P.; Rettig, M.; Weisz, K. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 4878–4881.
- (13) Sečkářová, P.; Marek, R.; Maliňáková, K.; Kolehmainen, E.; Hocková, D.; Hocek, M.; Sklenář, V. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 6259–6263.
- (14) Geckle, J. M.; Rescek, D. M.; Whipple, E. B. *Magn. Reson. Chem.* **1989**, *27*, 150–154.
- (15) Sheth, A. R.; Lubach, J. W.; Munson, E. J.; Muller, F. X.; Grant, D. J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6641–6651.
- (16) Liu, W.; Wang, W. V.; Wang, W.; Bai, S.; Dybowski, C. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 16641–16649.
- (17) Souza, K. F.; de Martins, J. A.; Pessine, F. B.T.; Custodio, R. *Spectrochim. Acta, Part A* **2010**, *75*, 901–907.
- (18) Bagno, A.; Saielli, G. *Theor. Chem. Acc.* **2007**, *117*, 603–619.
- (19) Auer, A. A.; Gauss, J.; Stanton, J. F. *J. Chem. Phys.* **2003**, *118*, 10407–10417.
- (20) Allen, M. J.; Keal, T. W.; Tozer, D. *J. Chem. Phys. Lett.* **2003**, *380*, 70–77.
- (21) Keal, T. W.; Tozer, D. *J. Chem. Phys.* **2003**, *119*, 3015–3024.
- (22) Poater, J.; van Lenthe, E.; Baerends, E. J. *J. Chem. Phys.* **2003**, *118*, 8584–8593.
- (23) Harris, C. D.; Holder, A. J.; David Eick, J.; Chappelow, C. C.; Stansbury, J. W. *J. Mol. Graphics Modell.* **2000**, *18*, 567–580.
- (24) Gryff-Keller, A.; Szczeciński, P. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **2010**, *967*, 94–98.
- (25) Parr, R. G.; Yang, W. *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*; Oxford University Press: New York, 1989.
- (26) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A., Jr.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. *Gaussian 03*, revision C.02; Gaussian: Wallingford, CT, 2004.
- (27) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A., Jr.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J. *Gaussian 09*; Gaussian Inc.: Wallingford, CT, 2009.
- (28) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652.
- (29) Francl, M. M.; Pietro, W. J.; Hehre, W. J.; Binkley, J. S.; DeFrees, D. J.; Pople, J. A.; Gordon, M. S. *J. Chem. Phys.* **1982**, *77*, 3654–3665.
- (30) Cossi, M.; Rega, N.; Scalmani, G.; Barone, V. *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 669–681.
- (31) Kaatz, U.; Pottel, R.; Schafer, M. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 5623–5627.
- (32) Yang, L. J.; Yang, X. Q.; Huang, K. M.; Jia, G. Z.; Shang, H. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, *10*, 1261–1270.
- (33) Perdew, J. P.; Wang, Y. *Phys. Rev. B* **1992**, *45*, 13244–13249.
- (34) Cohen, A. J.; Handy, N. C. *Mol. Phys.* **2001**, *99*, 607–615.
- (35) Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M. *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *77*, 3865–3868.
- (36) Swart, M.; Ehlers, A. W.; Lammertsma, K. *Mol. Phys.* **2004**, *102*, 2467–2474.
- (37) Handy, N. C.; Cohen, A. J. *Mol. Phys.* **2001**, *99*, 403–412.
- (38) Vila, J. A.; Baldoni, H. A.; Scheraga, H. A. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 884–892.
- (39) Zhang, Y.; Wu, A.; Xu, X.; Yan, Y. *Chem. Phys. Lett.* **2006**, *421*, 383–388.
- (40) Ditchfield, R. *Mol. Phys.* **1974**, *29*, 789–807.
- (41) Wolinski, K.; Hilton, J. F.; Pulay, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8251–8260.
- (42) Frassinetti, Ch.; Ghelli, S.; Gans, P.; Sabatini, A.; Moruzzi, M. S.; Vacca, A. *Anal. Biochem.* **1995**, *231*, 374–382.
- (43) Ho, J.; Coote, M. L.; Franco-Pérez, M.; Gómez-Balderas, R. *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 11992–12003.
- (44) Kóczyán, K.; Völgyi, G.; Kökösi, J.; Noszál, B. *Helv. Chim. Acta* **2007**, *90*, 1681–1690.

First-Principles Prediction of the pK_a s of Anti-inflammatory Oxicams

Junming Ho and Michelle L. Coote*

ARC Centre of Excellence for Free Radical Chemistry and Biotechnology, Research School of Chemistry, Australian National University, Canberra ACT 0200, Australia

Marco Franco-Pérez and Rodolfo Gómez-Balderas

Laboratorio de Físicoquímica Analítica, Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FES Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 54700, México

Received: August 20, 2010; Revised Manuscript Received: September 27, 2010

The gas- and aqueous-phase acidities of a series of oxicams have been computed by combining M05-2X/6-311+G(3df,2p) gas-phase free energies with solvation free energies from the CPCM-UAKS, COSMO-RS, and SMD solvent models. To facilitate accurate gas-phase calculations, a benchmarking study was further carried out to assess the performance of various density functional theory methods against the high-level composite method G3MP2(+). Oxicams are typically diprotic acids, and several tautomers are possible in each protonation state. The direct thermodynamic cycle and the proton exchange scheme have been employed to compute the *microscopic* pK_a s on both solution- and gas-phase equilibrium conformers, and these were combined to yield the *macroscopic* pK_a values. Using the direct cycle of pK_a calculation, the CPCM-UAKS model delivered reasonably accurate results with $MAD \sim 1$, whereas the SMD and COSMO-RS models' performance was less satisfactory with $MAD \sim 3$. Comparison with experiment also indicates that direct cycle calculations based on solution conformers generally deliver better accuracy. The proton exchange cycle affords further improvement for all solvent models through systematic error cancellation and therefore provides better reliability for the pK_a prediction of compounds of these types. The latter approach has been applied to predict the pK_a s of several recently synthesized oxicam derivatives.

Introduction

Oxicams are a class of nonsteroidal drugs (Figure 1) that exhibit anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic properties.^{1–3} They are effective in the treatment of rheumatoid arthritis, osteoarthritis, postoperative pain, and degenerative joint diseases. Furthermore, these compounds also display chemopreventive and chemosuppressive effects against various cancer cell lines and therefore represent an important class of versatile pharmaceutical drugs. The acid–base character of these compounds are particularly important for their biological activity because the ionization states of these compounds are directly determined by their pK_a values at a given pH, and this in turn controls their binding to certain enzymes as well as uptake into cells. The experimental pK_a s of these compounds have been measured using a variety of techniques, including spectrophotometric, capillary zone electrophoresis, and potentiometric methods in aqueous and aqueous–organic solvent mixtures.^{4–10}

Most oxicams were designed under the isosteric replacement principle where molecular fragments are replaced for other molecular moieties with similar stereoelectronic features with the view to optimizing their pharmacological activities. Earlier studies have found that such substitutions can have a profound influence on the physicochemical properties of these compounds such as partition constants, lipophilicity, and acid–base behavior. Computational chemistry is commonly used for studying structure–reactivity trends and provides an alternative approach for the design of more potent derivatives. In this work, we have

employed quantum chemical calculations in conjunction with various continuum solvent models to examine the acid–base behavior of these compounds in both the gas and aqueous phases.

Oxicams pose particularly significant challenges for theory as they are relatively large conformationally flexible molecules and can exist as various tautomers in each protonation state. As such, theoretical prediction of their *macroscopic* pK_a s (in order to compare with experiment) require the computation of the *microscopic* pK_a s corresponding to the possible deprotonation pathways which are then combined, taking into account the appropriate tautomeric contributions, to give the macroscopic constants. Most continuum solvent pK_a studies have been limited to small rigid acids,¹¹ whereas larger polyprotic acids especially those of biological relevance, are gaining interest.^{12,13} For example, the macroscopic pK_a constants have recently been calculated for fluorescein and its derivatives, where it was observed that the performance of the methods was somewhat sensitive to the choice of radii used to define the solute cavity.¹²

In this light, oxicams provide an interesting test for contemporary continuum solvent pK_a calculation protocols and an important objective of the present work is to identify a reliable pK_a calculation protocol, which could provide an alternative tool for studying the acid–base behavior of compounds of this type. Having identified and benchmarked computational protocols, we then apply them to the study of several recently synthesized oxicam derivatives, for which *aqueous* pK_a s are currently unknown. As part of this account, we will also derive the specific relationship between the micro- and macroscopic pK_a values of these compounds.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: mcoote@rsc.anu.edu.au.

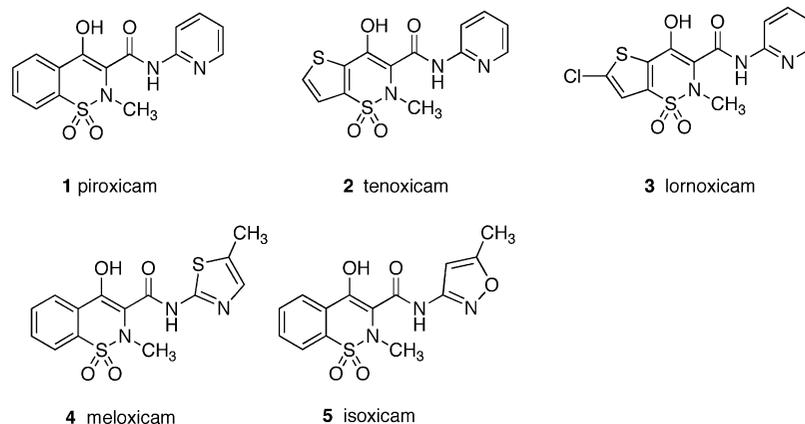


Figure 1. Chemical structures of some common oxicams.

Theoretical Procedures

pK_a Calculation Protocols. The pK_a provides a direct measure of the thermodynamic feasibility of a proton-transfer reaction in solution, which is important in many aspects of practical chemistry and biological enzymatic systems. As such, there has been much effort targeted at the development of theoretical protocols for reliable pK_a predictions. Among the various methods studied, semiempirical approaches that assume some functional form (usually linear) of the pK_a in terms of theoretical parameters are probably the most efficient.^{14–16} However, such approaches require a reasonably large data set of experimental pK_as to parametrize the model, and it is often difficult to estimate the errors when these models are used on compounds outside of their training set. As such, our focus in this paper is on methods based on thermodynamic cycles such as those shown in Scheme 1, where gas-phase reaction free energies are combined with solvation free energies in a vector addition fashion to yield the corresponding solution reaction free energies. This is a practically first-principles method where the accuracy can be systematically improved through the use of higher level electronic structure methods for gas-phase energies and/or more sophisticated solvent models for the calculation of solvation free energies. Cost effective G-*n*^{17–21} and CBS-X^{22–24} composite methods are typically used to calculate reliable gas-phase energies; however, this is sometimes not feasible for larger molecules, because of the computationally expensive QCISD(T) or CCSD(T)/6-31G(d) calculations associated with these methods. In this regard, density functional methods are also widely used in gas-phase acidity calculations, although their performance are sometimes less consistent and can vary considerably depending on the system studied. In this study, we have carried out a small assessment study to examine the performance of various density functional theory (DFT) methods for the gas-phase calculations against the G3MP2(+)-benchmark.

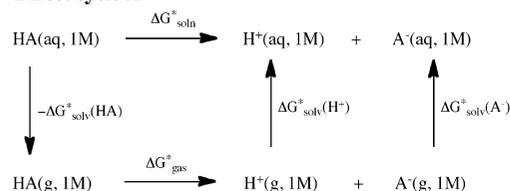
Typically, continuum solvent models such as the PCM family of continuum models, CPCM,^{25–27} IEF-PCM,^{28–31} IPCM,³² and the SMx (e.g., *x* = 6³³ and 8³⁴) series plus the latest addition, SMD,³⁵ are used to predict solvation free energies. While these models can deliver relatively accurate values of typical neutral solutes, the errors associated with ionic species are usually much larger, in the range of 16 or more kJ mol⁻¹. For this reason, the direct method for pK_a calculation (Scheme 1, cycle A) can sometimes incur large errors because of the inherent difficulties in obtaining accurate solvation free energies of ionic species, and the uncertainty associated with the experimental solvation free energy of the proton. When combined with high-level ab

initio or experimental gas-phase reaction energies, this approach performed very well for some classes of acids (e.g., carboxylic acids^{36,37} and phenols³⁸) with <1 pK_a unit accuracy, presumably because of systematic error cancellation and/or similarity to the compounds considered in the parametrization of the model. However, in our recent assessment studies, we have also found that this approach gives rise to errors in excess of 5 pK_a units on other classes of acids, e.g., carbon C–H acids.^{11,39} More sophisticated thermodynamic cycles such as those that employ explicit solvent molecules have also been explored, however; the rules for automating the number of explicit solvent molecules in the thermodynamic cycle still require further refinement.^{11,40,41} Pliego and Riveros have implemented a variational approach with the IPCM continuum model for automating the number of water molecules to add to ionic species in order to maximize their solution stability.⁴² Typically, the water molecules are hydrogen-bonded to the negatively charged atom(s) in the anion and to the hydrogen atoms in the cation. However, complications arise when the procedure is applied to larger systems, for example, where multiple hydrogen bonding sites are present and/or multiple molecular conformations are possible. In such cases, a rigorous sampling of the configuration space may be necessary to determine the optimal sites for hydrogen bonding to the ion, as well as the effect of the solvent molecules on the preferred molecular conformation.

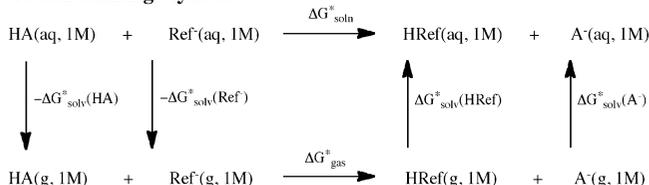
A much simpler alternative is therefore to employ a proton exchange approach shown in Scheme 1 (cycle B) where the number of ionic species is conserved across the reaction and substantial cancellation of errors incurred by the continuum solvent model can be expected. In recent assessment studies, this approach was found to provide good overall performance in the pK_a calculation of different classes of acids.^{11,39} A drawback of this approach is that its performance may depend strongly on the choice of reference acid (HRef) and the accuracy of its experimental pK_a. Nevertheless, since most oxicams are designed using the isosteric substitution principle, the proton exchange scheme should be well-suited for the pK_a prediction of compounds belonging to the same family, as in this case. In this work, we have examined the performance of both the direct and proton exchange methods in conjunction with the CPCM-UAQS, COSMO-RS, and SMD continuum solvent models for the microscopic pK_a calculation of five common oxicams: piroxicam, tenoxicam, lornoxicam, isoxicam, and meloxicam shown in Figure 1. Having identified a suitable pK_a calculation method, these were further applied to predict the pK_as of several recently synthesized oxicam derivatives.

SCHEME 1: Thermodynamic Cycles Employed To Compute Solution Reaction Free Energies

Direct cycle A



Proton exchange cycle B



Microscopic versus Macroscopic pK_a s. The chemical structures of the oxicams studied here are illustrated in Figure 1. With the exception of isoxicam, experimental data suggest that all species exist in their N-protonated forms in aqueous solution,^{4,8} and therefore, in principle, each possesses three acidic protons: the enolic, pyridinyl, and amidic protons. As such, unlike typical small monoprotic acids, oxicams are diprotic acids and can exist in aqueous solution in a number of prototropic forms corresponding to their cationic, neutral/zwitterionic, and anionic forms. Further, there are three possible tautomers for the electrically neutral species—two zwitterionic species corresponding to the products due to deprotonation at the enolic and amidic protons and one from the deprotonation of the pyridinyl nitrogen. The prototropic equilibria for the oxicams, using meloxicam as an example, is illustrated in Figure 2.

As shown, K_{T1} and K_{T2} are the tautomerization constants, and K_{1ZO} , K_{1N} , K_{1ZN} , K_{2ZO} , K_{2N} , and K_{2ZN} are the microscopic dissociation constants, while K_{a1} and K_{a2} are the macroscopic dissociation constants:

$$K_{a1} = \frac{[\text{neutral}][\text{H}^+]}{[\text{cationic}]}; \quad K_{a2} = \frac{[\text{anionic}][\text{H}^+]}{[\text{neutral}]} \quad (1)$$

The expressions for the tautomerization constants and macroscopic pK_a s are therefore

$$pK_{a1} = -\log(K_{1ZO} + K_{1N} + K_{1ZN}) \quad (2)$$

$$pK_{a2} = -\log K_{2ZO} + \log(1 + K_{T1} + K_{T1}K_{T2}) \quad (3)$$

$$K_{T1} = \frac{K_{1N}}{K_{1ZO}} = \frac{K_{2ZO}}{K_{2N}}; \quad K_{T2} = \frac{K_{1ZN}}{K_{1N}} = \frac{K_{2N}}{K_{2ZN}} \quad (4)$$

Thus, these individual microscopic constants need to be calculated first in order to arrive at the macroscopic pK_a values. A similar approach has been used to calculate the macroscopic pK_a values of fluorescein and derivatives.¹² Calculation of these constants is accomplished by means of a thermodynamic cycle (the direct method) as shown in Scheme 1. With this cycle, the reaction free energies in solution are obtained through

$$\Delta G_{\text{soln}}^* = \Delta G_{\text{gas}}^* + \Delta G_{\text{soln}}^*(\text{H}^+) + \Delta G_{\text{soln}}^*(\text{A}^-) - \Delta G_{\text{soln}}^*(\text{HA})$$

$$pK_a(\text{HA}) = \frac{\Delta G_{\text{soln}}^*}{RT \ln(10)} \quad (5)$$

The asterisk (*) signifies that the thermodynamic quantities are calculated at a standard state of 1 mol L⁻¹. In this approach, we have used the most recent experimental–theoretical values of -26.3 and -1112.5 kJ mol⁻¹ for the gas-phase Gibbs free energy of H⁺, $G^\circ(\text{g}, \text{H}^+)$, and solvation free energy of H⁺ in water, $\Delta G_{\text{soln}}^*(\text{H}^+)$.⁴³ Because the gas-phase free energies are calculated with respect to a standard state of 1 atm, a correction factor of $RT \ln(\bar{R})$ needs to be added to convert it into the standard state of 1 mol L⁻¹ (R and \bar{R} are the universal gas

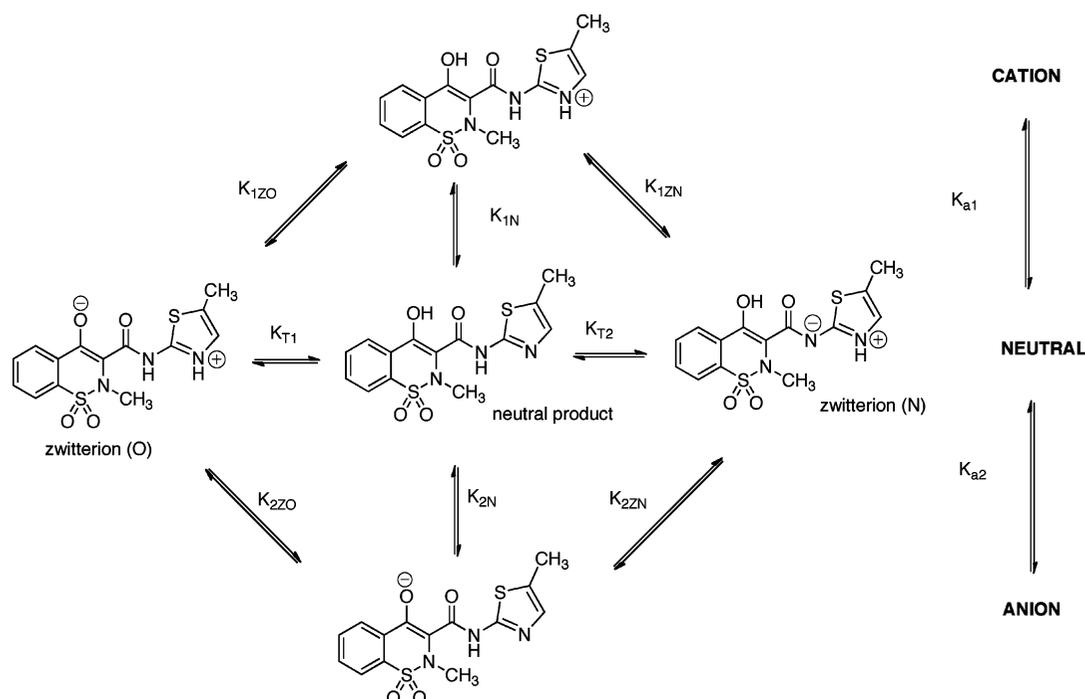
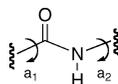


Figure 2. Prototropic equilibria for meloxicam.

SCHEME 2



constants in units of J mol⁻¹ K⁻¹ and L atm mol⁻¹ K⁻¹, respectively).

With the proton exchange method (Scheme 1, cycle B), the solution reaction free energies are obtained through

$$\begin{aligned} \Delta G_{\text{soln}}^* &= \Delta G_{\text{gas}}^* + \Delta G_{\text{soln}}^*(\text{HRef}) + \Delta G_{\text{soln}}^*(\text{A}^-) - \\ &\quad \Delta G_{\text{soln}}^*(\text{HA}) - \Delta G_{\text{soln}}^*(\text{Ref}^-) \\ \text{p}K_{\text{a}}(\text{HA}) &= \frac{\Delta G_{\text{soln}}^*}{RT \ln(10)} + \text{p}K_{\text{a}}(\text{HRef}) \end{aligned} \quad (6)$$

where the experimental value of the reference acid, pK_a(HRef), is used. In calculating solution reaction free energies via Scheme 1, a potential complication arises when the gas-phase and solution-phase conformations are different. There are several approaches to this problem, one of which is to adopt the gas- and solution-phase lowest energy conformers for the respective gas and solvation calculations. An energy correction term accounting for the changes in molecular conformation is then included in the solvation free energy computed on the solution geometry. However, this approach entails full conformer searches in both gas and solution phases. Alternatively, since the reaction free energy is a function of state, a simpler approach is therefore to base all calculations on the solution conformer for the calculation of solvation free energy and gas-phase reaction free energy. In the latter, the resulting gas-phase free energies are not amenable to direct comparison with experiment (if available). In this study, we have performed conformer searches in both gas and solution phases and computed pK_a values using these two sets of geometries to examine the effect of molecular conformation on the accuracy of the results.

Computational Details. Standard ab initio molecular orbital theory and density functional theory calculations were performed with Gaussian 03⁴⁴ and Molpro 2009.1.⁴⁵ In this work, we have carried out a small assessment study to examine the performance of several commonly used density functional methods, namely, B3LYP, BMK, B97-1, MPWB95, and M05-2X for the calculation of gas-phase deprotonation energies of a model oxicam derivative against the G3MP2(+)-cc benchmark. The G3MP2(+)-cc is a variant of the G3MP2 approach in which calculations with the 6-31G(d) basis set have been replaced with the 6-31+G(d) basis set, and the QCISD(T) calculations were substituted with CCSD(T).

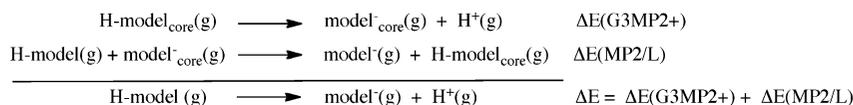
The lowest energy conformer of each species in both gas and aqueous phases is located by optimization of all possible conformers generated from combinations of rotations of the two bonds (a1 and a2 in Scheme 2) about the amide bond. The amide bond was fixed in its thermodynamically preferred trans-

configuration. Optimized structures and harmonic frequencies were determined at the B3LYP/6-31+G(d) level, and scale factors⁴⁶ for B3LYP/6-31G(d) vibrational frequencies have been used with electronic energies obtained at various levels of theories for the free energy calculations. Solution conformers were ranked in terms of their *solution electronic energies*, and where more than one low-lying conformer (within 5 kJ mol⁻¹ of lowest energy conformer) is present, the *solution free energy* was computed on these conformers to identify the solution equilibrium structure. Solution free energies were computed as $G_{\text{soln}}^* = G_{\text{gas}}^* + \Delta G_{\text{soln}}^*$, where the gas-phase energy was computed on the relaxed geometry of the solution conformer in the gas phase.

The CPCM and SMD solvation free energies (ΔG_{soln}^*) were carried out using Gaussian 09⁴⁷ and were computed on their respective solution-optimized geometries. The energy correction term (accounting for geometry changes going from gas into solution) to the solvation free energy is neglected because geometrical differences in gas and solution for a given conformer were generally small. The conductor-polarizable continuum model (CPCM)^{25,27} was applied at the B3LYP/6-31+G(d) level of theory with the UAKS cavities to yield the CPCM-UAKS solvation free energies. Solvation free energies were computed with use of the SMD³⁵ model at the same level of theory using default parameters. In Gaussian09, the SCFVAC keyword is deprecated, and as such, solvation free energies were manually obtained by taking the difference between the solution electronic energies (including nonelectrostatic terms) and the corresponding gas-phase electronic energies. Additionally, the following non-default keywords, Dis, Rep, Cav, and alpha = 1.2, were specified in the solvent input section in order to reproduce CPCM-UAKS solvation free energies of the same quality as those previously benchmarked for Gaussian03.⁴⁸ COSMO-RS⁴⁹⁻⁵¹ solvation free energies were computed at the BP/TZVP level of theory as implemented in the ADF^{52,53} package on CPCM-UAKS optimized geometries. In this approach, a COSMO single-point calculation was first carried out to obtain the charge density on the cavity surface for the solute and solvent molecules separately. A statistical thermodynamics treatment is then applied to the interactions between the surface charge densities of the solute and solvent to obtain the corresponding solvation free energy.

Results and Discussion

DFT Assessment Study. This section examines the performance of various DFT methods against the G3MP2(+)-cc benchmark. To facilitate this comparison, we have adopted compound **6** (a smaller oxicam derivative) as our model system, where the sulfonyl moiety has been replaced with the carbonyl group and the terminal pyridine with dimethylamine. In calculating the G3MP2(+)-cc energies, an ONIOM^{54,55} approach was employed and an illustration is provided in Scheme 3. The molecular core was defined by replacing all *N*-methyl groups with hydrogens, and L denotes the 6-311+G(3df,2p) basis sets.

SCHEME 3: Schematic Illustration for the ONIOM Type Approach Used To Calculate G3MP2(+) Quality Reaction Energy (ΔE)^a

^a The reaction energy involving the molecular core is calculated at G3MP2(+)-cc, and the full system is calculated at a lower level of theory MP2/6-311+G(3df,2p) via an isodesmic reaction so that the errors due to the inadequate treatment of electron correlation should mostly cancel. The overall reaction energy is then obtained as the sum of the two terms.

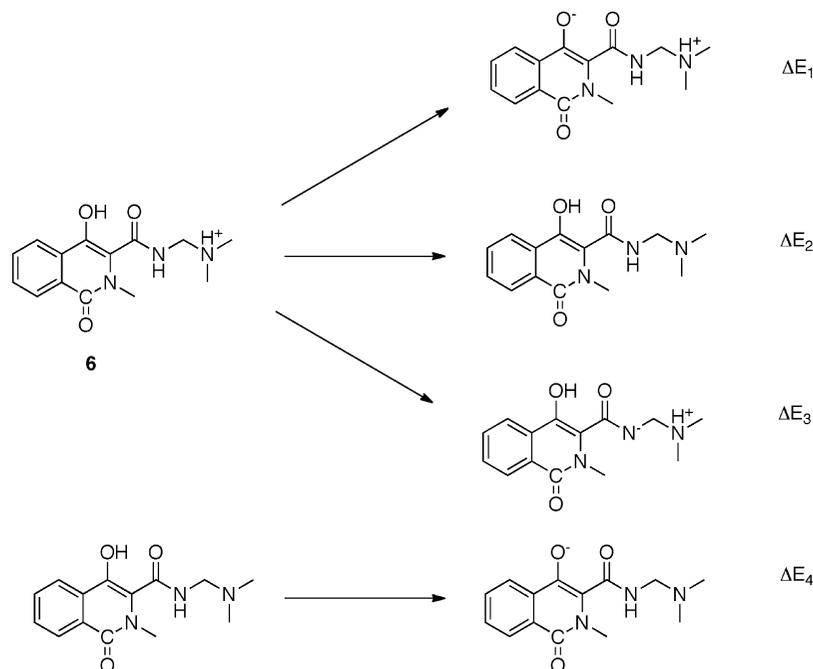


Figure 3. Deprotonation steps in an oxicam.

TABLE 1: Reaction Energies (kJ mol⁻¹) Computed with Various DFT Methods in Conjunction with the 6-311+G(3df,2p) Basis Set^a

	ΔE_1	ΔE_2	ΔE_3	ΔE_4	MAD
B971	1063.7 (3.1)	1003.1 (7.6)	1071.2 (14.8)	1398.0 (3.3)	7.2
B3LYP	1059.5 (-1.1)	996.9 (1.5)	1066.7 (10.3)	1395.9 (1.1)	3.5
BMK	1062.3 (1.7)	996.1 (0.6)	1071.3 (14.9)	1394.7 (0.1)	4.3
MPWB95	1062.7 (2.1)	996.3 (0.9)	1068.0 (11.6)	1399.9 (5.1)	4.9
M05-2X	1058.4 (-2.2)	993.6 (1.9)	1059.4 (3.0)	1395.2 (0.4)	1.9
MP2	1047.0 (-13.6)	989.2 (6.3)	1044.3 (12.1)	1382.2 (12.6)	11.2
G3MP2(+)-cc	1060.6	995.48	1056.4	1394.79	

^a Signed errors against the G3MP2(+)-cc benchmark are shown in brackets.

The reaction energies (as difference in electronic energies) were computed for reactions 1–4 shown in Figure 3, and the results are given in Table 1.

As shown in Table 1, all the DFT methods generally perform well with mean unsigned errors that are within 5 kJ mol⁻¹. However, much larger errors are observed for most of the DFT methods with respect to the calculation of ΔE_3 , with the exception of M05-2X where the signed errors are consistently below 4 kJ mol⁻¹. As such, for the remainder of this study, all gas-phase reaction energies are calculated at the M05-2X/6-311+G(3df,2p) level of theory in conjunction with the thermal corrections obtained at the B3LYP/6-31+G(d) to yield the corresponding reaction free energies.

Molecular Conformation. The lowest (free) energy conformers of protonated, zwitterionic, and anionic forms of piroxicam and meloxicam in both gas and solution phases (CPCM-UAKS and COSMO-RS) are shown in Figure 4. By and large, the oxicams retain the gas-phase conformation in solution, though there are some exceptions to this trend, including N-protonated piroxicam, tenoxicam, and lornoxicam. For meloxicam, the N-protonated and zwitterionic forms adopt different conformers in the two phases. The microspecies of isoxicam adopt the same conformation in the gas and solution phases, and the conformers are the same as the gas-phase conformers of piroxicam as shown in Figure 4. Comparison of the lowest energy conformations in the two phases indicates that intramolecular hydrogen bonding has a smaller effect on conformer stability in solution. For example, the free energy

difference between the gas-phase and solution equilibrium conformer of protonated piroxicam is 30 kJ mol⁻¹ in the gas phase; however, in aqueous solution, the CPCM-UAKS and COSMO-RS models predict that the non-intramolecularly hydrogen-bonded solution conformer is actually more stable by 4 kJ mol⁻¹. Presumably, intramolecularly hydrogen-bonded structures are less favored in solution because it precludes electrostatic (intermolecular) interactions with the solvent. The CPCM-UAKS solution free energies of the gas and solution conformers of some species are provided in Table S2 in the Supporting Information. As shown, in some instances, the solution free energy calculated on gas-phase conformer is about 10–20 kJ mol⁻¹ higher in energy compared to the solution conformer.

The SMD model also predicts a similar trend where the free energy difference between solution- and gas-phase conformers is substantially lower in the presence of solvent; however, in this case, the model predicts that the gas-phase conformers of all microspecies of piroxicam, tenoxicam, and lornoxicam are retained in solution. For meloxicam, the SMD solution conformers are the same as those predicted using CPCM-UAKS and COSMO-RS as shown in Figure 4 and do differ from the gas-phase structures. Thus, an important implication of this result is that the usual assumption that the molecule adopts the same conformation in gas and solution phases may not be valid for larger molecules even when intramolecular hydrogen bonds are present, and, in such instances, a rigorous conformer search that goes beyond simply reoptimizing the gas-phase equilibrium

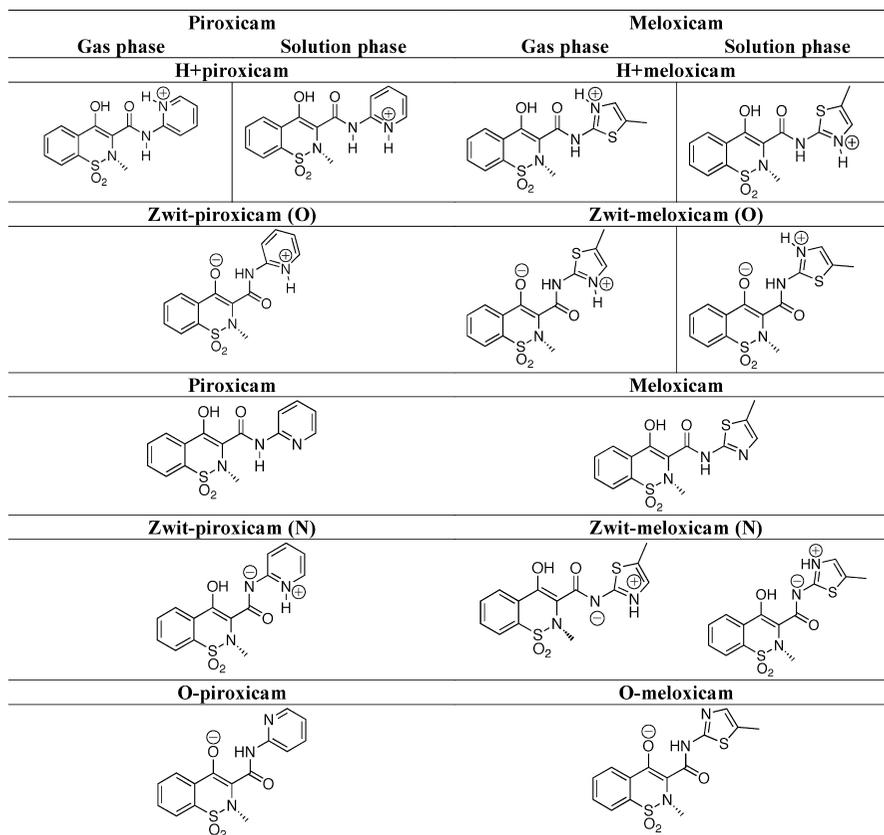


Figure 4. Gas-phase and solution (CPCM-UAKS/COSMO-RS) conformers of some oxicam microspecies.

TABLE 2: Gas-Phase Deprotonation Energies^a (kJ mol⁻¹) at 298 K Associated with the Four Deprotonation Steps

	ΔG_1	ΔG_2	ΔG_3	ΔG_4
piroxicam	978.8 (0.0)	929.5 (0.0)	966.4 (0.0)	1316.6 (0.0)
tenoxicam	971.4 (-7.4)	927.0 (-2.5)	962.1 (-4.3)	1307.2 (-9.4)
lornoxicam	963.5 (-15.3)	922.3 (-7.2)	955.4 (-11.0)	1295.0 (-21.6)
meloxicam	973.9 (-4.9)	923.2 (-6.3)	948.6 (-17.8)	1302.0 (-14.6)
isoxicam	979.1 (0.3)	898.9 (-30.6)	959.7 (-6.7)	1308.5 (-8.1)

^a Absolute values are calculated with respect to the standard state of 1 atm, and relative values are shown in parentheses.

geometry in solution is necessary. The lowest energy structure as predicted by the various solvent models is used in the respective solution-phase calculations. In the next section, the effect of molecular conformation on the accuracy of the calculated pK_as is also examined.

Gas-Phase Acidities. Shown in Table 2 are the gas-phase deprotonation energies of the five oxicams examined in accordance with the reaction scheme in Figure 3. There is generally little variation in the acidities among the five oxicams, indicating that the structural modification, e.g., by replacing the benzo ring of piroxicam with a thieno ring (yielding tenoxicam), has relatively little effect on the intrinsic (in the absence of solvent) acidities of these acid. Nevertheless, there are some notable exceptions, such as ΔG_1 and ΔG_4 of lornoxicam where substitution of the benzo ring of piroxicam with the electron-withdrawing 2-chlorothieno ring enhances the acidity of the enolic proton by 15–20 kJ mol⁻¹. Similarly, replacement of the pyridin-2-yl ring of piroxicam with a 5-methylisoxazol-3-yl ring yielding isoxicam dramatically reduces the basicity of the N-atom where ΔG_2 is ~ 30 kJ mol⁻¹ lower. This is presumably due to the electron-withdrawing effect of the adjacent electronegative oxygen and is consistent with existing experimental data, which suggest that protonated isoxicam is not observed in aqueous solution (pK_{a1} is not measurable using the methods employed to measure the corresponding pK_as of

other oxicams).^{4,8} Interestingly, the gas-phase data suggest that, of the three electrically neutral tautomers, the neutral form is the most stable in the gas phase, whereas experimental data in the condensed phase suggest that it is the zwitterionic (O) form that is predominant in solution. Similarly, in the gas phase, the zwitterionic (N) also appears to be more stable compared to the (O) form, presumably because of the proximity of the anionic center to the positively charged pyridinyl moiety; however, this species is reportedly undetected in condensed-phase studies. As such, it appears that relative stabilities of the tautomers (and the resulting pK_a values) are strongly influenced by solvent effects.

Aqueous Acidities. The microscopic acidities (computed via eq 5 and the direct cycle in Scheme 1) and the corresponding macroscopic pK_a values (computed using eqs 2 and 3) of the five oxicams, as well as the tautomerization constants computed on both gas-phase and solution-phase conformers in conjunction with the CPCM-UAKS, COSMO-RS, and SMD solvent models are summarized in Tables 3 and 4. Before proceeding further, it is worth mentioning that, from eqs 2 and 3, it is clear that the macroscopic pK_{a1} has contributions from pK_{1ZO}, pK_{1IN} and pK_{1ZN}, and, in particular, the microscopic pK_a with the lowest value would have the highest weighting on pK_{a1}. Conversely, it is the microscopic pK_{2ZO}, pK_{2N}, and pK_{2ZN} constant with the highest value that will have the highest weighting on pK_{a2}.

TABLE 3: Directly Calculated Microconstants and the Associated Macroscopic pK_a Values on Gas-Phase Conformers at 298 K^a

	solvent model	piroxicam	tenoxicam	lornoxicam	meloxicam	isoxicam
pK_{1ZO}	CPCM	1.27 (−0.65)	0.81 (−0.28)	0.22	1.06	1.77
	COSMO-RS	−1.85 (−3.77)	−2.48 (−3.57)	−2.90	−2.36	−1.57
	SMD	0.33 (−1.59)	−0.81 (−1.90)	−1.46	−0.85	0.36
	expt	1.92 ^b	1.09 ^c			
pK_{1N}	CPCM	1.37 (−1.35)	1.57 (−1.14)	1.42	−0.15	−2.83
	COSMO-RS	1.01 (−1.71)	1.06 (−1.65)	0.79	−1.58	−3.84
	SMD	2.82 (0.10)	2.68 (−0.03)	2.56	−1.97	−4.12
	expt	2.72 ^b	2.71 ^c			
pK_{1ZN}	CPCM	4.68	4.78	4.25	0.63	4.87
	COSMO-RS	2.46	2.26	1.88	−1.75	2.09
	SMD	4.23	3.80	3.48	−0.77	3.16
	expt					
pK_{T1}	CPCM	0.10 (−0.70)	0.77 (−0.85)	1.20	−1.22	−4.59
	COSMO-RS	2.86 (2.06)	3.54 (1.89)	3.69	0.77	−2.28
	SMD	2.50 (1.70)	3.49 (1.87)	4.02	−1.12	−4.48
	expt	0.80 ^b	1.62 ^c			
pK_{2ZO}	CPCM	6.31 (0.91)	6.01 (0.69)	6.01	3.90	2.28
	COSMO-RS	3.59 (−1.81)	3.25 (−2.07)	3.41	0.87	−1.97
	SMD	8.30 (2.90)	8.01 (2.69)	7.90	3.71	0.69
	expt	5.40 ^b	5.32 ^c			
pK_{2N}	CPCM	6.21 (1.61)	5.25 (1.55)	4.81	5.11	6.87
	COSMO-RS	0.73 (−3.87)	−0.29 (−3.99)	−0.28	0.10	0.31
	SMD	5.80 (1.20)	4.52 (0.82)	3.88	4.83	5.17
	expt	4.60 ^b	3.70 ^c			
pK_{a1}	CPCM	1.02 (−0.84)	0.74 (−0.33)	0.19 (−0.66)	−0.24 (−1.33)	−2.83
	COSMO-RS	−1.85 (−3.71)	−2.48 (−3.55)	−2.90 (−3.75)	−2.51 (−3.60)	−3.84
	SMD	0.32 (−1.54)	−0.81 (−1.88)	−1.46 (−2.31)	−2.03 (−3.12)	−4.12
	expt	1.86 ^d	1.07 ^d	0.85 ^e	1.09 ^f	
pK_{a2}	CPCM	6.56 (1.10)	6.08 (0.74)	6.04 (0.45)	5.20 (1.02)	6.87 (2.94)
	COSMO-RS	3.59 (−1.87)	3.25 (−2.09)	3.41 (−2.18)	1.02 (−3.16)	0.31 (−3.62)
	SMD	8.30 (2.84)	8.01 (2.67)	7.90 (2.31)	4.89 (0.71)	5.17 (1.24)
	expt	5.46 ^d	5.34 ^d	5.59 ^e	4.18 ^f	3.93 ^b

^a Signed errors are shown in brackets. ^b Reference 5. ^c Reference 6. ^d Reference 9. ^e Reference 4. ^f Reference 10.

Accordingly, it is observed in Tables 3 and 4 that, with the exception of meloxicam, all three solvent models predict pK_{1ZN} to be higher than pK_{1ZO} and pK_{1N} , typically by 2 or more units, and therefore has little influence on the resulting macroscopic pK_{a1} value. This indicates that the solution concentration of zwitterion (N) is substantially less than the other two tautomers, and the results are consistent with existing experimental studies where the zwitterion (N) is apparently undetected^{4,5,8} or assumed to be present in negligible concentrations. Thus, whereas Table 2 suggests that the order of decreasing stabilities in the gas phase follows neutral > zwitterion (N) > zwitterion (O), it appears that solvent effects are sufficient to alter the relative stabilities of the tautomers in solution and the continuum solvent models employed are able to reproduce this trend.

Overall, it appears from Tables 3 and 4 that the CPCM-UAKS model performed reasonably well, where calculated macroscopic pK_a values, especially pK_{a1} , are typically within 1 unit of experiment. On the other hand, the performance of the SMD and COSMO-RS models is less satisfactory, where deviations in the calculated values are ~ 2 –4 units. Additionally, comparison between Tables 3 and 4 also indicates that using solution conformers affords further improvement in accuracy for the CPCM and COSMO-RS models. As noted above, since the accuracy of the macroscopic pK_a s depends directly on the microscopic constants, it is more pertinent to examine the accuracy of the latter and experimental values for the microscopic constants, where available, are provided in Tables 3 and 4. Experimental values for microscopic ionization constants are typically obtained via the study of analogues; for example, through the synthesis of piroxicam derivatives—pyridyl *N*-methylated and enolic *O*-methylated piroxicams, one can

estimate the microscopic constants pK_{1ZO} and pK_{2ZO} .⁵ In view of the good performance observed in the macroscopic constants, it is not surprising to note that pK_{1ZO} , pK_{1N} , pK_{2ZO} , and pK_{T1} are reasonably well estimated by CPCM-UAKS for piroxicam and tenoxicam, with errors all under 1 unit, particularly when solution conformers are used. The error in pK_{2N} is slightly larger; however, the effect on pK_{a2} is minimal because it is more strongly weighted by the larger pK_{2ZO} . For isoxicam, all three solvent models predict pK_{1N} to be ~ -4 (cf. piroxicam, 2.7), which stems from the much weaker basicity of the nitrogen in the 5-methylisoxazol-3-yl ring (Table 2). This is consistent with experimental studies where only one pK_a is measured for isoxicam due to deprotonation of the enolic hydrogen; calculations from all solvent models predicts that neutral isoxicam is the predominant form in solution (see calculated $pK_{T1} \sim -4$ in Tables 3 and 4). As such, the macroscopic pK_{a2} and microscopic pK_{2N} of isoxicam are identical. Inspection of Table 4 shows that the SMD predicts pK_{1N} and pK_{2N} quite accurately; however, the errors in the other microscopic constants have errors that are as large as 3 units. Similarly, COSMO-RS incurs ~ 3 unit error in the pK_{1ZO} and pK_{2N} . Nevertheless, a promising observation is that the errors in the directly calculated microscopic constants appear to be systematic. For example, from Tables 3 and 4, it appears that the SMD model underestimates pK_{1ZO} by 1.6 units and overestimates pK_{T1} and pK_{2ZO} by 2 and 3 units, respectively. Similarly, the CPCM-UAKS model appears to underestimate pK_{1N} and pK_{T1} by 0.7 units and to overestimate pK_{2ZO} and pK_{2N} by 0.8 and 1.6 units, respectively. As such, a proton exchange scheme may be employed to ameliorate most of these errors.

TABLE 4: Directly Calculated Microconstants and the Associated Macroscopic pK_a Values on Solution-Phase Conformers at 298 K^a

	solvent model	piroxicam	tenoxicam	lornoxicam	meloxicam	isoxicam
pK _{1ZO}	CPCM	1.94 (0.02)	1.14 (0.05)	0.71	0.78	1.77
	COSMO-RS	-1.03 (-2.95)	-1.89 (-2.98)	-2.08	-2.19	-1.57
	SMD	0.33 (-1.59)	-0.81 (-1.90)	-1.46	-0.79	0.36
	expt	1.92 ^b	1.09 ^c			
pK _{1N}	CPCM	2.04 (-0.68)	1.90 (-0.81)	1.91	2.78	-2.83
	COSMO-RS	1.83 (-0.89)	1.65 (-1.06)	1.61	1.66	-3.84
	SMD	2.82 (0.10)	2.68 (-0.03)	2.56	-0.01	-4.12
	expt	2.72 ^b	2.71 ^c			
pK _{1ZN}	CPCM	5.35	5.11	4.74	2.76	4.87
	COSMO-RS	3.28	2.85	2.70	0.55	2.09
	SMD	4.23	3.80	3.48	0.41	3.16
	expt					
pK _{T1}	CPCM	0.10 (-0.70)	0.77 (-0.85)	1.20	2.00	-4.59
	COSMO-RS	2.86 (2.06)	3.54 (1.92)	3.69	3.85	-2.28
	SMD	2.50 (1.70)	3.49 (1.87)	4.02	0.78	-4.48
	expt	0.80 ^b	1.62 ^c			
pK _{2ZO}	CPCM	6.31 (0.91)	6.01 (0.69)	6.01	7.11	2.28
	COSMO-RS	3.59 (-1.81)	3.25 (-2.07)	3.41	3.94	-1.97
	SMD	8.30 (2.90)	8.01 (2.69)	7.90	5.61	0.69
	expt	5.40 ^b	5.32 ^c			
pK _{2N}	CPCM	6.21 (1.61)	5.25 (1.55)	4.81	5.11	6.87
	COSMO-RS	0.73 (-3.87)	-0.29 (-3.99)	-0.28	0.10	0.31
	SMD	5.80 (1.20)	4.52 (0.82)	3.88	4.83	5.17
	expt	4.60 ^b	3.70 ^c			
pK _{a1}	CPCM	1.69 (-0.17)	1.07 (0.00)	0.69 (-0.16)	0.77 (-0.32)	-2.83
	COSMO-RS	-1.03 (-2.89)	-1.89 (-2.96)	-2.08 (-2.93)	-2.19 (-3.28)	-3.84
	SMD	0.32 (-1.54)	-0.81 (-1.88)	-1.46 (-2.31)	-0.88 (-1.97)	-4.12
	expt	1.86 ^d	1.07 ^d	0.85 ^e	1.09 ^f	
pK _{a2}	CPCM	6.56 (1.10)	6.08 (0.74)	6.04 (0.45)	7.12 (2.94)	6.87 (2.94)
	COSMO-RS	3.59 (-1.87)	3.25 (-2.09)	3.41 (-2.18)	3.95 (-0.23)	0.31 (-3.62)
	SMD	8.30 (2.84)	8.01 (2.67)	7.90 (2.31)	5.70 (1.52)	5.17 (1.24)
	expt	5.46 ^d	5.34 ^d	5.59 ^e	4.18 ^f	3.93 ^b

^a Signed errors are shown in brackets. ^b Reference 5. ^c Reference 6. ^d Reference 9. ^e Reference 4. ^f Reference 10.

Shown in Tables 5 and 6 are the proton exchange microscopic and corresponding macroscopic pK_a constants using piroxicam as the reference species for gas- and solution-phase conformers, respectively. Additionally, we have made further simplifications to eqs 2 and 3 by eliminating the contribution from the zwitterion (N) tautomer, and the macroscopic pK_as are calculated as pK_{a1} = -log(K_{1ZO} + K_{1N}); pK_{a2} = pK_{2ZO} + log(1 + K_{T1}). As shown, the proton exchange scheme affords much improvement in all three solvent models, particularly SMD and COSMO-RS, where the pK_{1ZO}, pK_{T1}, and pK_{2ZO} of tenoxicam are predicted very accurately (cf. experiment), and most macroscopic constants are calculated to within a unit of experiment. The excellent agreement between the calculated microscopic constants of tenoxicam and lornoxicam using the three solvent models further supports the reliability of these values. Interestingly, meloxicam appears to be more problematic, where CPCM and COSMO-RS incur errors of ~2 units with respect to pK_{a2} (Table 6). Unlike the other oxicams, there is also greater disparity in meloxicam's microscopic constants predicted using gas- and solution-phase conformers. Presumably, the structural difference between meloxicam and piroxicam (substitution of the pyridinyl ring for a 5-methylisoxazol-3-yl ring) somewhat alters the solvation pattern and as a consequence, using piroxicam as a reference species results in some noncanceling errors in the proton exchange scheme. Another probable reason is that one of the microspecies of meloxicam, namely, zwitterion-meloxicam(O), adopts a different conformation in solution from the other oxicams—see Figure 4. Presumably, this causes the systematic error found in tenoxicam and lornoxicam to be different from meloxicam, and it is not clear if the proton exchange scheme (with any of the solvent models) necessarily

affords any improvement in accuracy. If this were the case, then one might expect the proton exchange method to perform better on the gas-phase conformers since all microspecies adopt the same intramolecularly hydrogen-bonded configuration. Indeed, Table 5 shows that the calculated pK_{a2} is markedly improved (within 0.6 unit of experiment) for CPCM and COSMO-RS when gas-phase conformers were used. In particular, using gas-phase conformers results in a smaller pK_{2ZO} value such that pK_{2N} contributes the most to the macroscopic pK_{a2}. This microscopic constant pK_{2N} appears to be reasonably well predicted where the three solvent models give essentially the same result (Table 5). This suggests that the systematic error incurred by certain continuum solvent models may be sensitive to the conformation adopted by the molecule and may be an important consideration when it comes to selecting a suitable reference species for use in a proton exchange scheme.

Thus, where direct pK_a calculation (Scheme 1) is concerned, it makes physical sense to employ the solution equilibrium conformers to predict solution reaction free energies and it is noted in Tables 3 and 4 that this results in further, albeit modest, improvement in the microscopic pK_a values. However, as seen in Tables 3 and 4, the direct method per se is generally less reliable and its performance can vary considerably according to the solvent model employed. On the other hand, the proton exchange scheme provides a more reliable approach where the data in Tables 5 and 6 show that its performance is fairly independent of the choice of solvent model, and it delivers significant improvement over the directly calculated values. The generally good agreement between the microscopic constants in Tables 5 and 6 also indicates that the errors incurred from using gas rather than solution conformers also cancel to a large

TABLE 5: Proton Exchange Microconstants and the Associated Macroscopic pK_a Values on Gas-Phase Conformers at 298 K^a

	solvent model	tenoxicam	lornoxicam	meloxicam	isoxicam
pK_{1ZO}	CPCM	1.46 (0.37)	0.87	1.71	2.42
	COSMO-RS	1.29 (0.20)	0.87	1.41	2.20
	SMD	0.78 (−0.31)	0.14	0.74	1.96
	expt	1.09 ^c			
pK_{1N}	CPCM	2.92 (0.21)	2.76	1.19	−1.48
	COSMO-RS	2.76 (0.05)	2.49	0.12	−2.13
	SMD	2.57 (−0.14)	2.46	−2.08	−4.22
	expt	2.71 ^c			
pK_{T1}	CPCM	1.46 (−0.16)	1.89	−0.52	−3.90
	COSMO-RS	1.48 (−0.14)	1.62	−1.29	−4.34
	SMD	1.79 (0.17)	2.32	−2.82	−6.17
	expt	1.62 ^c			
pK_{2ZO}	CPCM	5.10 (−0.22)	5.10	2.98	1.37
	COSMO-RS	5.06 (−0.26)	5.22	2.68	−0.16
	SMD	5.11 (−0.21)	5.00	0.81	−2.21
	expt	5.32 ^c			
pK_{2N}	CPCM	3.64 (−0.06)	3.20	3.50	5.26
	COSMO-RS	3.59 (−0.11)	3.60	3.97	4.18
	SMD	3.32 (−0.38)	2.68	3.63	3.97
	expt	3.70 ^c			
pK_{a1}	CPCM	1.44 (−0.37)	0.87 (0.02)	1.08 (−0.01)	−1.48
	COSMO-RS	1.27 (0.20)	0.86 (0.01)	0.10 (−0.99)	−2.13
	SMD	0.78 (−0.29)	0.13 (−0.72)	−2.08 (−3.17)	−4.22
	expt	1.07 ^d	0.85 ^e	1.09 ^f	
pK_{a2}	CPCM	5.12 (−0.22)	5.10 (−0.49)	3.62 (−0.56)	5.26 (1.33)
	COSMO-RS	5.08 (−0.26)	5.23 (−0.36)	3.99 (−0.19)	4.18 (0.25)
	SMD	5.12 (−0.22)	5.00 (−0.59)	3.63 (−0.55)	3.97 (0.04)
	expt	5.34 ^d	5.59 ^e	4.18 ^f	3.93 ^b

^a Signed errors are shown in brackets. ^b Reference 5. ^c Reference 6. ^d Reference 9. ^e Reference 4. ^f Reference 10.

TABLE 6: Proton Exchange Microconstants and the Associated Macroscopic pK_a Values on Solution-Phase Conformers at 298 K^a

	solvent model	tenoxicam	lornoxicam	meloxicam	isoxicam
pK_{1ZO}	CPCM	1.12 (0.03)	0.69	0.76	1.75
	COSMO-RS	1.06 (−0.03)	0.87	0.76	1.38
	SMD	0.78 (−0.31)	0.14	0.81	1.96
	expt	1.09 ^c			
pK_{1N}	CPCM	2.58 (−0.13)	2.59	3.46	−2.15
	COSMO-RS	2.54 (−0.17)	2.49	2.54	−2.96
	SMD	2.57 (−0.14)	2.46	−0.11	−4.22
	expt	2.71 ^c			
pK_{T1}	CPCM	1.46 (−0.16)	1.89	2.69	−3.90
	COSMO-RS	1.48 (−0.14)	1.62	1.78	−4.34
	SMD	1.79 (0.17)	2.32	−0.91	−6.17
	expt	1.62 ^c			
pK_{2ZO}	CPCM	5.10 (−0.22)	5.10	6.20	1.37
	COSMO-RS	5.06 (−0.26)	5.22	5.76	−0.16
	SMD	5.11 (−0.21)	5.00	2.71	−2.21
	expt	5.32 ^c			
pK_{2N}	CPCM	3.64 (−0.06)	3.20	3.50	5.26
	COSMO-RS	3.59 (−0.11)	3.60	3.97	4.18
	SMD	3.32 (−0.38)	2.68	3.63	3.97
	expt	3.70 ^c			
pK_{a1}	CPCM	1.10 (0.03)	0.69 (−0.16)	0.76 (−0.33)	−2.15
	COSMO-RS	1.04 (−0.03)	0.86 (0.01)	0.75 (−0.34)	−2.96
	SMD	0.78 (−0.29)	0.13 (−0.72)	−0.16 (−1.25)	−4.22
	expt	1.07 ^d	0.85 ^e	1.09 ^f	
pK_{a2}	CPCM	5.12 (−0.22)	5.10 (−0.49)	6.20 (2.02)	5.26 (1.33)
	COSMO-RS	5.08 (−0.26)	5.23 (−0.36)	5.76 (1.58)	4.18 (0.25)
	SMD	5.12 (−0.22)	5.00 (−0.59)	3.63 (−0.55)	3.97 (0.04)
	expt	5.34 ^d	5.59 ^e	4.18 ^f	3.93 ^b

^a Signed errors are shown in brackets. ^b Reference 5. ^c Reference 6. ^d Reference 9. ^e Reference 4. ^f Reference 10.

extent through the proton exchange scheme. A subtle but important observation from the above study is that, in addition to structural similarity, the preferred molecular conformation adopted by the reference species also needs to be taken into account when selecting a suitable reference species. Nonetheless,

we note from Table 6 that even if an ideal reference is not available, a reasonably accurate pK_{a2} for meloxicam may still be obtained with an error of two units or less. On this basis, we note that applying the proton exchange scheme on gas-phase conformers in conjunction with CPCM and COSMO-RS gener-

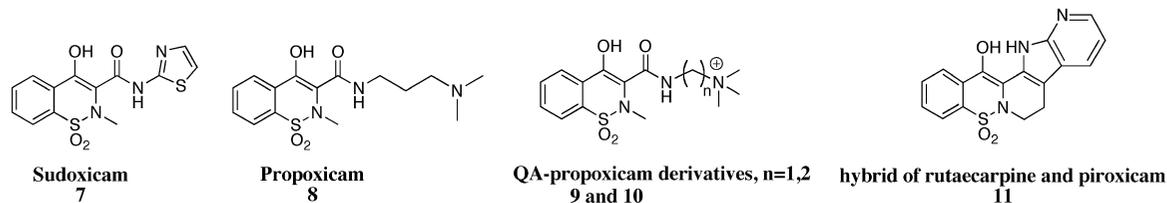


Figure 5. Chemical structures of other oxicams derivatives, including several recently synthesized derivatives (9–11).

TABLE 7: Predicted Gas-Phase Deprotonation Energies and Aqueous Acidities^a at 298 K of Oxicam Derivatives Shown in Figure 5

	sudoxicam	propoxicam	QA (n = 1)	QA (n = 2)	hybrid
ΔG_1 (kJ mol ⁻¹)	964.7	1013.5	1033.3	1054.9	995.7
ΔG_2 (kJ mol ⁻¹)	909.5	970.9			920.7
ΔG_4 (kJ mol ⁻¹)	1298.0	1348.7			1306.0
pK _{1ZO} (CPCM)	1.10	0.98	5.10	7.44	8.46
pK _{1ZO} (COSMO-RS)	1.16	0.84	3.81	5.83	9.28
pK _{1N} (CPCM)	0.18	10.55			4.52
pK _{1N} (COSMO-RS)	-0.76	9.03			4.39
pK _{2ZO} (CPCM)	2.38	15.17			3.58
pK _{2ZO} (COSMO-RS)	1.97	14.30			4.83
pK _{2N} (CPCM)	3.29	5.60			7.52
pK _{2N} (COSMO-RS)	3.89	6.11			9.72
pK _{a1} (CPCM)	0.13	0.98	5.10	7.44	4.52
pK _{a1} (COSMORS)	-0.77	0.84	3.81	5.83	4.39
pK _{a2} (CPCM)	3.34	15.17			7.52
pK _{a2} (COSMORS)	3.90	14.30			9.72

^a Aqueous acidities were calculated using the proton exchange scheme using piroxicam as the reference.

ally delivers reasonably good results, with all macroscopic pK_a calculated to within ~1 unit of experiment.

pK_a Prediction of New Oxicam Derivatives. There is ongoing research aimed at developing new oxicam derivatives with improved pharmacological activities, and some of these compounds are shown in Figure 5. For example, propoxicam (8) and some of its derivatives (9 and 10) have recently been explored as anti-osteoarthritis drugs where quaternization of the terminal amino group apparently increases their affinity toward articular cartilage.^{56,57} Compound 11 is a hybrid of piroxicam and rutaecarpine, where the latter is a quinoxalinecarboline alkaloid and possesses a wide spectrum of pharmacological properties, including antihypertensive and cytotoxic activities.⁵⁸

On the basis of the above results, we have employed the proton exchange scheme in conjunction with CPCM and COSMO-RS to compute the microscopic constants as well as the macroscopic pK_a values of some of these oxicam derivatives shown in Figure 5. Piroxicam was used as the reference species. As noted above, because it is not clear as to whether using solution conformers necessarily delivers better results in a proton exchange scheme, for simplicity, we have adopted gas-phase conformers in these calculations. To the best of our knowledge, the aqueous pK_as of most these oxicams have not been measured and the values computed here may be directly compared with future experimental measurements. We estimate from the assessment study that the uncertainty associated with these computed values are no larger than 2 units.

The microscopic gas-phase deprotonation energies (see reaction scheme in Figure 3) and aqueous acidities, macroscopic pK_a values of oxicams (7–11) are shown in Table 7. Generally, it appears that there is reasonably good agreement between the predicted pK_a values from the two solvent models, where the difference is usually within 1 unit (within the error bars of the pK_a calculation protocol). Interestingly, apart from sudoxicam, the predicted macroscopic pK_a values for the new

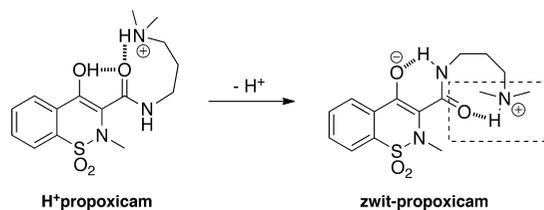


Figure 6. Zwitter-propoxicam (8) is stabilized by an intramolecular hydrogen bond (boxed) that is not present in the quaternized derivatives.

derivatives are all considerably higher than piroxicam. Comparison with Table 2 indicates that the gas-phase deprotonation energies of propoxicam (ΔG_1 , ΔG_2 , and ΔG_4) and its quaternized derivatives are substantially higher than piroxicam by ~30 kJ mol⁻¹ or more. For propoxicam, this difference stems, in part, from the increased basicity of the terminal aliphatic nitrogen relative to pyridine (the gas-phase basicity of dimethylpropylamine is 931 kJ mol⁻¹, whereas that of pyridine is 898 kJ mol⁻¹,⁵⁹ as a consequence of the delocalization of the lone pair in the aromatic system). As such, the N-protonated form of propoxicam is stabilized relative to the neutral and zwitterionic forms. For the quaternized derivatives, the higher gas-phase deprotonation energies relative to propoxicam, appear to arise from the loss of an intramolecular hydrogen bond due to the substitution of a methyl group for a proton at the nitrogen (Figure 6).

Additionally, the weaker acidity (20 kJ mol⁻¹) of 10 compared to 9 is presumably due to the increased distance between the cationic terminal nitrogen and the anionic enolate oxygen. For the hybrid derivative 11, other than ΔG_1 , the acidities of the other protons are very similar to those of piroxicam. This ~20 kJ mol⁻¹ weaker acidity in ΔG_1 arises because of the conformational constraint associated with the fused pyridine ring, where the proton on the pyridine is in close proximity to the pyrrolidine proton (see structure in Figure 5), which is similar to the solution-phase structure for zwitter-meloxicam (O) in Figure 4. With sudoxicam, it is surprising to note that substitution of a 5-methylthiazoyl-2-yl ring with a thiazoyl-2-yl ring increases the gas-phase deprotonation energy by about 10 kJ mol⁻¹, although this difference is comparable to the effect of a methyl group on the basicity of pyridine: gas-phase basicity of 4-methylpyridine is ~15 kJ mol⁻¹ higher than pyridine.⁵⁹

In solution, the predicted pK_a values indicate that the hybrid and propoxicam derivatives are generally weaker acids, compared to oxicams 1–5, and there appears to be some correlation with the gas-phase data. For example, sudoxicam's pK_a values are very close to those of meloxicam, being slightly lower (by less than 1 unit) which is consistent with the gas-phase data. Similarly, 9 and 10 exhibit pK_a values that are 4–6 units higher than piroxicam, and this is also consistent with their weaker gas-phase acidity. It is interesting to note that, for propoxicam, the macroscopic pK_{a1} is quite comparable to piroxicam, despite its weaker gas-phase acidity by ~30 kJ mol⁻¹. In this instance, there appears to be a strong solvent effect where the zwitterion

(O) tautomer is very strongly solvated to the extent that it counteracts the weaker acidity calculated in the gas phase.

Conclusions

We have shown that the proton exchange scheme when used in conjunction with the CPCM-UAQS and COSMO-RS models deliver reasonably accurate pK_a values and could provide a complementary tool for studying the acid–base behavior of compounds of this type. An interesting finding from this study is that when studying larger molecular systems where multiple conformers are present, and where the conformational preference may differ in the gas and solution phases, the molecular conformation of the reference species can impact on the accuracy of the resulting proton exchange scheme. In the direct cycle calculation, the use of solution equilibrium conformers is recommended; however, this approach failed to deliver accurate results (errors ~ 3 or more units) presumably because of the larger errors incurred by some of the solvent models. The proton exchange scheme was further applied to predict the pK_a values of some recently synthesized oxacam derivatives, and these values are estimated to have an error bar of less than 2 units. The substantial difference in the pK_a values exhibited by these derivatives (compared with oxicams 1–5) should allow for more definitive study of structure–activity trends that might exist between the pK_a of these compounds and their biological activity.

Acknowledgment. We gratefully acknowledge support from the Australian Research Council under their Centres of Excellence program and the generous allocation of computing time on the National Facility of the National Computational Infrastructure. M.F.-P. and R.G.-B. acknowledge support from DGSCA-UNAM, for supercomputing resources, and projects DGAPA-UNAM (PAPIIT IN218408) and FES-CUAUTITLAN (PACIVE CG11) for financial support. M.F.-P. acknowledges CONACyT for a Ph.D. scholarship.

Supporting Information Available: Full computational results, including electronic, solvation-free, and CPCM-UAQS solution-free energies and Gaussian archive entries for B3LYP/6-31+G(d) optimized geometries. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References and Notes

- Lombardino, J. G.; Wiseman, E. H. *Med. Res. Rev.* **1982**, *2*, 127.
- Lombardino, J. G.; Wiseman, E. H. *Trends Pharmacol. Sci.* **1981**, *132*.
- Lombardino, J. G.; Wiseman, E. H. *J. Med. Chem.* **1972**, *15*, 848.
- Tsai, R.-S.; Carrupt, P.-A.; Tayar, N. E.; Giroud, Y.; Andrade, P.; Testa, B. *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 842.
- Takacs-Novak, K.; Kokosi, J.; Podanyi, B.; Noszal, B.; Tsai, R.-S.; Lisa, G.; Carrupt, P.-A.; Testa, B. *Helv. Chim. Acta* **1995**, *78*, 553.
- Koczian, K.; Volgyi, G.; Kokosi, J.; Noszal, B. *Helv. Chim. Acta* **2007**, *90*, 1681.
- Demiralay, E. C.; Alsancak, G.; Ozkan, S. A. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 2928.
- Rodriguez-Barrientos, D.; Rojas-Hernandez, A.; Gutierrez, A.; Moya-Hernandez, R.; Gomez-Balderas, R.; Ramirez-Silva, M. T. *Talanta* **2009**, *80*, 754.
- Bernhard, E.; Zimmermann, M. D. *Arzneim.-Forsch., Beih.* **1984**, *34*, 647.
- Luger, P.; Daneck, K.; Engel, W.; Trummlitz, G. W.; Klaus, S. *Eur. J. Pharm. Sci.* **1996**, *4*, 175.
- Ho, J.; Coote, M. L. *Theor. Chem. Acc.* **2010**, *125*, 3.
- Krol, M.; Wrona, M.; Page, C. S.; Bates, P. A. *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, *2*, 1520.
- Bahers, T. L.; Adamo, C.; Ciofini, I. *Chem. Phys. Lett.* **2009**, *472*, 30.
- Adam, K. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 11963.
- Zhang, S.; Baker, J.; Pulay, P. *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 425.
- Zhang, S.; Baker, J.; Pulay, P. *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 432.
- Curtiss, L. A.; Redfern, P. C.; Raghavachari, K. *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 84108.
- Curtiss, L. A.; Redfern, P. C.; Raghavachari, K.; Rassolov, V.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 4703.
- Baboul, A. G.; Curtiss, L. A.; Redfern, P. C.; Raghavachari, K. *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 7650.
- Curtiss, L. A.; Redfern, P. C.; Raghavachari, K.; Rassolov, V.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 4703.
- Curtiss, L. A.; Redfern, P. C.; Raghavachari, K.; Rassolov, V.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, 7764.
- Montgomery, J. A.; Frisch, M. J.; Ochterski, J. W.; Petersson, G. A. *J. Chem. Phys.* **2000**, *112*, 6532.
- Montgomery, J. A., Jr.; Frisch, M. J.; Ochterski, J. W.; Petersson, G. A. *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 2822.
- Ochterski, J. W.; Petersson, G. A.; Montgomery, J. A. *J. Chem. Phys.* **1996**, *104*, 2598.
- Klamt, A.; Schurmann, G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1993**, 799.
- Barone, V.; Cossi, M. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 1995.
- Cossi, M.; Rega, N.; Scalmani, G.; Barone, V. *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 669.
- Cances, M. T.; Mennucci, B.; Tomasi, J. *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 3032.
- Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cances, M. T. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **1999**, *464*, 211.
- Mennucci, B.; Tomasi, J. *J. Chem. Phys.* **1997**, *106*, 5151.
- Mennucci, B.; Cances, M. T.; Tomasi, J. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 10506.
- Foresman, J. B.; Keith, T. A.; Wiberg, K. B.; Snoonian, J.; Frisch, M. J. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 16098.
- Kelly, C. P.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *J. Chem. Theory Comput.* **2005**, *1*, 1133.
- Marenich, A. V.; Olson, R. M.; Kelly, C. P.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *J. Chem. Theory Comput.* **2007**, *3*, 2011.
- Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6378.
- Liptak, M. D.; Shields, G. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7314.
- Namazian, M.; Zakery, M.; Noorbala, M. R.; Coote, M. L. *Chem. Phys. Lett.* **2008**, *451*, 163.
- Liptak, M. D.; Gross, K. C.; Seybold, P. G.; Feldgus, S.; Shields, G. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6421.
- Ho, J.; Coote, M. L. *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, *5*, 295.
- Eckert, F.; Diedenhofen, M.; Klamt, A. *Mol. Phys.* **2010**, *108*, 229.
- Kelly, C. P.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 2493.
- Pliego, J. R., Jr.; Riveros, J. M. *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 7241.
- Kelly, C. P.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 16066.
- Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A., Jr.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. *Gaussian 03*, Revision C.02; Gaussian; Wallingford, CT, 2004.
- MOLPRO version 2009.1 is a package of ab initio programs written by Werner, H.-J.; Lindh, P. J. K., R. Manby, F. R. Schütz, M. Celani, P. Korona, T. Mitrushenkov, A. Rauhut, G. Adler, T. B. Amos, R. D. Bernhardtsson, A. Berning, A. Cooper, D. L. Deegan, M. J. O. Dobbyn, A. J. Eckert, F. Goll, E. Hampel, G. Hetzer, G. Hrenar, T. Knizia, G. Köppl, C. Liu, Y. Lloyd, A. W. Mata, R. A. May, A. J. McNicholas, S. J. Meyer, W. Mura, M. E. Nicklaß, A. Palmieri, P. Pflüger, K. Pitzer, R. Reiher, M. Schumann, U. Stoll, H. Stone, A. J. Tarroni, R. Thorsteinsson, T. Wang, M. Wolf A.
- Scott, A. P.; Radom, L. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 16502.
- Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A., Jr.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.;

Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J. *Gaussian 09*, R. A.; Gaussian: Wallingford, CT, 2009.

(48) Takano, Y.; Houk, K. N. *J. Chem. Theory Comput.* **2005**, *1*, 70.

(49) Klamt, A. *COSMO-RS: From Quantum Chemistry to Fluid Phase Thermodynamics and Drug Design*; Elsevier Science: Amsterdam, The Netherlands, 2005.

(50) Klamt, A.; Jonas, V.; Burger, T.; Lohrenz, J. C. W. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 5074.

(51) Klamt, A. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 2224.

(52) Pye, C. C.; Ziegler, T.; van Lenthe, E.; Louwen, J. N. *Can. J. Chem.* **2009**, *87*, 790.

(53) Louwen, J. N.; Pye, C.; Lenthe, E. v. ADF2008.01 COSMO-RS, SCM, Theoretical Chemistry, Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands, <http://www.scm.com>, 2008.

(54) Vreven, T.; Morokuma, K. *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, 1419.

(55) Vreven, T.; Morokuma, K. *J. Chem. Phys.* **1999**, *111*, 8799.

(56) Nicolas, C.; Verny, M.; Giraud, I.; Ollier, M.; Rapp, M.; Maurizis, J.-C.; Madelmont, J.-C. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 5235.

(57) Vidal, A.; Chezal, J.-M.; Mounetou, E. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 405.

(58) Bubenjak, M.; Noszal, B.; Koczian, K.; Takacs, M.; Beni, S.; Hermezc, I.; Kokosi, J. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5711.

(59) NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database No. 69; Linstrom, P. J.; Mallard, W. G., Eds.; National Institute of Standards and Technology: Gaithersburg, MD, <http://webbook.nist.gov>, retrieved Aug. 12, 2010.

JP107890P