

## TESIS DOCTORALES

### ESTUDIO TEÓRICO DE LA HIPOXANTINA Y DERIVADOS

Desde que en 1953 J.D. Watson y F.H.C. Crick descifraron la estructura del ácido desoxirribonucleico (DNA) y del ácido ribonucleico (RNA), se han venido realizando diversos trabajos de investigación sobre estas moléculas y sus componentes adquiriendo especial atención los medicamentos derivados de ellas.

Dentro de las moléculas que tienen interés por su aplicación en Medicina se encuentra la base púrica hipoxantina (HX) y sus derivados: aciclovir (ACV) y el nucleósido inosina (INO) y, por su analogía con HX, el isómero alopurinol (ALO).

Son medicamentos aplicados en la terapia de diferentes enfermedades como el herpes, la gota, la infección por el virus de inmunodeficiencia humano (HIV), determinados tumores, el síndrome bipolar y otras enfermedades psiquiátricas.

Esta investigación ha tenido como objetivo el estudio teórico de la estructura, propiedades y aplicaciones de dichos fármacos. Establecer las posibles conformaciones, su estabilidad, así como las interacciones moleculares con otras moléculas principalmente con el agua.

Para ello se han utilizado los métodos desarrollados en la Química Cuántica (QM). Así se ha centrado nuestra atención en obtener las estructuras más estables (tautómeros y, en su caso, confómeros) de las moléculas. Se determinaron todas las posibles estructuras estudiando con más detalle las que presentaban mayor estabilidad, de éstas se logró la completa optimización de todos sus parámetros geométricos y se analizaron en detalle sus parámetros conformacionales ( $\chi$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$ , P,  $v_{\text{máxima}}$ ).

La corrección ZPE (zero - point energy) corresponde a la energía en el punto cero. Se considera que los átomos tienen una energía vibracional residual a muy bajas temperaturas no estando fácilmente unidos para formar un sólido estable.

Se ha determinado la estabilidad de los tautómeros, sus características y su población mediante la ecuación de Boltzman en los niveles de cálculo B3LYP y MP2.

El estado sólido se ha simulado mediante el diseño y cálculo computacional del dímero, trímero y tetrámero y, en ocasiones, pentámero y heptámero, comparando los datos obtenidos con aquellos publicados experimentalmente mediante rayos X.

Para la descripción de la hidratación de las moléculas, (HX y ALO) se empleó el modelo explícito con la corrección, en los cálculos de la energía, por BSSE (Basis Set Superposition Error) usando el procedimiento CP (Counterpoise Procedure). La corrección del CP en la energía de formación del complejo BW<sub>n</sub> se calcula como suma de dos valores: la interacción *base-agua* y  $\Delta E_{B-(W_n)}^{CP}$  *agua-agua*  $\Delta E_{(W_n)}^{CP}$ .

$\Delta E_{B-(W_n)}^{CP} = \Delta E_{B-(W_n)}^{CP} + \Delta E_{(W_n)}^{CP}$ ; en la que  $\Delta E_{B-(W_n)}^{CP}$  se calcula según:

$$\Delta E_{B-(W_n)}^{CP} = E_{BW_n}^{(BW_n)}(BW_n) - E_B^{(BW_n)}(BW_n) - E_{(W_n)}^{(BW_n)}(BW_n) + E_B^{(def)}(BW_n)$$

y la corrección CP, corrección de la energía de interacción *agua-agua*, correspondiente a la energía de formación de la molécula de agua *n*, en presencia de la base B, se calcula según:

$$E_{(W_n)}^{CP} = E_{(W_n)}^{(BW_n)}(BW_n) - \sum_{n=1}^n E_{W_i}^{(BW_n)}(BW_n) + \sum_{n=1}^n E_{W_i}^{(def)}(BW_n)$$

y la energía de deformación del monómero X (X=B ó W) que viene dada por:

$$E_X^{(def)}(BW_n) = E_X^{(X)}(BW_n) - E_X^{(X)}(X)$$

Los subíndices indican el sistema molecular y los superíndices indican si los cálculos se realizan con la base B, con la base de una molécula de agua (W), o con la base del sistema (B-W<sub>n</sub>). Entre paréntesis se indica si el cálculo se hace en la geometría optimizada del sistema (BW<sub>n</sub>) o en el monómero X.

La Figura 1 muestra la estructura de las cuatro moléculas en estudio y la correspondiente numeración, nombrando según la notación adoptada en la que se indica la situación de los átomos de H en las moléculas.

Se estudiaron los posibles tautómeros de estos compuestos: los más estables de HX y de ALO, seis y once respectivamente, determinando su estructura y sus car-

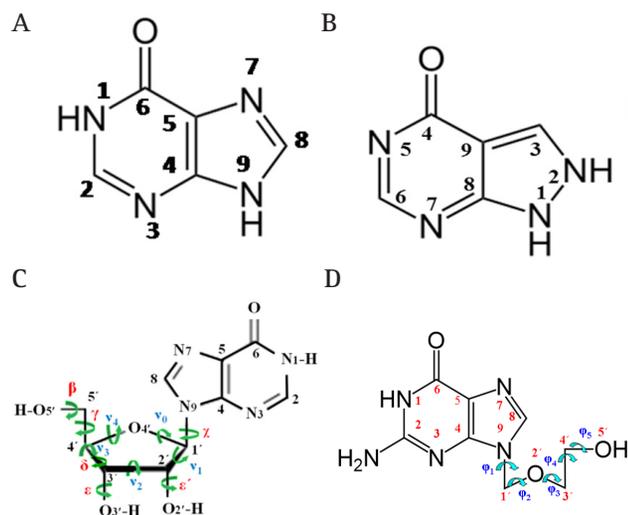


Figura 1. Estructura molecular y numeración de (A) HX (HX-19), (B) alopurinol (ALO-12), (C) INO (N1) y (D) ACV.

gas y energías en los niveles B3LYP/6-31G(d,p), B3LYP/6-311++G(3df,pd), MP2/6-31G(d,p), MP2/6-311++G(2d,p), M052X/6-31G(d,p) y M06L/6-31G(d,p) partiendo de MP2 como referencia.

En la Figura 2 se indica la energía de los seis tautómeros más estables de HX en el nivel de cálculo MP2/6-311++G(2d,p) observándose que los más estables son HX-17 (que tiene el valor de la energía más bajo, también en todos los niveles de cálculo y que, además, es el más poblado) y HX-19.

En ALO el principal tautómero es ALO-15, seguido, muy alejado, de ALO-25. En la Tabla 1 se muestran los tautómeros estudiados y sus energías en kcal/mol.

En el estudio de la hidratación de HX y ALO se determinaron las posiciones más favorables para la prime-

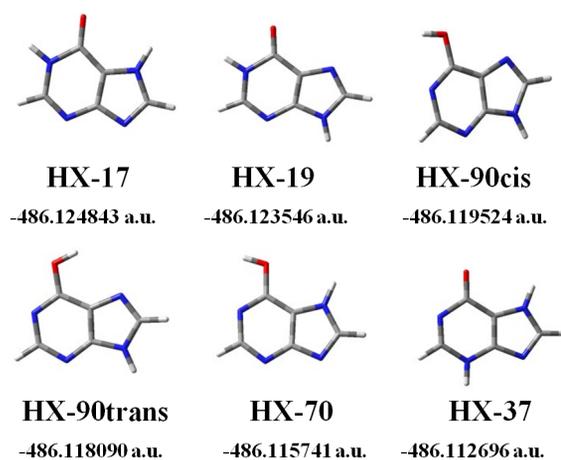


Figura 2. Los seis tautómeros más estables de HX y sus energías en el nivel de cálculo MP2/6-311+G(2d,p).

ra molécula de agua, tres para HX y cuatro para ALO. Se ha procedido sumando una primera molécula de agua en las posiciones posibles y tomando la de menor energía y situando en ésta la segunda molécula de agua, también en todas las posiciones posibles. El proceso continúa situando la tercera molécula de agua en el dihidrato más estable y así sucesivamente. Con la adición de nuevas moléculas de agua se obtiene una primera esfera de hidratación con 13 moléculas de agua en HX y 12 en ALO-25 y, continuando el proceso, se obtendrán los agregados con 15, 20, 25 y 30 moléculas de agua.

Se empleó el modelo explícito con la corrección, en los cálculos de la energía, por BSSE usando el procedimiento CP. Se calcularon las energías de deformación de la molécula, y de la primera molécula de agua en cada una de las posiciones estudiadas, así como la fuerza de los enlaces de H entre la molécula de HX-17 o HX-19 y

Tabla 1. Energía relativa en kcal/mol de los tautómeros más estables del alopurinol respecto del menor valor en cada nivel en kcal/mol.

Tautómeros	B3LYP/6-31G(d,p)	( $\Delta$ G) B3LYP/6-31G(d,p)	MP2/6-311++G(2d,p)	M052X/631G(d,p)	M06L/6-31G(d,p)	MP2/cc-pvtz	% 273.15K
(ALO-15)	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>f</sup>	99.9
(ALO-25)	3.694	3.717	2.709	3.845	3.620	2.716	0.1
(ALO-16C)	5.370	5.436	4.759	3.834	6.291	4.255	<0.005
(ALO-16t)	10.983	10.798	10.065	9.547	6.291	9.393	<0.005
(ALO-26C)	12.600	12.671	10.048	11.600	13.126	9.630	<0.0005
(ALO-27)	12.901	12.764	12.789	13.308	13.225	13.094	<0.00
(ALO-17)	17.698	17.423	18.220	18.401	18.121	18.540	<0.005
(ALO-26t)	19.344	19.485	16.313	18.671	19.790	15.698	<0.005
(ALO-76C)	25.162	25.188	23.802	25.229	25.638	24.452	<0.005
(ALO-12)	34.112	33.815	50.528	35.795	34.403	39.829	<0.005
(ALO-56C)	40.004	39.619	39.047	40.867	40.934	38.871	<0.005

<sup>a</sup> 305646.695 kcal/mol; <sup>b</sup> 305666.438 kcal/mol; <sup>c</sup> 305035.56 kcal/mol; <sup>d</sup> 305614.829 kcal/mol; <sup>e</sup> 305620.917 kcal/mol; <sup>f</sup> 305151.458 kcal/mol

las moléculas de agua, que nos indica la posición del monohidrato más estable en B3LYP y MP2. De la misma forma se calcularon la energía de deformación, de interacción y la energía de formación en los complejos de HX-19, HX-17 y ALO-15 con 10 y 20 moléculas de agua. Se observa que los valores de la energía de formación de los complejos de HX-19 y HX-17, con 20 y con 10 moléculas de agua respectivamente, son prácticamente iguales en ambos casos; además, en las moléculas hidratadas, los cambios que sufren los enlaces C=O y N1-H en los tautómeros HX-19 y HX-17 aumentan en la primera esfera de hidratación pero en la segunda esfera permanecen estables.

Todos estos hidratos de ALO-15 presentan una estructura similar. En general las longitudes de enlace aumentan al aumentar la hidratación pero a partir de la molécula 15 la estructura se estabiliza y las longitudes de enlace no varían. Los hidratos de ALO-25 (solamente en el nivel de cálculo B3LYP) tienen una variación análoga a la de ALO-15.

De INO Y ACV se obtuvieron cinco tautómeros, en la Figura 3 se muestran los tautómeros de INO y los incrementos de energía en el nivel de cálculo MP2 y la riqueza de los tautómeros, siendo el más estable N1 y también el más abundante. Este trabajo se centró en el estudio de la estructura de los conformémeros de dicho tautómero obteniéndose 69 conformémeros estables que se clasificaron según los valores del ángulo  $\chi$ : A (*high - anti*) (los más estables)  $\chi \sim 170^\circ$ , B (*syn*)  $\chi \sim 70^\circ$  y C (*anti*)  $\chi \sim 120^\circ$  con valores de  $\beta$  y  $\gamma \sim 60^\circ$ . Todos dentro de un rango de

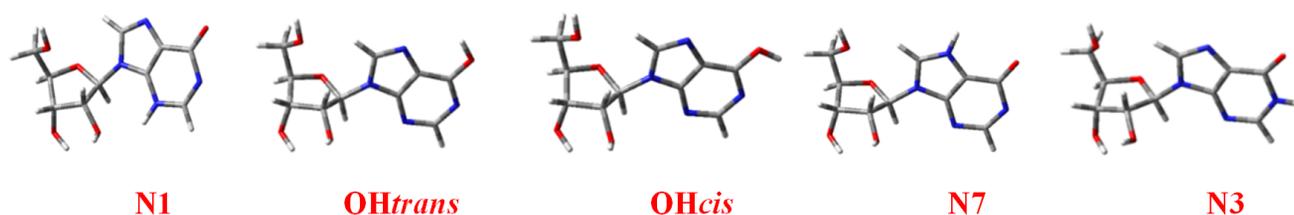
energía 0-10.7 kcal/mol. Se han calculado los ángulos exocíclicos y endocíclicos, el ángulo P, definido según:

$$\text{tg}P = \frac{(v_4 + v_1) - (v_3 + v_0)}{2 v_2 (\sin(36) + \sin(72))}$$

y  $v_{\text{max}}$ , definida según:  $v_{\text{max}} = v_2 / \cos P$ , y el momento dipolar  $\mu$  y, principalmente, su energía en todos los niveles de cálculo. En la Tabla 2, por motivos de espacio, solamente figura el nivel B3LYP/6-31G(d,p) y solamente los conformémeros más estables A1, A2, B1 y B2. Los ángulos torsionales endocíclicos y exocíclicos en grados, el ángulo pseudorrotacional P en grados y los incrementos de energía en kcal/mol.

ACV presenta una estructura en la que la base guanina se une a una cadena; el conjunto concuerda con la forma *trans* de la desoxiguanosina. Tiene cinco posibles tautómeros, tres formas ceto N1, N3 y N7 y dos formas enol OHC (*cis*) y OHT (*trans*) según la posición del H de la base. N1 es el más estable y también el más abundante. El estudio conformacional de éste se realiza por rotación de los ángulos torsionales exocíclicos  $\varphi_1, \varphi_2, \varphi_3, \varphi_4$  y  $\varphi_5$  en pasos de  $60^\circ$  entre  $0^\circ$  y  $360^\circ$ . Los conformémeros se clasifican según el valor del ángulo  $\varphi_1$ : conformémeros A con el valor de  $\varphi_1$  negativo y conformémeros B con  $\varphi_1$  positivo. Se obtuvieron 78 conformémeros de los cuales 47 son A y los restantes B.

Se ha considerado la estructura de la cadena en ACV como análoga a la del azúcar en los nucleósidos y, además, se han definido otros parámetros en concordancia con otros trabajos previos:



**0 kcal/mol (99.8%)    3.117 kcal/mol (0.4 %)    8.819 kcal/mol (< 0.01%)    21.060 kcal/mol (< 0.01%)    24.775 kcal/mol**

Figura 3. Tautómeros estables calculados de la molécula de INO, incrementos de energía y %.

Tabla 2 (muy reducida). Los 4 conformémeros de menor energía de INO,  $\Delta E$  y  $\Delta G$  en el nivel de cálculo B3LYP/6-31G(d,p). Los ángulos torsionales endocíclicos y exocíclicos en grados, el ángulo pseudorrotacional P en grados y los incrementos de energía en kcal/mol.

	$\chi$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$	$\epsilon$	$\epsilon'$	v0	v1	v2	v3	v4	P	vmax	$\mu$	$\Delta E$	$\Delta G$
A1	167.4	65.0	57.1	145.3	150.7	59.4	-25.9	37.4	-34.1	20.5	3.3	156.3	37.2	3.859	0	0
A2	178.1	172.9	51.8	149.5	146.8	55.0	-13.5	29.9	-33.8	27.4	-8.9	176.1	33.9	3.908	1.135	0.784
B1	54.1	66.9	48.2	160.3	149.2	151.5	-21.9	35.8	-35.4	23.9	-1.5	163.5	36.9	4.578	0.212	0.705
B2	54.9	65.8	46.6	148.5	-85.5	-86.0	-21.3	33.8	-33.0	22.0	-0.6	162.3	34.6	6.709	0.244	0.585

$\Delta E = 0 = -983.184779$  a.u., en el nivel B3LYP/6-31G(d,p)

Tabla 3 (muy reducida). Los 4 conformeros de menor energía de ACV,  $\Delta E$  en el nivel de cálculo B3LYP/6-311++G(3df,pd). La distancia R en Å, los ángulos torsionales en grados, el momento dipolar en debyes, los incrementos de energía en kcal/mol.

Conf.	R	$\beta$	$\Phi$	$\varphi_1$	$\varphi_2$	$\varphi_3$	$\varphi_4$	$\varphi_5$	$\mu$	$\Delta E$
A1	3.963	72.5	54.3	-75.3	146.4	-88.5	69.8	-69.3	5.739	0
A2	3.774	76.8	52.5	-97.7	65.9	74.6	-67.0	-34.1	5.367	1.258
B1	3.928	73.4	53.4	75.1	-146.7	95.5	-68.8	72.8	5.812	0.072
B2	3.770	77.2	52.0	97.0	-66.7	-74.1	66.6	36.1	5.348	1.216

$\Delta E = 0 = -811.214731$  a.u. en el nivel B3LYP/6-311++G(3df,pd)

El vector **R** (N9...O5') que determina la distancia del grupo OH respecto de la base. El ángulo  $\beta$  (C4-N9...O5') que define el ángulo del grupo OH respecto del plano de la base. El ángulo  $\Phi$  (C1'-N9...O5') que determina la posición del grupo OH y tiene similitudes con el ángulo  $\beta$  de los nucleósidos.

Con estos datos se ha obtenido la tabla correspondiente de los diferentes conformeros de N1 en todos los niveles de energía. La Tabla 3 solamente presenta los valores de los cuatro conformeros más estables en B3LYP/6-311++G(3df,pd).

Las cargas atómicas se determinaron en todas las moléculas por el método NBO (natural bonding orbital) observándose: en la molécula de HX la carga negativa mayor en los tautómeros HX-17 y HX-19 corresponde a los átomos O6 y N1 y, en consecuencia, la mayor carga positiva a C6. En ALO-15 y ALO-25 la mayor carga negativa corresponde a N5 y O. En INO la mayor carga negativa sobre O2' y O3' y la positiva sobre C6 y en ACV sobre N2 y O5' (en MP2) y la positiva sobre C6 y C2.

Los espectros obtenidos presentan buena concordancia con los datos experimentales.

El espectro FT-IR y Raman se ha obtenido dentro de las frecuencias  $\sim 160 / 3700 \text{ cm}^{-1}$  para HX y se han analizado e interpretando los diferentes valores, y asignándoles los correspondientes modos normales de vibración, previa comparación con los valores experimentales en

fase gaseosa. El espectro IR calculado del conformero A1 de INO presenta las principales vibraciones correspondientes a los valores experimentales de HX. El espectro IR del conformero A1 de ACV presenta algunas concordancias con el espectro experimental de la guanina.

Las longitudes de enlace calculadas, en general, presentan valores muy próximos a los experimentales, solamente ACV presenta diferencias significativas. En las moléculas hidratadas, los cambios que sufren los enlaces C=O y N1-H en los tautómeros HX-19 y HX-17, aumentan en la primera esfera de hidratación pero en la segunda esfera permanecen estables. Todos los hidratos de ALO-15 presentan una estructura similar.

Se obtuvieron las estructuras sólidas más próximas a las experimentales. Se observa buena concordancia del tetrámero con los datos experimentales en HX-19. El estado sólido de ALO-15 se ha representado mediante la figura del heptámero, que tiene la estructura análoga a la obtenida experimentalmente mediante rayos X. En INO el pentámero presenta una mayor concordancia con los valores experimentales. El estado sólido de ACV simulado mediante la estructura del dímero y del tetrámero, da unos valores que concuerdan con los obtenidos por rayos X.

Margarita Clara Álvarez Ros  
Dpto. de Ciencias y Técnicas Fisicoquímicas