

## Artigo

**Estudo da Estabilidade Relativa dos Tautômeros da Fenilbutazona e Cálculo Dos Espectros UV-Vis e ECD****Souza, A. R.; Ximenes, V. F.; Morgon, N. H.\****Rev. Virtual Quim.*, 2016, 8 (2), 525-535. Data de publicação na Web: 9 de abril de 2016<http://rvq.sbq.org.br>**Study of relative stability of tautomeric forms of phenylbutazone and calculation of UV-Vis and ECD spectra**

**Abstract:** In this work, a theoretical study was carried out to investigate the electronic structures of the deprotonated form of phenylbutazone. Considering a relaxed PES scan from three selected dihedral angles ( $\delta_1$ ,  $\delta_2$ , and  $\delta_3$ ) and by the conformational analysis (Boltzmann distribution), at PM3 methodology, eight most important structures were obtained. These structures were optimized and the TD-DFT/PCM (aqueous solvent) at B3LYP/6-31G(d) level and calculations of the UV-Vis and ECD spectra were obtained at CAM-B3LYP/6-311++G(d,p) methodology. Absorption maxima occur at 230 to 250 nm.

**Keywords:** TD-DFT; Electronic and Molecular Structures; Electronic Circular Dichroism; Phenylbutazone.

**Resumo**

Neste trabalho foi feito um estudo teórico das estruturas eletrônicas da forma desprotonada da fenilbutazona. Pela análise populacional de confôrmeros do ânion, obtidos a partir da varredura (SCAN relaxado) de três ângulos diedros selecionados ( $\delta_1$ ,  $\delta_2$  e  $\delta_3$ ) obteve-se um conjunto de 8 estruturas, no nível de cálculo PM3. Otimizou-se esses confôrmeros utilizando DFT (B3LYP/6-31G(d)) e nas geometrias de equilíbrio calculou-se os espectros eletrônicos UV-Vis e de dicróismo circular eletrônico (ECD) empregando o método CAM-B3LYP/6-311++G(d,p), através do formalismo TD-DFT e com efeito de solvente aquoso descrito pelo método PCM. Os máximos de absorção observados ocorrem entre 230 a 250 nm.

**Palavras-chave:** TD-DFT; Estruturas Eletrônicas e Moleculares; Dicroísmo Circular Eletrônico; Fenilbutazona.

\* Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Caixa Postal 6154, CEP 13083-970, Campinas-SP, Brasil.

✉ [morgon@iqm.unicamp.br](mailto:morgon@iqm.unicamp.br)

DOI: [10.5935/1984-6835.20160039](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20160039)

## Estudo da Estabilidade Relativa dos Tautômeros da Fenilbutazona e Cálculo Dos Espectros UV-Vis e ECD

Aguinaldo R. de Souza,<sup>a</sup> Valdecir F. Ximenes,<sup>a</sup> Nelson H. Morgon<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências de Bauru, Departamento de Química, CEP 17030-360, Bauru-SP, Brasil.

<sup>b</sup> Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, CEP 13083-970, Campinas-SP, Brasil.

\* [morgon@iqm.unicamp.br](mailto:morgon@iqm.unicamp.br)

*Recebido em 9 de abril de 2016. Aceito para publicação em 9 de abril de 2016*

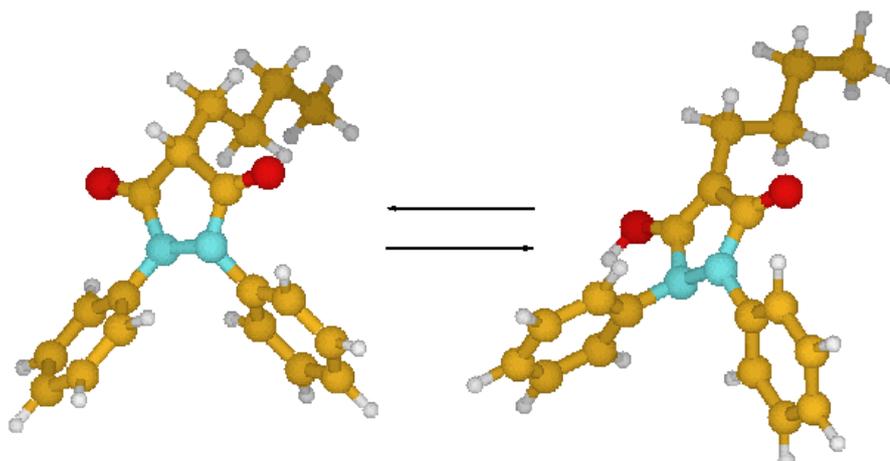
1. Introdução
2. Metodologia Computacional
3. Resultados e Discussão
4. Conclusões

### 1. Introdução

---

A fenilbutazona é um fármaco de ação anti-inflamatória, antipirética e analgésica, e embora também possa ser utilizada contra a artrite da gota, os efeitos colaterais desaconselham seu uso nestes casos.<sup>1</sup> Graças

a esta diversidade de aplicações, esta molécula tem sido sistematicamente estudada em muitos trabalhos que abordam a sua utilização tanto em humanos como em animais, principalmente em cães e cavalos.<sup>2-5</sup> A forma cetônica da fenilbutazona coexiste em equilíbrio tautomérico com a forma enólica, como apresentado na Fig. 1.



**Figura 1.** Equilíbrio ceto-enólico da fenilbutazona

Maczka e colaboradores realizaram um estudo teórico bastante abrangente sobre o tautomerismo ceto-enólico da fenilbutazona, bem como cálculos de acidez em fase gasosa e de suas propriedades espectrais.<sup>6</sup> As diferenças fundamentais entre o nosso trabalho e o dos pesquisadores citados são: (a) o nosso estudo visa principalmente a análise de espectros eletrônicos de dicroísmo circular, considerando-se cálculos TD-DFT/CAM-B3LYP em solvente aquoso, enquanto que no trabalho de Maczka e colaboradores faz-se uma análise específica do equilíbrio ceto-enólico (diferenças de energia, estados de transição e espectros IV), além de cálculos de espectros UV-Vis no nível de teoria TD-DFT/B3LYP, (b) os autores também fazem estudo conformacional usando MOE (*Molecular Operating Environment*),<sup>7</sup> cuja busca utiliza-se de metodologias estocástica, sistemática ou de dinâmica molecular. Já a nossa estratégia é puramente baseada na varredura relaxada ao longo de ângulos diedros preferenciais (discutida adiante), e (c) e nosso interesse

está na análise espectroscópica da forma do enolato (forma aniônica da fenilbutazona), pois vários dos resultados experimentais são obtidos em pH básico (pH fisiológico).<sup>8, 9</sup> A presença de um plano de simetria na molécula de fenilbutazona, na forma cetônica confere à mesma a propriedade de girar o plano da luz plano polarizada. Assim, é possível utilizar informações de espectros de dicroísmo circular eletrônico (ECD) para caracterizar aspectos de sua estrutura molecular. ECD tem sido utilizado com frequência na caracterização de estruturas com atividade ótica interagindo com sítios enzimáticos.<sup>2, 10, 11</sup> Deste modo, pode-se dizer que, graças aos cálculos mecânico-quânticos de dicroísmo circular eletrônico tem sido possível a determinação de configurações absolutas de compostos quirais.<sup>12</sup> As transições eletrônicas na região do ultravioleta e do visível, UV-Vis, e de dicroísmo circular eletrônico estão relacionados à absorção de fótons. Tais absorções podem ser analisadas considerando-se a Lei de Beer-Lambert (Eq. 1).

$$I = I_0 \cdot e^{-\epsilon Cl} \quad (1)$$

onde  $C$  é a concentração da substância,  $l$  o comprimento do caminho ótico do recipiente contendo a substância e  $\epsilon$  o coeficiente de

absorção. Este coeficiente está relacionado com a energia de excitação e com o momento de transição entre os estados

fundamental (0) e excitados (n). No espectro eletrônico UV-Vis a intensidade da absorção pode ser dada em termos da "força" do

dipolo (D) ou pela "força" do oscilador (f), descritas pelas Eqs. 2 e 3, respectivamente.

$$f_{0 \rightarrow n} \propto \int |\Psi_0 \hat{\mu} \Psi_n|^2 d\tau \quad (3)$$

e

$$D \propto \int \frac{\epsilon(\tilde{\nu})}{\tilde{\nu}} d\tilde{\nu} \quad (2)$$

onde  $\tilde{\nu}$  é a energia de excitação (em número de onda) correspondente à excitação eletrônica de interesse e  $\hat{\mu}$  o momento de

dipolo associado à transição 0→n. A relação entre estas duas grandezas é dada pela seguinte equação (Eq. 4):

$$f_i = \frac{8\pi^2 \tilde{\nu}_i m_e c}{3he^2} D_i \quad (4)$$

onde  $f_i$  é (adimensional) a força do oscilador correspondente à excitação eletrônica de interesse e  $D_i$  é a correspondente força do dipolo.  $\tilde{\nu}_i$  é a i-ésima energia de excitação (em número de onda). As outras constantes são: a carga (e) e a massa do elétron ( $m_e$ ).

oticamente ativas, da luz circularmente polarizada à direita e à esquerda. E neste caso a intensidade da transição geralmente é descrita pela diferença entre os coeficientes de absorção da luz circularmente polarizada à esquerda -  $\epsilon_L(\lambda)$  e à direita -  $\epsilon_R(\lambda)$ , num dado comprimento de onda ( $\lambda$ ) (Eq. 5):

Dicroísmo Circular é o diferencial de absorção, observado em moléculas quirais

$$\Delta\epsilon = \epsilon_L(\lambda) - \epsilon_R(\lambda) \quad (5)$$

A "força" rotacional (R) é uma propriedade equivalente à "força" do dipolo (D) para uma dada transição eletrônica. A relação entre  $\Delta\epsilon$  e a força rotacional em ECD é análoga à aquela entre  $\epsilon$  e a força do dipolo

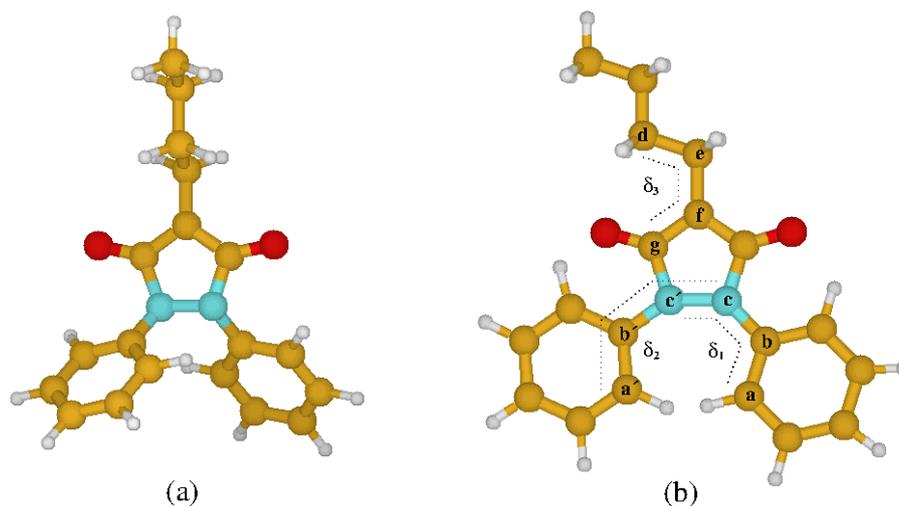
em absorção UV-Vis.<sup>12</sup> Para um molécula rotacionando livremente R pode ser descrito como um produto escalar dos momentos de dipolo de transição elétrico e magnético (Eq. 6):

$$R \propto \int \Psi_0 \hat{\mu}_{dip. elet.} \Psi_n d\tau \int \Psi_n \hat{\mu}_{dip. magn.} \Psi_0 d\tau \quad (6)$$

## 2. Metodologia Computacional

O estudo do ECD da fenilbutazona foi realizado com a molécula na sua forma

aniônica, ou seja, o enolato correspondente. Muitos dos dados experimentais são feitos em pH fisiológico (7,2), daí a necessidade de se utilizar sua forma desprotonada (Fig. 2a).



**Figura 2.** (a) Forma desprotonada da fenilbutazona e (b) Ângulos diedros selecionados

Os cálculos pela busca das conformações mais estáveis foram realizados a partir das possibilidades definidas pelas rotações ao longo de três ângulos diedros selecionados, como descrito na Fig. 2b,  $\delta_1$ ,  $\delta_2$  e  $\delta_3$  e definidos a partir dos átomos identificados  $C_a-C_b-N_c-N_c$ ,  $C_a-C_b-N_c-N_c$  e  $C_d-C_e-N_f-N_g$ , respectivamente. A obtenção das conformações, a partir de cálculos semiempíricos, PM3, procedeu-se considerando a varredura (SCAN relaxado) de  $\delta_1$  e  $\delta_2$  entre 0,0 e 180,0 graus e  $\delta_3$  entre 0,0 e 360,0 graus, em intervalos de 30,0 graus. Foram obtidas um total de 637 conformações do enolato da fenilbutazona. Nas estruturas

obtidas pela varredura, realizou-se a análise vibracional harmônica, na mesma metodologia computacional. Esta análise visa, não a caracterização de pontos estacionários, visto que a otimização é feita com restrições na geometria, mas apenas serve como uma estimativa da contribuição da correção térmica de Gibbs definida na Eq. 7. Utilizando-se as energias associadas à cada confômero procedeu-se à distribuição populacional com o intuito de obter de uma maneira qualitativa a contribuição individual destes confômeros, como descrito pela Eq. 7:

$$P_i = \frac{e^{-\Delta(E_i)/RT}}{\sum_{i=1}^N e^{-\Delta(E_i)/RT}} \quad (7)$$

onde  $P_i$  e  $E_i$  são a população e a energia do  $i$ -ésimo confômero obtida a partir da energia

eletrônica e correção térmica de Gibbs, respectivamente à temperatura  $T$  de 298,15

K.

Os 8 confôrmeros com um valor mais alto de  $P_i$ , tiveram suas geometrias completamente reotimizadas no nível de teoria B3LYP/6-31G(d) incluindo efeito de solvente aquoso através do método polarizável contínuo (PCM) e em seguida feito as respectivas análises vibracionais harmônicas neste mesmo nível de teoria. Aqui sim, o objetivo da análise vibracional é a caracterização de mínimos na superfície de energia potencial. Os espectros de UV-Vis e de dicroísmo circular foram obtidos no nível de teoria CAM-B3LYP/6-311++G(d,p) através do formalismo TD-DFT e sob efeito de solvente. Morgon e Souza descrevem este procedimento de busca conformacional em mais detalhes, bem como o modo de definição dos confôrmeros mais prováveis.<sup>13</sup> Todos os cálculos foram efetuados utilizando-se o Programa Gaussian09.<sup>14</sup>

### 3. Resultados e Discussão

Na Fig. 1 está representado o equilíbrio ceto-enólico para a fenilbutazona. Cálculos no nível de teoria CAM-B3LYP/6-311++G(d,p)//B3LYP/6-31G(d), para estas estruturas em equilíbrio, demonstram que a conformação da molécula de fenilbutazona na forma ceto é aproximadamente 40  $\text{kJ.mol}^{-1}$  mais estável. No entanto, toda a análise espectroscópica foi feita na forma enolato, pois vários dos resultados experimentais são obtidos em pH básico (pH fisiológico).<sup>8,9</sup>

Na forma aniônica da fenilbutazona observa-se uma maior planaridade do anel de cinco membros (Fig. 2), contrariamente à forma protonada. Considerando-se uma análise qualitativa, é possível inferir um

maior grau de deslocalização eletrônica, conduzindo ao surgimento de um número maior de formas de ressonância e conseqüentemente a deslocalização das cargas sobre os átomos de oxigênio.

Na Tabela 1 apresentamos os resultados da distribuição populacional, obtidos utilizando-se a Eq. 7, para o enolato de fenilbutazona calculados no nível de teoria semiempírico PM3. Observa-se que o conjunto de 8 confôrmeros contribuem com 35% da energia do sistema.

Os espectros eletrônicos, UV-Vis e de dicroísmo circular, foram calculados considerando-se o peso estatístico destas 8 estruturas mais estáveis. Apenas para este conjunto, e a partir da análise populacional apresentada na Tabela 2, constatamos que ocorre uma inversão na estabilidade energética relativa entre as estruturas. A estrutura de número 468, na distribuição populacional contribui com 19,01%, sendo a mais importante em termos da distribuição estatística para o sistema em equilíbrio.

Na Tabela 3 estão os valores dos ângulos diedros da estrutura mais estável e percentualmente mais relevante, a 468 (Fig. 3). Observa-se que a estrutura final obtida a partir da varredura com PM3, muda significativamente após a otimização no nível de teoria B3LYP/6-31G(d). As diferenças observadas, tanto entre a ordem de estabilidade, quanto em relação aos valores de ângulos diedros, devem-se a dois fatores: (a) as metodologias utilizadas, PM3 x B3LYP/6-31G(d) e (b) no segundo caso (Tabela 2), a partir das 8 estruturas obtidas com PM3 com restrição de geometria (SCAN relaxado), fez-se uma reotimização completa (sem quaisquer restrição nos parâmetros estruturais) sob efeito de solvente aquoso usando PCM. Logo, é natural que observem-se diferenças significativas entres os dois conjuntos de cálculos.

**Tabela 1.** Distribuição populacional de confôrmeros do enolato de fenilbutazona obtida a partir dos resultados de cálculos no nível PM3, observando-se os ângulos diedros selecionados (em °)

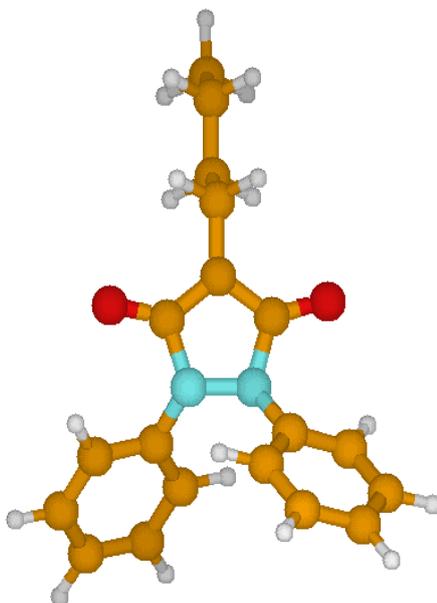
No. Estr.	$\delta_1$	$\delta_2$	$\delta_3$	Pop (%)
181	150,0	120,0	90,0	5,92
457	30,0	60,0	270,0	5,68
163	30,0	60,0	90,0	5,56
475	150,0	120,0	270,0	4,00
174	150,0	90,0	90,0	3,56
468	150,0	90,0	270,0	3,45
132	150,0	120,0	60,0	3,41
114	30,0	60,0	60,0	3,41

**Tabela 2.** Energia Livre de Gibbs (em u. a.) e distribuição populacional para alguns confôrmeros do enolato de fenilbutazona obtidas a partir de cálculos no nível B3LYP/6-31G(d)

No. Estr.	Energia Livre de Gibbs (u.a.)	Pop (%)
468	-995,260836	19,01
132	-995,260739	17,15
174	-995,260584	14,56
181	-995,260549	14,03
114	-995,260448	12,60
457	-995,260367	11,57
475	-995,259746	5,99
163	-995,259593	5,10

**Tabela 3.** Ângulos diedros (em °) da estrutura 468 nos níveis de cálculo PM3 e B3LYP/6-31G(d)

Método	$\delta_1$	$\delta_2$
PM3	150,0	90,0
B3LYP	168,7	167,6

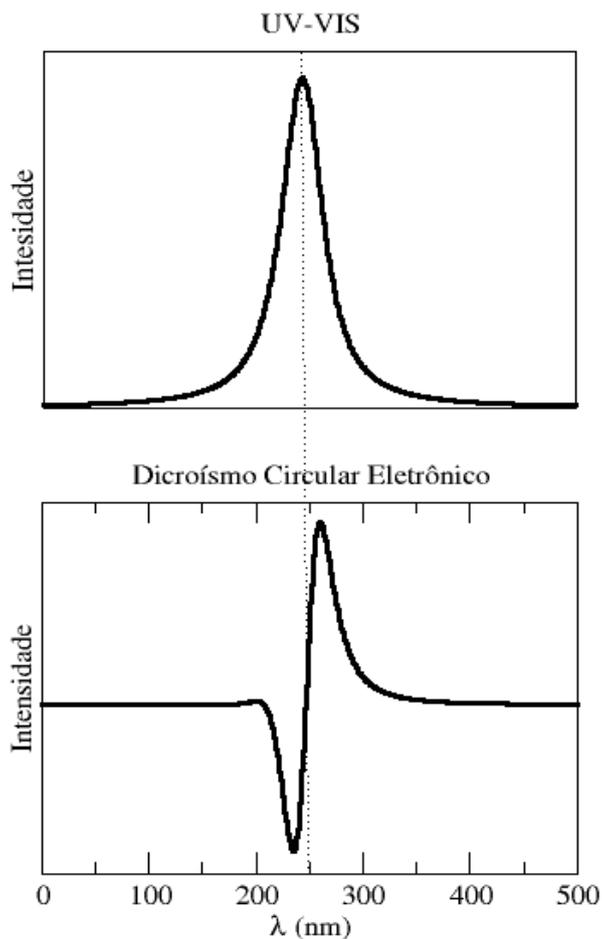


**Figura 3.** Estrutura molecular otimizada para o enolato mais estável da fenilbutazona (estrutura 468)

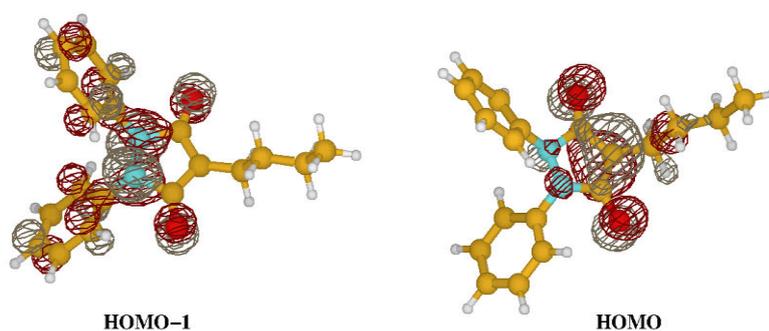
Na Fig. 4 estão os espectros eletrônicos de UV-Vis e de Dicroísmo Circular do enolato de fenilbutazona obtidos no nível CAM-B3LYP/6-311++G(d,p). Observa-se pela Fig. 4a que o máximo de absorção no UV-Vis encontra-se na região de 230 a 255 nm.

Pistolozzi e Bertucci<sup>8</sup> observaram que a fenilbutazona ligada ao sítio da albumina do soro humano (HSA) apresenta um máximo de absorção em torno de 290 nm. Valor este um pouco acima da forma desprotonada livre obtida neste trabalho. Assim estudos estão em andamento onde pretende-se modelar este tipo interação e usar informações de dicroísmo circular na definição da conformação absoluta da fenilbutazona complexada.

Foram calculados os 15 primeiros espectros eletrônicos nos estados singletos para a estrutura dada na Fig. 3, no entanto os valores das forças dos osciladores (em unidades atômicas) associados às 9 transições eletrônicas mais importantes (entre 230 e 255 nm) são: 0,0087; 0,0392; 0,1106; 0,0172; 0,2376; 0,3097; 0,0750; 0,0336 e 0,0637, respectivamente. E a partir das informações das participações dos orbitais moleculares que descrevem as transições eletrônicas, observa-se que predominantes elas ocorrem a partir dos orbitais HOMO-1 e HOMO, representados na Fig. 5. Estes orbitais são compostos majoritariamente pelas densidades eletrônicas sobre os anéis de 5 membros e/ou aromáticos.



**Figura 4.** Espectros eletrônicos a) UV-Vis e b) dicroísmo circular do enolato 468 da fenilbutazona



**Figura 5.** Principais orbitais moleculares da estrutura 468 responsáveis pelas transições eletrônicas observadas nos espectros UV-Vis e ECD, obtidas no nível TD-DFT/CAM-B3LYP/6-311++G(d,p) com solvente aquoso descrito por PCM

## 4. Conclusões

O modelo de cálculo apresentado neste manuscrito permitiu estabelecer um conjunto de conformações mais prováveis de ocorrer no equilíbrio ceto-enólico da fenilbutazona. Foram identificadas, no nível de teoria B3LYP/6-31G(d), 8 estruturas de enolato com distribuição populacional variando de 5 a 19%. A partir da definição destas conformações, obteve-se os espectros eletrônicos UV-Vis e de dicroísmo circular para o ânion da fenilbutazona na forma de seu enolato (presente em pH fisiológico) na estrutura com maior contribuição dada pela distribuição de Boltzmann (19,01%). Os cálculos destes espectros foram feitos no nível de teoria CAM-B3LYP/6-311++G(d,p) através do formalismo TD-DFT e incluindo efeito de solvente aquoso através do método PCM. Os máximos de absorção observados para a fenilbutazona isolada ocorreram entre 230 a 250 nm. Já os valores obtidos em espectros experimentais de dicroísmo circular induzido entre a fenilbutazona ligada a albumina do soro humano (HSA) são observados a aproximadamente 290 nm. Isto sugere uma distorção conformacional da forma isolada quando interagindo com sítios ativos em proteínas. Estudos para a identificação dos sítios ativos e da conformação absoluta do fármaco interagindo com HSA, estão em andamento.

## Agradecimentos

Agradecemos as facilidades computacionais do Instituto de Química da UNICAMP e do Grid/UNESP, ao apoio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo) e do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

## Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup> Bodansky, H. E.; *Advances in Clinical Chemistry*, number 16 in *Advances in Clinical Chemistry*; Elsevier Science & Technology Books, 1973.
- <sup>2</sup> Maciazek-Jurczyk, M. Phenylbutazone and ketoprofen binding to serum albumin. Fluorescence study. *Pharmacological Reports* **2014**, *66*, 727. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>3</sup> Kang, J.; Park, S.-J.; Park, H.-C.; Gedi, V.; So, B.; Lee, K.-J. Multiresidue Determination of Ten Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs in Bovine, Porcine, and Chicken Liver Tissues by HPLC-MS/MS. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2014**, *174*, 1. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>4</sup> Khanna, P. P.; Gladue, H. S.; Singh, M. K.; Fitzgerald, J. D.; Bae, S.; Prakash, S.; Kaldas, M.; Gogia, M.; Berrocal, V.; Townsend, W.; Terkeltaub, R.; Khanna, D. Treatment of acute gout: A systematic review. *Seminars in Arthritis & Rheumatism* **2014**, *44*, 31. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>5</sup> Kivett, L.; Taintor, J.; Wright, J. Evaluation of the safety of a combination of oral administration of phenylbutazone and firocoxib in horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **2014**, *37*, 413. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>6</sup> Maczka, P.; Komsta, L.; Skibinski, R.; Gumieniczek, A. Theoretical studies on keto-enol tautomerism, gas phase acidity and spectral properties of phenylbutazone. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska, Pharmacia, sectio DDD* **2010**, *23*, 3. [Link]
- <sup>7</sup> Sítio do Molecular Operating Environment. Disponível em: <[http://www.chemcomp.com/MOE-Molecular\\_Operating\\_Environment.htm](http://www.chemcomp.com/MOE-Molecular_Operating_Environment.htm)>. Acessado em: 1 novembro 2014.
- <sup>8</sup> Pistolozzi, M.; Bertucci, C. Species-dependent stereoselective drug binding to albumin: A circular dichroism study. *Chirality* **2008**, *20*, 552. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>9</sup> Sochacka, J.; Baran, W. The Investigation of the Binding of 6-Mercaptopurine to Site I on

Human Serum Albumin. *The Protein Journal* **2012**, *31*, 689. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

<sup>10</sup> Graciani, F. S.; Ximenes, V. F. Investigation of Human Albumin-Induced Circular Dichroism in Dansylglycine. *PloS One* **2013**, *8*, e76849. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

<sup>11</sup> Maciazek-Jurczyk, M.; Maliszewska, M.; Pozycka, J.; Rownicka-Zubik, J.; Gora, A.; Sulkowska, A. Tamoxifen and curcumin binding to serum albumin. Spectroscopic study. *Journal of Molecular Structure* **2013**, *1044*, 194. [[CrossRef](#)]

<sup>12</sup> Stephens, P. J.; Harada, N. ECD cotton effect approximated by the Gaussian curve and other methods. *Chirality* **2010**, *22*, 229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

<sup>13</sup> Morgon, N. H.; Souza, A. R. Interação entre o Dímero de Apocinina e Ciclodextrina. *Revista Virtual de Química* **2016**, *8*, 417. [[CrossRef](#)]

<sup>14</sup> Sítio da Gaussian, Inc. Disponível em: <<http://www.gaussian.com>>. Acessado em Novembro de 2014.