

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ
ESCUELA DE POSGRADO



PUCP

**CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL COMPLEJO DE FENBENDAZOL Y
 β -CICLODEXTRINA EN SOLUCIÓN ACUOSA**

Tesis para optar el grado de Magíster en Química que presenta

Q.F. FRANCO LUIGI CENTURIÓN RODRIGUEZ

Dirigido por:

Dr. MAYNARD JORGE KONG MORENO

JURADOS:

Dra. JUANA ROSA ROBLES CAYCHO

Dr. DESIDERIO VASQUEZ RODRIGUEZ

San Miguel, 2016

DEDICATORIA

A Dios, mi familia, amigos, colegas y Profesores por la orientación, fuerza, incentivo, compañerismo y amistad. Sin ellos nada esto hubiera sido posible.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme y darme la posibilidad de afrontar nuevos retos en mi carrera profesional, y agradecerle por brindarme una luz en los momentos de angustia y así poder vencer las dificultades.

A mi familia la cual amo mucho por estar siempre apoyándome constantemente, pues al ser joven aun, las experiencias de nuestros Padres (Magda Rodriguez) y abuelos (Rosa Olga Y Jacinto Espino) siempre serán de mucha ayuda, a mi hermano (Abel Centurión) y primo (Pool Escamilo) por darme un punto de vista siempre diferente y tecnológico, a mi Tío Milton, Tía Yassue y Esmeralda.

A mi asesor, el Prof. Maynard Kong por brindarme siempre la oportunidad para desarrollar mis ideas y con mucho criterio para corregirme, a mi co-asesor el Prof. Juan Davalos, quien apareció en el momento justo para poder apoyarme con los cálculos computacionales y por sus ideas siempre visionarias.

A mis colegas y compañeros becarios como Jose Monteza, Yenny Allcca, Nieves Flores, Glibver Vasquez, Betty Tevez, Pier Ruiz, Alexis Uechi por sus opiniones y críticas constructivas que permitieron enfocar el trabajo; además a mis colegas Farmacéuticos como Deivy Quiroz quien con su gentileza también colaboro con algunos análisis, y de manera especial para Edgar Vega quien además de colaborar con la tesis, entre tantas conversaciones surgió esta idea; así mismo a Oscar Díaz por su paciencia para poder crear en conjunto el módulo AMBERTOOLS en el servidor LEGION de la PUCP.

También es preciso agradecer al Estado Peruano que por medio de CONCYTEC nos dio la facilidad de contar con una beca para poder cursar esta Maestría, teniendo como responsabilidad ulterior aplicar nuestros conocimientos para dar un aporte a la investigación en nuestro país, así mismo a la facultad de Química de la PUCP por permitirnos integrarnos y a todo el apoyo que recibimos por parte de Profesores y amigos.

Es preciso mencionar un agradecimiento a Profesores de la Escuela de Química computacional y teórica de las Américas (Prefalc 2014-2015) como el Prof. Alain Fritsch, y amigos como Eugenio Furtado quien brindo una gran colaboración para los cálculos

computacionales; al mismo tiempo es importante mencionar mi travesía por la Universidad de Buenos Aires (UBA), por el cual tuve la fortuna de asistir al curso de Simulación Computacional Avanzada en Química, Bioquímica y ciencia de los Materiales, el cual fue brindado por el gobierno Argentino, esto permitió sin duda reforzar mis conocimientos sobre simulación y aprender nuevas técnicas para aplicar en mi tesis. Y claro la importantísima opinión de Profesores de este curso y al grupo CELFI (amigos y colegas del curso).



ABSTRACT

Here is reported a physical-chemical characterization of the complex formed between fenbendazole and β -cyclodextrin, in order to assess whether it is feasible to prepare a hydrosoluble pharmaceutical formula containing this complex. For such purpose, these complexes were prepared by co-precipitation in aqueous media, obtaining an increasing solubility of the pharmaceutical from 0.28 up to 2.5 $\mu\text{g/mL}$. Thereafter the complexes were characterized by UV-visible spectrophotometry, IR, DSC-TGA and computational calculations.

Fenbendazole became more soluble as the content of β -cyclodextrin was increased, as shown by B-type saturation observed in phase solubility diagrams. According to the Benesi-Hildebrand method, the association constants were calculated to be 10.9 M^{-1} and $1.78 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ for 1:1 and 1:2 stoichiometries respectively, without exhibiting a particular selectivity for any of these proposed stoichiometries. The decrease of fenbendazole signals by IR and DSC-TGA characterizations reveal evidence of the complex formation. In order to clarify the inclusion nature of fenbendazole in the formed complexes, quantum and molecular mechanic calculations were performed, showing that the thiobenzyl group is favoured energetically to interact with the first cyclodextrin molecule. These results were obtained by DFT-D3 and M05-2X functionals, and it is also proven that the 1:2 (FBZ:BCD) stoichiometry was favoured by quantum mechanics and the MM-PBSA method of molecular mechanics.

Keywords: β -cyclodextrin, fenbendazole, IR, DSC-TGA, UV/vis, computational calculations, DFT-D3, M05-2X, MM-PBSA

RESUMEN

El presente trabajo de Tesis tuvo como objetivo de estudio realizar una caracterización fisicoquímica del complejo de fenbendazol y β -ciclodextrina y poder examinar si sería factible realizar una formulación farmacéutica conteniendo un complejo fenbendazol- β -ciclodextrina hidrosoluble. Para tal fin se prepararon los complejos en medio acuoso por el método de coprecipitación obteniéndose un aumento de la solubilidad del fármaco desde 0,28 hasta 2,5 $\mu\text{g/mL}$, para después caracterizarlos por técnicas de espectrofotometría UV/Vis, IR, DSC-TGA y con cálculos computacionales.

Los resultados del presente estudio indicaron que el fenbendazol aumentaba su solubilidad conforme aumentaba la cantidad adicionada de β -ciclodextrina, esto se evidenció en el diagrama de solubilidad de fase del tipo B, el cual refleja que llegaba hasta un punto de saturación. La constante de asociación calculada por el método de Benesi-Hildebrand es de $10,9 \text{ M}^{-1}$ y $1,78 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ para una estequiometría 1:1 y 1:2, respectivamente, no mostrando una selectividad por alguna estequiometría propuesta. La caracterización por medio de IR, DSC-TGA evidencia la complejación del sistema al observar la desaparición de las señales de la molécula de fenbendazol. Con la intención de dilucidar la naturaleza de la inclusión se realizaron cálculos de mecánica cuántica y mecánica molecular, permitiendo entender el mecanismo de inclusión por el cual el grupo tiobencil del fenbendazol era favorecido energéticamente para interactuar con la primera ciclodextrina, estos cálculos fueron obtenidos con los funcionales DFT-D3 y M05-2X, a su vez se demostró que la relación estequiométrica 1:2 (fenbendazol: β -ciclodextrina) era favorecida por cálculos de mecánica cuántica y por el método MM-PBSA de mecánica molecular.

Palabras clave: β -ciclodextrina, fenbendazol, IR, DSC-TGA, UV/Vis, cálculos computacionales, DFT-D3, M05-2X, MM-PBSA

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	2
ABSTRACT.....	4
RESUMEN.....	5
ÍNDICE GENERAL.....	6
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
ÍNDICE DE TABLAS.....	12
ÍNDICE DE ECUACIONES.....	14
1. INTRODUCCIÓN.....	15
2. OBJETIVOS.....	21
a. OBJETIVO GENERAL.....	21
b. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3. MARCO TEÓRICO.....	22
3.1. FENBENDAZOL.....	22
3.2. CICLODEXTRINAS.....	23
3.3. COMPLEJOS DE INCLUSIÓN Y EQUILIBRIO ASOCIACIÓN-DISOCIACIÓN.....	28
3.4. ISOTERMA DE SOLUBILIDAD.....	30
3.5. COMPLEJOS DE INCLUSIÓN Y DE NO INCLUSIÓN.....	34
3.6. ECUACIÓN DE BENESI-HILDEBRAND.....	34
3.7. SIMULACIÓN COMPUTACIONAL.....	35
3.7.1. MÉTODOS COMPUTACIONALES.....	36
3.7.1.1. MÉTODOS SEMIEMPÍRICOS.....	38
3.7.1.1.1. MÉTODO DE PARISER-PARR-POPLE (PPP).....	38
3.7.1.1.2. MÉTODOS DEL DESPRECIO INTERMEDIO DEL SOLAPAMIENTO DIFERENCIAL (INDO) Y DESPRECIO COMPLETO DEL SOLAPAMIENTO DIFERENCIAL (CNDO).....	39

3.7.1.1.3. MÉTODO DEL MODELO 1 DE AUSTIN (AM1)	39
3.7.1.1.4. MÉTODO PARAMETRIZADO 3 (PM3)	39
3.7.1.1.5. MÉTODO PARAMETRIZADO 6 (PM6)	40
3.7.1.2. TEORÍA DEL FUNCIONAL DE DENSIDAD (DFT)	40
3.7.1.3. DINÁMICA MOLECULAR.....	43
4. METODOLOGÍA	52
4.1. PREPARACIÓN DEL COMPLEJO DE FENBENDAZOL: β -CICLODEXTRINA EN MEDIO ÁCIDO POR EL MÉTODO DE COPRECIPITACIÓN.	52
4.2. PREPARACIÓN DEL COMPLEJO DE FENBENDAZOL: β -CICLODEXTRINA EN MEDIO NEUTRO POR EL MÉTODO DE COPRECIPITACIÓN.....	52
4.3. PREPARACIÓN DE UNA MEZCLA FÍSICA DE FENBENDAZOL: β - CICLODEXTRINA	53
4.4. CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO FENBENDAZOL: β -CICLODEXTRINA EN SOLUCIÓN POR MEDIO DE LA ESPECTROSCOPIA DE UV/VIS	53
4.4.1. DIAGRAMA DE SOLUBILIDAD DEL COMPLEJO FENBENDAZOL: β - CICLODEXTRINA SEGÚN EL MODELO DE HIGUCHI-CONNORS.....	53
4.4.2. DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE ASOCIACIÓN DEL COMPLEJO	54
4.5. CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJA.....	55
4.6. CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO POR CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO.....	55
4.7. ESTUDIO TEÓRICO DEL COMPLEJO DE FENBENDAZOL: β - CICLODEXTRINA POR MÉTODOS CUÁNTICOS	56
4.8. ESTUDIO TEÓRICO DEL COMPLEJO DE FENBENDAZOL: β - CICLODEXTRINA A TRAVÉS DE CÁLCULOS DE MECÁNICA MOLECULAR	56
5. PLAN DE ANÁLISIS DE DATOS	58
5.1. DETERMINACIÓN DE LA ESTEQUIOMETRÍA Y LA CONSTANTE DE ASOCIACIÓN DEL COMPLEJO DE INCLUSIÓN	58

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
6.1. DIAGRAMA DE SOLUBILIDAD DE FASE	60
6.2. DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE ASOCIACIÓN POR EL MÉTODO DE BENESI-HILDEBRAND	63
6.3. SÍNTESIS DE LOS COMPLEJOS EN MEDIO ACUOSO.....	65
6.4. ESPECTROSCOPÍA FT-IR DE LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS	66
6.5. ANÁLISIS POR CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO Y POR TERMOGRAVIMETRÍA.....	70
6.6. CÁLCULOS DE MECÁNICA CUÁNTICA	75
6.7. CÁLCULOS DE MECÁNICA MOLECULAR.....	81
6.7.1. ESTABILIDAD DEL SISTEMA	83
6.7.2. ENERGÍA LIBRE DE UNIÓN DEL COMPLEJO FENBENDAZOL: β -CICLODEXTRINA	85
7. CONCLUSIONES	88
8. RECOMENDACIONES.....	89
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
10. ANEXOS.....	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: (a) Estructura química del fenbendazol (parte izquierda) y (b) estructura química de albendazol (parte derecha).....	16
Figura 2: Representación esquemática de los hidrógenos H ₂ , H ₃ , H ₄ , H ₅ y H ₆ de la β -ciclodextrina	18
Figura 3: Estructuras químicas de las moléculas de la α -ciclodextrina, β -ciclodextrina y γ -ciclodextrina. Adaptada de Miranda, J. C. de, Martins, T. E. A., Veiga, F., & Ferraz, H. G. (2011).....	25
Figura 4: Sitios de modificaciones frecuentes en la β -CD (VEIGA et al, 2006). Adaptada de Silva Arrais, M. (2012).....	27
Figura 5: Ilustración esquemática de la asociación de la ciclodextrina libre (hospedero) con el ligando (huésped) para formar un complejo de inclusión. Adaptada de Crini, G (2014).	29
Figura 6: Diagrama de solubilidad de fases que muestra el comportamiento de un complejo soluble (A), o un complejo menos o poco soluble (B). Higuchi y Connors (1965) Adaptada de Loftsson(2007).....	31
Figura 7: Modelos de simulación para un sistema de un determinado tamaño y escala de tiempo. Roca Sabio, A (2013).....	37
Figura 8: Condiciones periódicas de contorno. La célula central es replicada en ambas direcciones. Adaptada de Zhiju Zheng (2010).	46
Figura 9: Sistema de átomos interaccionantes que muestra un potencial cutoff. Adaptada de Zhiju Zheng (2010).....	47
Figura 10: Ilustración del problema de calcular $\Delta G_{unión}$. Ross Walker (2006) Adaptado de Hermansson, A. (2015).....	49
Figura 11: Ciclo termodinámico utilizado en cálculos de MM/PBSA y MM/GBSA. Ross Walker (2006). Adaptado de Hermansson, A. (2015)	49
Figura 12: Espectrofotómetro UV/Vis 8453 de Agilent.	54
Figura 13: Espectrofotómetro FT/NIR de Perkin-Elmer	55
Figura 14: Calorímetro diferencial de barrido NETZSCH STA 449 F3 Jupiter.	55
Figura 15: Sistema de coordenadas que describe el proceso de inclusión de la β -ciclodextrina y fenbendazol.	57
Figura 16: Diagrama de solubilidad del fenbendazol en presencia de β -ciclodextrina.....	60

Figura 17: Espectro UV/Vis del complejo fenbendazol y β -ciclodextrina a concentración de 0 mM a 12 mM de β -ciclodextrina.....62

Figura 18: Comportamiento del fenbendazol a distintas concentraciones de β -ciclodextrina63

Figura 19: Método de Benesi-Hildebrand para una estequiometría 1:1 del complejo fenbendazol y β -ciclodextrina.....64

Figura 20: Método de Benesi-Hildebrand para una estequiometría 1:2 del complejo fenbendazol y β -ciclodextrina.....65

Figura 21: Espectro FT-IR de (a) β -ciclodextrina,(b) fenbendazol y (c) mezcla binaria.....66

Figura 22: Espectro FT-IR de (a) β -ciclodextrina, (b) fenbendazol, (d) complejo fenbendazol: β -ciclodextrina en relación molar 1:1 en agua.....68

Figura 23: El espectro FT-IR de (d) complejo fenbendazol: β -ciclodextrina en relación molar 1:1 en agua, (e) complejo fenbendazol: β -ciclodextrina en relación molar 1:2 en agua, (f) complejo fenbendazol: β -ciclodextrina en relación molar 1:10 en agua.68

Figura 24: El espectro FT-IR de (g) complejo fenbendazol: β -ciclodextrina en relación molar 1:2 en HCl/etanol (1 %), (h) complejo fenbendazol: β -ciclodextrina en relación molar 1:10 en HCl/etanol (1 %).69

Figura 25: Espectro DSC-TGA de (a) β -ciclodextrina.71

Figura 26: Espectro DSC-TGA de (b) fenbendazol71

Figura 27: Espectro DSC-TGA de (c) Mezcla binaria72

Figura 28: Espectro DSC-TGA de (d) Complejo fenbendazol: β -ciclodextrina (1:1) en agua73

Figura 29: Espectro DSC-TGA de (d) Complejo fenbendazol: β -ciclodextrina en relación molar 1:2 en agua.....74

Figura 30: Espectro DSC-TGA de (a) β -ciclodextrina, (b) fenbendazol, (c) mezcla binaria (d) complejo fenbendazol: β -ciclodextrina en relación molar 1:1 en agua.....74

Figura 31: Energías de complejación de fenbendazol: β -ciclodextrina (1:1) a diferentes posiciones en el eje Z (coordenada de reacción) para la orientación A a un nivel del PM6.....75

Figura 32: Energías de complejación de fenbendazol: β -ciclodextrina (1:1) a diferentes posiciones en el eje Z (coordenada de reacción) para la orientación B a un nivel de PM6.....76

<i>Figura 33: Energías de complejación de fenbendazol:β-ciclodextrina (1:1) a diferentes posiciones en el eje Z (coordenada de reacción) para la orientación A a un nivel de B3LYP/6-31G.....</i>	<i>77</i>
<i>Figura 34: Energías de Complejacion de fenbendazol:β-ciclodextrina (1:1) a diferentes posiciones en el eje Z (coordenada de reacción) para la orientación B a un nivel de B3LYP/6-31G.....</i>	<i>77</i>
<i>Figura 35: Estructura de los complejos fenbendazol:β-ciclodextrina (1:1) optimizados con el nivel B3LYP/6-31G para la orientación A (parte superior) y orientación B (parte inferior). Vista frontal (parte izquierda) y vista lateral (parte derecha).</i>	<i>79</i>
<i>Figura 36: Estructuras del complejo fenbendazol:β-ciclodextrina (1:1) obtenidos para alcanzar la orientación A desde los 0ns hasta los 10 ns</i>	<i>82</i>
<i>Figura 37: Gráfica de RMSD para el complejo fenbendazol:β-ciclodextrina, el ligando fenbendazol, la ciclodextrina para la orientación A y C.....</i>	<i>84</i>
<i>Figura 38: Estructura del complejo fenbendazol:β-ciclodextrina (1:1) de más baja energía en medio acuoso obtenidos en 10 ns de simulación</i>	<i>85</i>
<i>Figura 39: Representación esquemática de la interacción del fenbendazol y β-ciclodextrina de más baja energía en medio acuoso en 11 ns de simulación</i>	<i>86</i>
<i>Figura 40: Estructura del complejo fenbendazol:β-ciclodextrina (1:2) de la orientación C.</i>	<i>86</i>

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1: Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS) con características de fármacos (Adaptada de Khadka, P., Ro, J., Kim, H., Kim, I., et al. (2014)).....</i>	<i>16</i>
<i>Tabla 2: Productos farmacéuticos que contienen β-CD en el mercado global (Adaptado de Miranda, J. C. de, Martins, T. E. A., Veiga, F., & Ferraz, H. G. (2011)).....</i>	<i>24</i>
<i>Tabla 3: Propiedades de las ciclodextrinas naturales (Szejtli,1994;Veiga et al.,2006; Brewster, Loftsson, 2007;Wintgens y Amiel, 2010). Adaptado de Jullian Matthaei.C (2007)</i>	<i>26</i>
<i>Tabla 4: Concentración obtenida de fenbendazol en los complejos sintetizados.....</i>	<i>66</i>
<i>Tabla 5: Distribución de frecuencias características de β-ciclodextrina y los complejos sintetizados.</i>	<i>70</i>
<i>Tabla 6: Confórmeros de menor energía a diferentes niveles de teoría sin restricción alguna para las orientaciones A y B</i>	<i>78</i>
<i>Tabla 7: Energías de complejación a distintos niveles de teoría para el complejo fenbendazol:β-ciclodextrina (1:1) en medio gaseoso.....</i>	<i>80</i>
<i>Tabla 8: Energías de complejación a distintos niveles de teoría para el complejo β-ciclodextrina:fenbendazol (1:1) en medio acuoso.....</i>	<i>80</i>
<i>Tabla 9: Energías libre de unión (kcal/mol) con la aproximación de MM-PBSA del sistema de fenbendazol:β-ciclodextrina</i>	<i>87</i>
<i>Tabla 10: Optimización de energía y cálculos singlepoint de las moléculas de partida en el vacío.....</i>	<i>96</i>
<i>Tabla 11: Optimización de energía de los confórmeros generados para la orientación A con el semiempírico PM6 en el vacío.....</i>	<i>97</i>
<i>Tabla 12: Optimización de energía de los confórmeros generados para la orientación B con el semiempírico PM6 en el vacío.....</i>	<i>98</i>
<i>Tabla 13: Optimización de energía de los confórmeros generados para la orientación A con el funcional B3lyp/6-31G en el vacío.....</i>	<i>99</i>
<i>Tabla 14: Optimización de energía de los confórmeros generados para la orientación B con el funcional B3lyp/6-31G en el vacío.....</i>	<i>100</i>
<i>Tabla 15: Cálculo de energía del tipo singlepoint de los confórmeros generados para la orientación A con los funcionales de Grimme y de Truhlar en el vacío.....</i>	<i>101</i>

Tabla 16: Cálculo de energía del tipo singlepoint de los confórmers generados para la orientación B con los funcionales de Grimme y de Truhlar en el vacío.....101



ÍNDICE DE ECUACIONES

<i>Ecuación 1: Solubilidad aparente para una relación estequiométrica 1:1 (hospedero:huésped)</i>	32
<i>Ecuación 2: Pendiente del diagrama de solubilidad para una relación estequiométrica 1:1 (hospedero:huésped)</i>	33
<i>Ecuación 3: Pendiente del diagrama de solubilidad para una relación estequiométrica 2:1 (huésped:hospedero)</i>	33
<i>Ecuación 4: Modelo de ajuste para una relación estequiométrica 1:2 (huésped:hospedero) para el diagrama de solubilidad</i>	33
<i>Ecuación 5: Constante de formación del complejo 1:1 (hospedero:huésped)</i>	34
<i>Ecuación 6: Modelo de Benesi-Hildebrand para la relación estequiométrica 1:1 (hospedero:huésped)</i>	35
<i>Ecuación 7: Modelo de Benesi-Hildebrand para la relación estequiométrica 2:1 (hospedero:huésped)</i>	35
<i>Ecuación 8: Ecuación simplificada de Schrödinger</i>	37
<i>Ecuación 9: Ecuación de la energía de valencia molecular para el método PM3</i>	39
<i>Ecuación 10: Ecuación de Kohn y Sham</i>	41
<i>Ecuación 11: Promedio termodinámico de una magnitud dinámica arbitraria A</i>	44
<i>Ecuación 12: Ecuación del campo de fuerza para el programa AMBER 14</i>	45
<i>Ecuación 13: Contribución electrostática según el modelo generalizado de Born</i>	50
<i>Ecuación 14: Ecuación de Poisson- Boltzmann</i>	50
<i>Ecuación 15: Contribución electrostática según el modelo de Poisson- Boltzmann</i>	51
<i>Ecuación 16: Determinación de la constante de asociación para el modelo estequiométrico 1:1 y 1:2 según Benesi-Hildebrand</i>	59
<i>Ecuación 17: Relación molar para fenbendazol:β-ciclodextrina con la eficiencia de complejación</i>	62

1. INTRODUCCIÓN

La biodisponibilidad es un término farmacocinético que describe la velocidad y el grado con que una sustancia activa es absorbida a partir de un medicamento y se vuelve disponible en su lugar de acción. Parámetros como la solubilidad, velocidad de disolución, permeabilidad gastrointestinal y el metabolismo del primer paso ejercen un control sobre la biodisponibilidad de los medicamentos. La solubilidad de los medicamentos en agua es una propiedad que juega un rol fundamental en la absorción del principio activo después de la administración oral y se considera una medida de equilibrio. Además, la velocidad con la que el principio activo pasa de estado sólido a una solución es críticamente importante cuando el tiempo de disolución es limitado, tal es el caso de los medicamentos de liberación controlada [1].

En la última década los cálculos computacionales y el modelaje molecular están siendo usados por la química y uno de los métodos más adecuado para aumentar la potencia del fármaco *in vitro* es la adición de grupos lipofílicos a determinada posición de la estructura molecular. Esto ha causado un aumento significativo del número de moléculas de carácter lipófilo, poco solubles. De esta forma el número de candidatos de principios activos insolubles en agua se ha incrementado [2].

El sistema de clasificación biofarmacéutica (BSC) clasifica los medicamentos basados en su solubilidad acuosa y permeabilidad intestinal, además correlaciona la disolución *in vitro* y la biodisponibilidad *in vivo*; esta clasificación abarca cuatro grupos, basados en su habilidad de atravesar las membranas biológicas y su solubilidad acuosa. Entre estas categorías se tiene la categoría (I) los fármacos que poseen alta solubilidad y alta permeabilidad, categoría (II) los que poseen baja solubilidad y alta permeabilidad, categoría (III), alta solubilidad y baja permeabilidad y categoría (IV) con baja solubilidad y baja permeabilidad (Tabla 1) [2].

De los diversos compuestos que pertenecen a la clase II, se encuentran los fármacos del tipo benzimidazol, los cuales han probado tener un amplio espectro de eficacia frente a parásitos tisulares e intestinales y son ampliamente usados para el control de estos en el ganado bovino, equino y otros mamíferos.

Tabla 1: Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS) con características de fármacos (Adaptada de Khadka, P., Ro, J., Kim, H., Kim, I., et al. (2014))

Clase BCS	Solubilidad	Permeabilidad	Absorción	Ejemplos
I	Alta	Alta	Bien absorbido	Metoprolol, Diltiazem, Propranolol
II	Baja	Alta	Bien absorbido	Fenitoina, Nifedipino, Danazol
III	Alta	Baja	Variable	Cimetidina, Aciclovir, Captopril
IV	Baja	Baja	Pobrementemente absorbido	Hidroclorotiazida, Taxol, Furosemida

Entre los representantes de los benzimidazoles se tiene al fenbendazol y albendazol (Figura 1a y Figura 1b) debido a su particular largo tiempo de vida media *in vivo*. Estos son generalmente pobremente solubles en agua y son administrados oralmente en suspensión, pasta, polvo o en un bolo intraluminal. De esta manera, el 2-aminobenzimidazol-1-carbamato tiene baja solubilidad probablemente debido a la presencia de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el grupo NH del benzimidazol y el carbonilo del carbamato. Esta característica ha sido hasta ahora el mayor obstáculo para el desarrollo de aplicaciones más convenientes como para ser administradas con agua de beber [4].

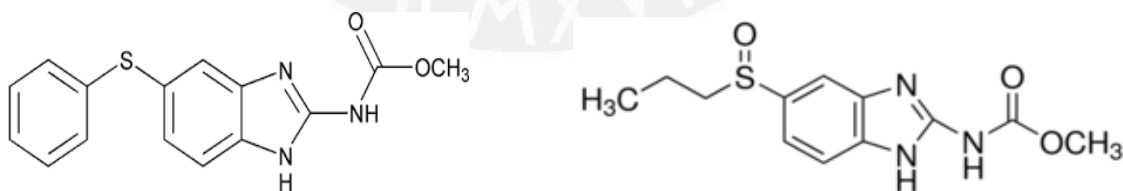


Figura 1: (a) Estructura química del fenbendazol (parte izquierda) y (b) estructura química de albendazol (parte derecha).

El problema para los benzimidazoles en general y para el fenbendazol en particular, es su baja solubilidad y por lo tanto, su absorción limitada, lo que, unido a su metabolismo rápido, hace que se use frecuentemente en dosis elevadas para mejorar su efectividad. Sería idóneo que las nuevas formulaciones lleguen a mejorar estos factores limitantes [4].

El desarrollo de nuevas formulaciones de medicamentos para su uso en medicina humana y veterinaria, requiere de un enfoque multidisciplinar. Con el uso de la tecnología farmacéutica, se puede mejorar la actividad farmacológica y/o farmacocinética. Entre las herramientas de las formulaciones de fármacos, se tiene el uso cada vez más frecuente de excipientes químicamente modificados para mejorar características como solubilidad, desintegración, aglutinación, compresibilidad y uso de la química computacional como una herramienta más para la predicción de sus propiedades [4].

Con el fin de diseñar sistemas de administración de fármacos, se han desarrollado varios tipos de materiales transportadores para llevar la cantidad necesaria de principio activo hacia el sitio de acción, con gran eficiencia y precisión.

Las ciclodextrinas son potenciales candidatos para esta función por su habilidad de alterar las características fisicoquímicas y propiedades biológicas de la molécula huésped a través de la formación de los complejos de inclusión en estado sólido y solución. La alfa, beta y gama ciclodextrinas son las formas más comunes de ciclodextrinas naturales, consistiendo en seis, siete y ocho residuos de glucosa, respectivamente, unidos a través de enlaces glucosídicos α -1,4, formando un compuesto macrocíclico. Cada ciclodextrina tiene sus propiedades y una capacidad de formar complejos de inclusión hospedero-huésped con moléculas “huésped” específicas, esta habilidad depende de su compatibilidad con la cavidad hidrofóbica de la ciclodextrina [5][6].

El conocimiento de cómo es que la molécula de ciclodextrina se acompleja con su huésped es la clave de la formación del complejo. Así algunos estudios se orientan a conocer las interacciones responsables de la estabilidad de este complejo. Estudios sobre el mecanismo de inclusión entre ciclodextrinas y fármacos esteroideos fueron realizados a través de simulaciones de dinámica molecular, se encontró una buena correlación entre estos y sugiriendo que las fuerzas intermoleculares que priman son las de tipo de van der Waals y las interacciones hidrófobas [7].

Debido a la capacidad de las ciclodextrinas para formar complejos de inclusión, su naturaleza apolar dentro de su cavidad y su naturaleza polar fuera de ella, es posible que moléculas insolubles en agua puedan llegar a ser completamente solubles mediante un tratamiento con disoluciones acuosas de ciclodextrina, sin que se produzca modificación química alguna en la molécula huésped, ya que no se origina ningún enlace covalente durante la interacción entre la ciclodextrina y la molécula insoluble en agua [8].

Varias hipótesis han sido propuestas para la formación de complejos de ciclodextrinas y su estabilización, así como también la liberación de agua del interior de la cavidad, la liberación de la tensión del anillo, interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, fuerzas de inducción, fuerzas de dispersión de London y los factores estéricos. Sin embargo, el mecanismo por el cual suceden todas estas contribuciones relativas no son aun bien conocido [8].

De hecho, aunque las constantes de estabilidad han sido medidas para ciertos complejos de ciclodextrinas, en la actualidad todavía resulta difícil predecir “a priori” la estabilidad real de un posible complejo entre una ciclodextrina dada y una molécula de fármaco en un disolvente dado y después establecer si esta complejación podría ser realmente factible [9].

Diversos estudios han sido realizados para caracterizar complejos de inclusión entre fármacos y ciclodextrinas. La β -ciclodextrina es la más utilizada debido al bajo costo y al tamaño de su cavidad apropiado para acomodar una gran variedad de fármacos. Las técnicas experimentales más utilizadas han sido las técnicas de análisis térmico, calorimetría exploratoria diferencial, espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), las espectroscopias en el ultravioleta-visible y en el infrarrojo [1][11].

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica que evidencia mejor la formación del complejo de inclusión. De acuerdo a la literatura, las alteraciones ocurren principalmente en los H_3 y H_5 , incluso en el H_6 (Figura 2), dependiendo de la profundidad con la que la molécula huésped entra en la cavidad de la ciclodextrina. Esta técnica fortalece las informaciones de la topología de interacción entre la molécula huésped y la ciclodextrina y también sobre la estequiometría y la constante de asociación del complejo [1][11].

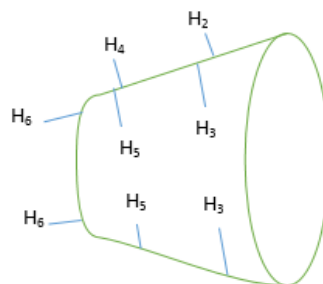


Figura 2: Representación esquemática de los hidrógenos H_2 , H_3 , H_4 , H_5 y H_6 de la β -ciclodextrina

Estudios como los del fármaco dapsona y de las ciclodextrinas sugieren que la caracterización en estado sólido y en solución son herramientas importantes para entender el mecanismo de inclusión de estos complejos. Estos permitieron verificar la formación de este. Así mismo, en otros estudios de Guilherme Lionello sobre una caracterización fisicoquímica del complejo de inclusión de tiabendazol: β -ciclodextrina, se comparó sus estudios experimentales y teóricos encontrando una correlación entre resultados, destacando en este estudio el uso de cálculos computacionales como el uso de la teoría del funcional de densidad (DFT) para su aproximación teórica y también el uso de modelos semiempíricos [1][10].

Numerosas técnicas han sido desarrolladas para la preparación y caracterización de los complejos de inclusión con ciclodextrinas. Según Sharma, entre los métodos de preparación se tiene los métodos de coprecipitación, *kneading*, *grinding*, neutralización y liofilización. Muchas de ellas demuestran ser adecuadas dependiendo de las características fisicoquímicas de las moléculas huésped. Así mismo en su caracterización se emplean técnicas de espectroscopía infrarroja (IR), espectrofotometría UV/Vis, espectrometría de RMN (Resonancia Magnética Nuclear), difracción de rayos X, espectrometría de masas, dicroísmo circular y espectroscopía de fluorescencia. Algunos de estas técnicas evidencian la formación del complejo, pero otras tienen varias limitaciones en el rango de aplicaciones. De esta forma, métodos de modelización molecular han sido propuestos recientemente como herramientas poderosas para obtener información acerca de las estructuras tridimensionales y las energías de interacción de la inclusión de complejos [9][11].

Un estudio sobre formación de complejos de inclusión de ciclodextrinas y el fármaco meloxicam, en el uso de cálculos de la teoría de la densidad del funcional (DFT) a través de la aplicación del funcional B3LYP/6-31G, permitió la obtención de geometrías más confiables entre los demás métodos semiempíricos y también las interacciones de energía pueden ser obtenidas con alta precisión. Sin embargo, los cálculos fueron desarrollados en moléculas en fase gas, despreciando las posibles interacciones que son dadas por la solvatación en el sistema de inclusión [6] [12].

Otro método computacional desarrollado para estudiar las interacciones moleculares entre el complejo de inclusión de β -ciclodextrina y agentes antiulcerantes fue de mecánica

molecular, con el cuál la molécula de cloranbucil es estabilizada en gran medida sobre la cavidad de la ciclodextrina. La estabilización entálpica se debió a la formación de enlaces de hidrógeno e interacciones van der Waals con un ajuste favorable. Este proceso de inclusión fue impulsado por la entalpía [13].

Sin embargo, un problema fundamental en la formación de los complejos de inclusión huésped-hospedero entre las ciclodextrinas es su estabilidad y estequiometría. Investigaciones demuestran que el complejo de inclusión entre β -ciclodextrina y valsartan solo es viable en relación 1:1 y se verificó que es inviable en relación 2:1. Este estudio fue realizado a través de dinámica molecular y métodos semiempíricos [14].

El presente trabajo busca contribuir a la solución de la problemática de la poca solubilidad de los fármacos de tipo benzimidazol, al caracterizar el complejo de inclusión entre fenbendazol y β -ciclodextrina en solución, con el uso de herramientas como la espectroscopía de absorción UV/Vis, espectrometría de RMN, calorimetría diferencial de barrido (DSC), espectroscopía IR y cálculos computacionales.

La β -ciclodextrina es un potencial candidato para poder formar un complejo con el fenbendazol, potenciando de esta manera la solubilidad del fármaco de partida. Esto podría significar el desarrollo de nuevos tipos de formulaciones en el sector farmacéutico. No obstante, la mejora de la solubilidad también tiene que acompañar a la estabilidad del complejo formado, siendo necesario hacer una caracterización de estos.

2. OBJETIVOS

a. OBJETIVO GENERAL

Realizar una caracterización fisicoquímica del complejo formado entre fenbendazol y β -ciclodextrina en solución acuosa.

b. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar el complejo de fenbendazol y β -ciclodextrina
- Caracterizar el complejo en solución por espectrofotometría de absorción ultravioleta.
- Caracterizar el complejo en estado sólido a través de técnicas de calorimetría diferencia de barrido (DSC) y espectroscopía infrarroja.
- Aplicar cálculos teóricos para determinar las energías asociadas a su formación en estado gaseoso y acuoso. Se usarán cálculos semiempíricos (PM6), de la teoría del funcional de densidad (DFT) y de dinámica molecular.

A continuación, se detallan las propiedades de las ciclodextrinas y del fenbendazol, se describe su química y en particular de los complejos de inclusión. También se hace indicación de cuál es el interés práctico del estudio de sus interacciones con las ciclodextrinas.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. FENBENDAZOL

El fenbendazol, metil-5-(feniltio) benzimidazol-2-carbamato, es un fármaco de uso veterinario derivado del benzimidazol, con propiedades antihelmínticas, antifúngicas y bactericidas. Su principal aplicación es en la quimioterapia de parásitos de canes. El fenbendazol tiene amplio espectro de acción que incluye prevención de transmisión transplacentaria de *T.canis*, tratamiento de la giardiasis y fases parasitarias de huevos, larvas y adultos de otros parásitos [15][16].

El mecanismo de acción es debido a la unión del fármaco a la tubulina dimérica del nemátodo para prevenir la polimerización de la tubulina durante el ensamblamiento de los microtúbulos. Los microtúbulos son esenciales en la mitosis y metabolismo energético. Estos benzimidazoles son más efectivos en contra de células con división activa que están presentes en los huevos del nemátodo y las larvas. El parásito morirá por interferencia con su habilidad para metabolizar energía [15][16].

El fenbendazol se administra vía oral a razón de 50 mg/kg cada 24 horas durante 3 días consecutivos contra la giardiasis. Pero para otro tipo de parásitos, una sola dosis suele ser altamente eficaz. El fenbendazol ofrece el margen de seguridad más amplio y la mejor eficacia de todos los benzimidazoles. No obstante, una de sus desventajas es que se absorbe por el tracto gastrointestinal en pequeña proporción, alcanzando niveles plasmáticos en 2 a 4 horas no mayores del 1 % de la dosis administrada [15][16].

En cuanto a la fotoestabilidad, estudios de Soto et al. sobre fenbendazol evidenciaron fotosensibilidad en presencia de luz directa, más no en luz indirecta y oscuridad. Se evidenció por FT-IR que las señales características del grupo amida desaparecieron, indicando un rompimiento del enlace del grupo amida por la exposición a la luz en el tiempo. Estos cambios se observaron en un medio ácido [17].

Un factor limitante para la eficiencia de este fármaco es su baja solubilidad en agua, reportada en la literatura de menor a 1 mg/L según la ficha de datos del Directorio Europeo para la Calidad de Medicinas y Cuidado de la Salud (EDQM). De esta manera el uso de excipientes que ayuden a mejorar esta propiedad puede ser considerada una alternativa para mejorar su biodisponibilidad.

3.2. CICLODEXTRINAS

Las ciclodextrinas son una familia de oligosacáridos cíclicos derivados del almidón que contienen unidades de (α -1,4)-D-glucopiranososa y poseen una superficie externa hidrofílica y una cavidad lipofílica central, y actualmente han recibido gran atención en el campo farmacéutico debido a la capacidad de formar complejos de inclusión con muchos fármacos lipofílicos.

Las ciclodextrinas tienen larga aplicación a través de la historia. Estas fueron descubiertas por Villiers en 1891, sin embargo, ellas no llegaron a utilizarse hasta que French y sus colaboradores modificaron el proceso químico para su producción en 1950. Las ciclodextrinas son obtenidas de la digestión del almidón por una enzima llamada glucosiltransferasa. Pero la disponibilidad de las ciclodextrinas y su alto costo de producción limitaron las investigaciones y aplicaciones hasta 1970. Con el avance de la biotecnología, esto cambió rotundamente llegándose a producir ciclodextrinas con alto grado de pureza y a un bajo costo [3].

De acuerdo con Yang, H. (2008), más de 30 diferentes productos farmacéuticos contienen ciclodextrinas y son vendidos alrededor del mundo (Tabla 2) [3].

La familia de ciclodextrinas comprende una serie de oligosacáridos cíclicos, y varios miembros de esta familia son usados en la industria farmacéutica, química y aplicaciones en la ciencia de los alimentos. Las ciclodextrinas son generalmente cristalinas, solubles en agua, cíclicas, homogéneas, no reductoras. Los tres tipos de ciclodextrina más conocidas son la α -ciclodextrina, β -ciclodextrina y γ -ciclodextrina, las cuales poseen respectivamente 6, 7 y 8 monómeros de glucosa (Figura 3).

La estructura molecular de las ciclodextrinas fue definida mediante estudios cristalográficos por la técnica de difracción de rayos X, estas presentan una forma toroidal o cónica debido a la ausencia de libre rotación de las ligaciones glicosídicos y de la conformación de cada unidad de glucosa. En su estructura presenta dos grupos hidroxílicos: los secundarios, que se encuentran localizados en el borde más amplio, están ligados a los átomos de carbono C_2 y C_3 , mientras que los primarios se encuentran ubicados en el borde más estrecho y ligado a los carbonos C_6 (Figura 3). Esta característica es debido a la libre rotación de los grupos hidroxílicos primarios, que reducen el diámetro efectivo de la cavidad. En cuanto a los grupos hidroxilos secundarios,

estos constituyen una cadena relativamente rígida. Por eso esta cavidad de las ciclodextrinas es más larga según Bekers et al. [26].

Tabla 2: Productos farmacéuticos que contienen β -CD en el mercado global (Adaptado de Miranda, J. C. de, Martins, T. E. A., Veiga, F., & Ferraz, H. G. (2011))

Nombre de Marca	Fármaco/ciclodextrinas	Formulación	Compañía
Prostarmon E	PGE2/ β CD	Tableta sublingual	Ono (Japón)
Caverject Dual	Alprostadil/ α CD	Solución i.v	Pfizer (USA)
Aerodiol	17- β -Estradiol /M β CD	Spray Nasal	Servier (Francia)
Cetirizina	Cetirizina/ β CD	Tableta masticable	Losan Pharma (Suiza),UCB Pharma (USA)
Fluner	Flunarizina/ β CD	Tableta	Geno Pharmaceutical
Vitaseptol	Tiomersal/ β CD	Solución oftálmica	Europhta (Mónaco)
Mobitil	Meloxicam/ β CD	Tableta supositorio	Medical Union Pharmaceuticals (Egipto)
Abilify	Aripiprazol /sulfobutil- β CD	Solución inyección muscular	Bristol-Myers Squibb (USA), Otsuka Pharm. (Japón, USA)
Cerenia	Maropitant/sulfobutil- β CD	Solución parenteral	Pfizer Animal Health (USA)
Dexocort	Hidrocortisona/HP β CD	Solución	Actavis (UE)
Nicorette	Nicotina/ β CD	Tableta sublingual	Pfizer (USA)
Vfend	Voriconazol/Sulfobutil eter- β CD	Solución i.v	Pfizer (USA)
MitoExtra	Mitomicina /HP β CD	Solución i.v	Novartis (Suiza)
Voltaren	Diclofenaco sódico /HP β CD	Solución oftálmica	Novartis (Suiza)

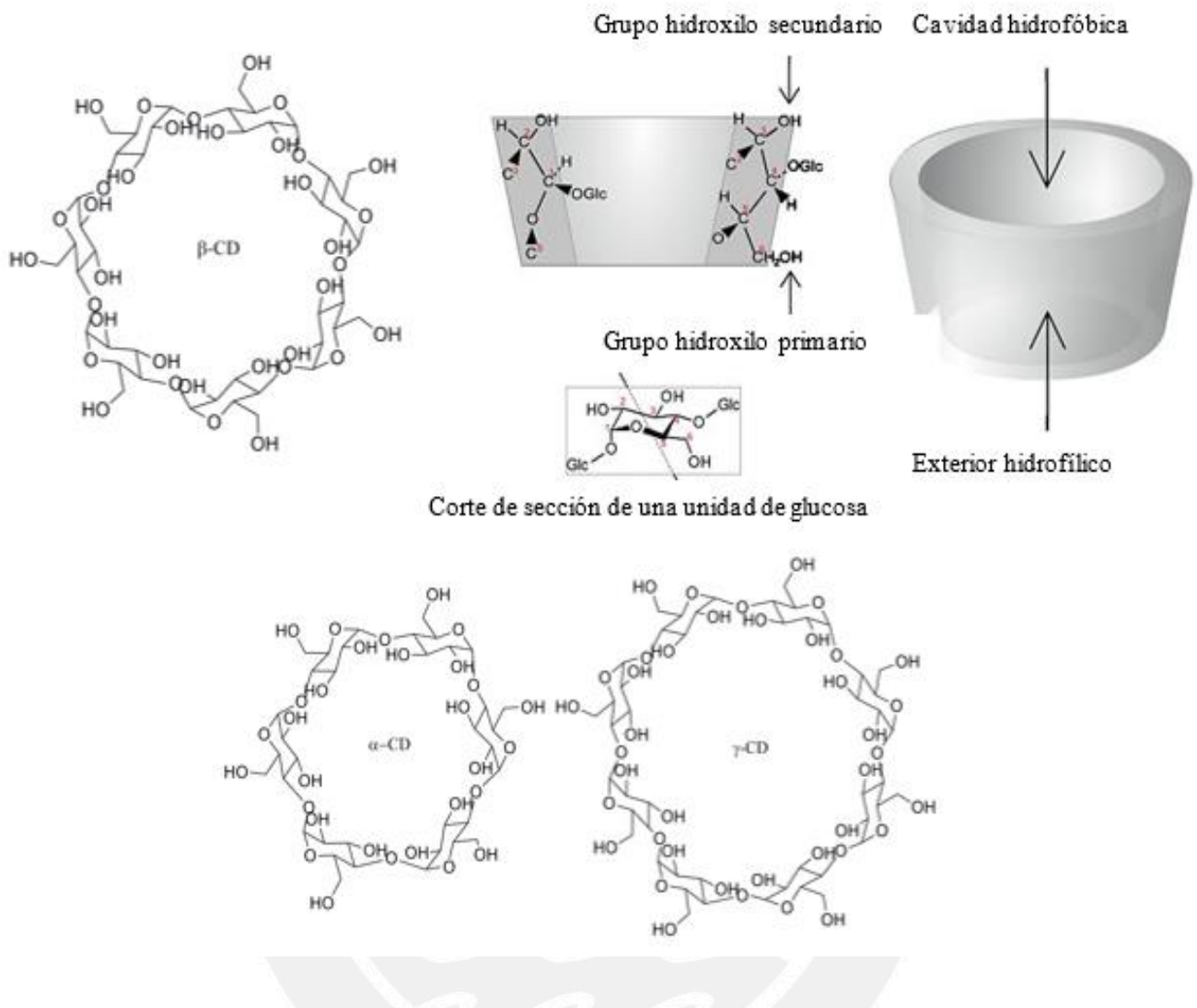


Figura 3: Estructuras químicas de las moléculas de la α -ciclodextrina, β -ciclodextrina y γ -ciclodextrina. Adaptada de Miranda, J. C. de, Martins, T. E. A., Veiga, F., & Ferraz, H. G. (2011)

Las β -ciclodextrinas consisten en siete monómeros de glucosa unidas covalentemente a través del enlace glucosídicos α -1,4. Desde el punto de vista topológico, este macrociclo puede ser observado como un cono truncado, en el cual el borde interno ($\sim 6,4 \text{ \AA}$) lleva los grupos hidroxilos primarios y el borde externo ($\sim 15,4 \text{ \AA}$) lleva los grupos hidroxilos secundarios. Dentro de la cavidad toroidal no hay presencia de grupos hidroxilos. Esta zona de la molécula tiene un fuerte carácter hidrófobo, de acuerdo a esta característica, junto con las fuerzas de van der Waals y los puentes de hidrógeno, permiten a la β -ciclodextrina alojar pequeñas moléculas en solución acuosa [26].

Las principales ventajas de las ciclodextrinas naturales como transportadores son: (1) su bien definida estructura química, que proporcionan muchos sitios potenciales de modificación química; (2) la capacidad de las ciclodextrinas de tener diferente tamaño de cavidades; (3) baja toxicidad y acción farmacológica; y (4) la protección del “huésped” incluido la degradación. Su principal aplicación de las ciclodextrinas es la mejora de la solubilidad, estabilidad y biodisponibilidad de la molécula “huésped”.

Como se mencionó anteriormente, las tres principales ciclodextrinas difieren entre sí por la cantidad de unidades de glucosa y esa diferencia le confiere propiedades únicas a cada ciclodextrina (Tabla 3).

Tabla 3: Propiedades de las ciclodextrinas naturales (Szejtli, 1994; Veiga et al., 2006; Brewster, Loftsson, 2007; Wintgens y Amiel, 2010). Adaptado de Jullian Matthaei. C (2007)

Propiedades	α -CD	β -CD	γ -CD
Unidades de glucosa	6	7	8
Peso molecular (g/mol)	972	1135	1297
Diámetro externo (Å)	14,6	15,4	17,5
Diámetro interno (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Altura (Å)	7,9	7,9	7
Volumen de la cavidad (Å ³)	174	262	427
Forma de cristales	Red hexagonal	Paralelogramos monocíclicos	Prisma cuadrático
pKa por potenciometría	12,333	12,202	12,081
Constante de difusión a 40 °C (m/s)	3,443	3,232	3,0
Hidrólisis por α -amilasa	Insignificante	Lento	Rápido

Debido a estas características, las ciclodextrinas pueden ser disueltas en agua y además pueden encapsular diferentes tipos de compuestos hidrofóbicos en su interior, especialmente compuestos aromáticos, formando así variados complejos de inclusión. De esta manera la molécula huésped puede ingresar en un medio hidrofílico sin necesariamente cambiar su solubilidad, sino es la

ciclodextrina en sí la que se disuelve en agua mientras que la molécula huésped está en el interior hidrofóbico de la ciclodextrina, sin tener contacto con el agua [18].

No obstante, en ocasiones, la contribución de la ciclodextrina no es suficiente para obtener la solubilidad deseada, por lo que se han sintetizado numerosas ciclodextrinas derivatizadas, las que, dependiendo del sustituyente, pueden aumentar la solubilidad de la misma ciclodextrina, modificar su volumen e hidrofobicidad y estabilizar a la molécula huésped, lo que puede provocar cambios en las propiedades físicas, biológicas y químicas de dichas moléculas. Ejemplo de ello son: la carboximetil- β -ciclodextrina, sulfobutiléter- β -ciclodextrina, 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina y la 2,6 dimetil- β -ciclodextrina.

Dentro de las ventajas que presentan las ciclodextrinas, destaca su baja toxicidad, lo que permite que sean utilizadas en química analítica, agricultura, en industrias farmacéuticas y alimentarias [18].

Las modificaciones en la estructura de las ciclodextrinas que se evidencian en la Figura 4, generalmente son realizadas por la sustitución de los grupos hidroxilos primarios/secundarios por diversos grupos funcionales, siendo clasificados en derivados hidrofílicos (grupo metil e hidroxipropil), hidrófobos (grupo acetil y etil), anfifílicas (estructuras de micelas) y derivados iónicos (sulfobutil-éter) según Silva Arrais, M. (2012).

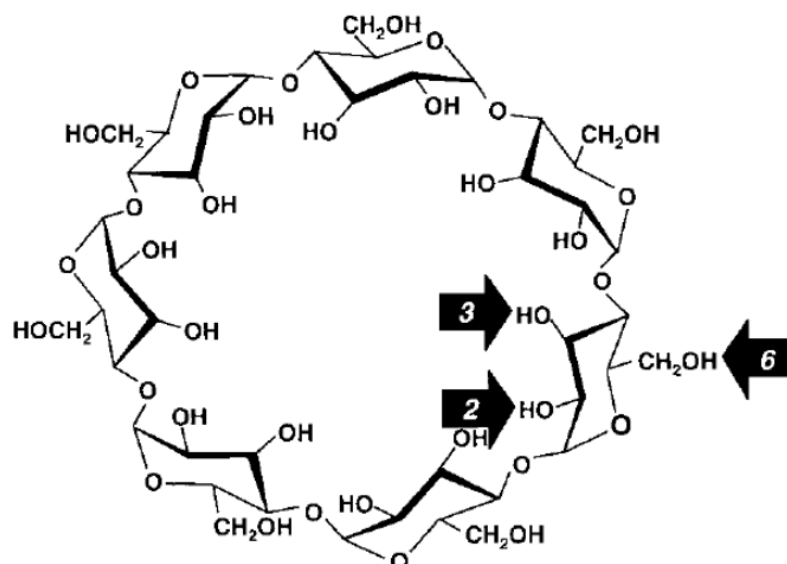


Figura 4: Sitios de modificaciones frecuentes en la β -CD (Veiga et al, 2006). Adaptada de Silva Arrais, M. (2012).

3.3. COMPLEJOS DE INCLUSIÓN Y EQUILIBRIO ASOCIACIÓN-DISOCIACIÓN

La formación de un complejo de inclusión estable en solución acuosa puede ser atribuida, en parte, al hecho de que las ciclodextrinas poseen una cavidad apolar con una geometría bien definida. Los complejos de inclusión pueden ser modelos útiles del proceso de complejación biomolécula-ligando, debido a su similaridad en sus propiedades termodinámicas de asociación cuando se compara con la relación antígeno-anticuerpo, ligando-ADN, enzima-sustrato y complejos proteína-carbohidrato [19].

Las constantes de asociación proveen una medida cuantitativa de la estabilidad del complejo y un completo entendimiento del complejo de inclusión es impedido por la incertidumbre en el valor de la constante de asociación. Entonces, es necesario llevar a cabo estudios de asociación entre el sistema hospedero y huésped, en los cuales las estructuras moleculares de estos son variadas sistemáticamente para permitir una correlación de parámetros de la estructura química con la estabilidad del complejo [19].

La condición mínima requerida para la formación del complejo de inclusión está en la compatibilidad geométrica entre la molécula receptora y el sustrato. El tamaño y la geometría de la molécula a ser incluida en la ciclodextrina deben ser adecuados para la cavidad apolar, pues dependiendo de la ciclodextrina utilizada, la cavidad puede ser pequeña o grande para la acomodación del huésped. La α -ciclodextrina, por poseer una cavidad pequeña, es utilizada en la complejación de moléculas pequeñas o de cadenas laterales de moléculas grandes. En cuanto a la γ -ciclodextrina, se usan para complejar moléculas grandes como antibióticos macrólidos o esteroides y la β -ciclodextrina es muy útil en aquellas moléculas que por lo menos tengan un anillo aromático.

Otra condición a ser observada es la polaridad de la molécula huésped pues, en general, las moléculas hidrófobas tienen mayor afinidad por la cavidad apolar de la ciclodextrina cuando está en solución acuosa según Loftson y Brewster [20].

Así, la formación del complejo de inclusión está condicionada a la estructura y propiedades fisicoquímico de los fármacos y las ciclodextrinas.

En solución acuosa la cavidad hidrófoba de la ciclodextrina está llena de moléculas de agua. La adición de moléculas hidrófobas como fármacos, promueve la movilización de las moléculas de agua que se encuentran originalmente en el interior de la cavidad de la ciclodextrina. Debido al microambiente termodinámicamente desfavorable (interacción polar-apolar) de la cavidad, las moléculas de agua tienden a salir de ella (Szejtli, 1998),

contribuyendo también un aumento de entropía. Este proceso lleva a la encapsulación total o parcial de la molécula huésped en la cavidad de la ciclodextrina, formándose un complejo soluble en agua. La estequiometría de esos complejos puede variar entre las siguientes proporciones 1:1; 1:2; 2:1 y 2:2; pero es más común y frecuente encontrar complejos 1:1 (una molécula del fármaco y una de la ciclodextrina) [21].

La extensión de la complejación en medio acuoso es caracterizada por la constante de asociación o estabilidad del complejo, esta constante es directamente proporcional al grado de asociación de la molécula huésped en la cavidad de la ciclodextrina. Su valor debe estar comprendido entre 50 y 2000 L.mol⁻¹ para que los complejos formados tengan aplicación práctica [20].

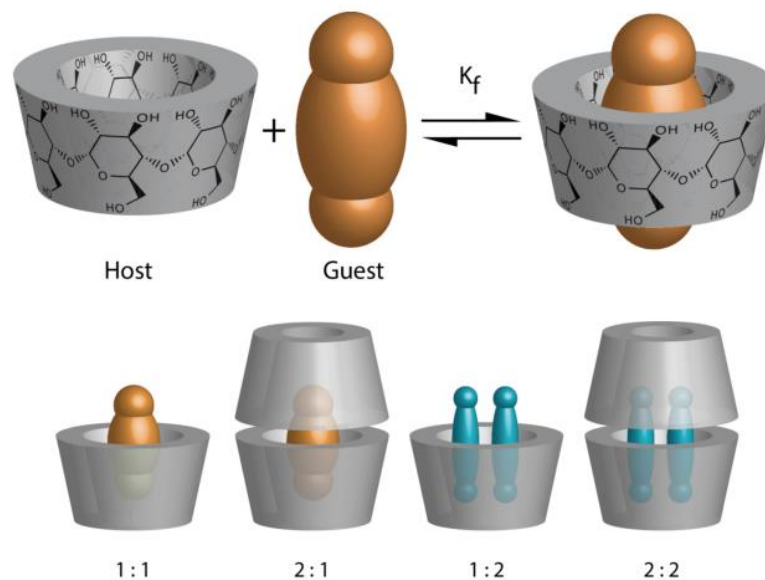


Figura 5: Ilustración esquemática de la asociación de la ciclodextrina libre (hospedero) con el ligando (huésped) para formar un complejo de inclusión. Adaptada de Crini,G (2014).

La constante de asociación es un parámetro muy importante en la evaluación de la afinidad y del grado de conexión de las moléculas encapsuladas en la cavidad de la ciclodextrina.

Las fuerzas intermoleculares que estabilizan al complejo pueden ser:

- Puente de hidrógeno

En el cual se involucra un átomo de hidrógeno ligado a un elemento electronegativo. Generalmente estas interacciones de puentes de hidrógeno entre el huésped y la

ciclodextrina son provenientes de los grupos hidroxilos primarios (C_6-OH) de las ciclodextrinas, que pueden girar en el enlace C_5-C_6 . En contraste, los hidroxilos secundarios, enlazados a los C_2 y C_3 , están rígidamente enlazadas.

- Fuerzas de van der Waals

Según Tabushi son responsables por la estabilización del complejo de inclusión, debido a la remoción de agua en la cavidad de la ciclodextrina.

Todas estas interacciones pueden ser consideradas relativamente débiles, pero proporcionan efectos sinérgico en conjunto. De esta forma, las moléculas interaccionan unas con otras, resultando en la formación de complejos con estabilidad suficiente para garantizar su aislamiento. (Quiñones, 2001).

3.4. ISOTERMA DE SOLUBILIDAD

En un sistema heterogéneo constituido por el huésped, hospedero y agua, es posible observar la variación de solubilidad del huésped a través de las isotermas de solubilidad. Esta variación puede repercutirse en un aumento ligero, un aumento hasta un cierto límite o una disminución. Experimentalmente este ensayo es realizado con la adición del fármaco en exceso a varios viales que contienen la solución de ciclodextrina en gradiente de concentración. Estos viales con su contenido son mantenidos sobre agitación a una temperatura constante. Después del equilibrio alcanzado el sobrenadante es analizado para determinar la concentración total del huésped. Con los valores obtenidos se construye un diagrama de fases, donde se expresa la concentración del huésped versus el gradiente de concentración del hospedero (Higuchi y Connors, 1965; Brewster y Loftsson, 2007).

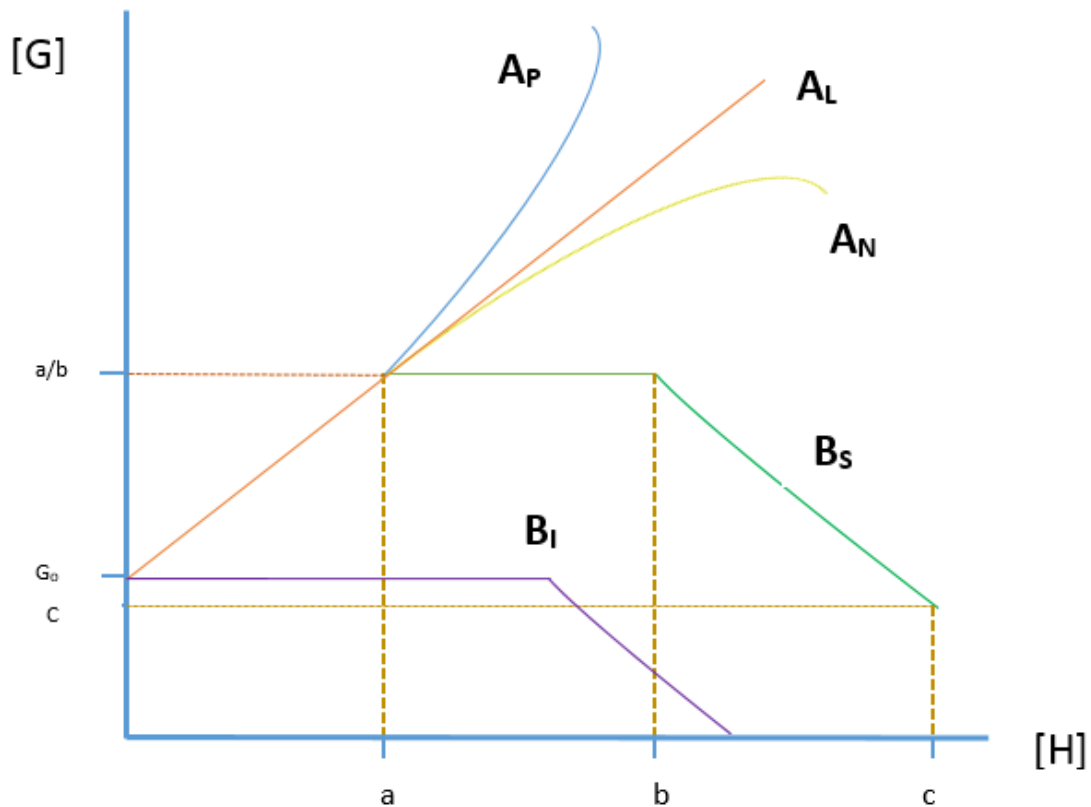


Figura 6: Diagrama de solubilidad de fases que muestra el comportamiento de un complejo soluble (A), o un complejo menos o poco soluble (B). Higuchi y Connors (1965) Adaptada de Loftsson (2007).

Nota: $[G]$ es la concentración de la molécula huésped, $[H]$ es la concentración de la molécula que es el hospedero y los puntos a , b y c representan el distinto desarrollo en la isoterma de solubilidad.

El método de diagrama de solubilidad planteado por Higuchi-Connors tiene la ventaja de un simple análisis de datos y el hecho que es aplicable para una variedad de estequiometrías. Debajo del prerrequisito de idealidad, el método genera información sobre la solubilidad intrínseca del compuesto, constante de asociación y estequiometría del complejo.

De estas representaciones se puede distinguir dos tipos de diagramas, A y B, de acuerdo a la Figura 6. Los del tipo A corresponden a los complejos que son solubles, lo que indica que el hospedero ha facilitado el incremento de la solubilidad del huésped. Existen tres tipos de variantes para los diagramas tipo A. El primero es el A_L , el cual se obtiene cuando el complejo es de primer orden con respecto al huésped lo que puede significar una estequiometría hospedero-huésped 1:1; 1:2 y 1:3; pero hay casos especiales que podrían evidenciar una estequiometría hospedero-huésped 2:1 [20][22].

Si la curvatura es positiva, como se observa para A_P , los complejos son de elevado orden con respecto al hospedero, presentando estequiometrías hospedero-huésped de 2:1; 3:1; 4:1. Una curvatura negativa, A_N , podría ser si el hospedero a grandes concentraciones produce una auto agregación o una interacción soluto-solvente que permiten alguna alteración que afecta la constante de estabilidad del complejo (Higuchi y Connors, 1965) [20][22].

Los diagramas de tipo B representan la situación donde los complejos son menos solubles o insolubles. Existen dos variantes de B. Una en la cual el complejo formado es tan insoluble que no incrementa la solubilidad del huésped, el resultado puede ser una línea como B_I , y otra en la cual la meseta y la declinación no es tan marcada (la línea B_S). La línea B_S es similar a A_L en el inicio del incremento, pero a concentraciones críticas del hospedero en el punto “a”, la meseta emerge indicando un límite en la solubilidad del complejo. El punto “b” puede ser alcanzado cuando todo el sólido del huésped presente en el sistema ha sido complejado y consecuentemente cada complejo ha precipitado. Sin el huésped sobre el complejo formado en la solución se observa una declinación aparente de la solubilidad hasta el punto “c” [20][22].

Entonces como se mencionó, los diagramas de solubilidad más frecuentes son del tipo lineal (A_L) y en el caso de tener una relación estequiométrica 1:1, la aparente solubilidad del fármaco (S_{total}) será dado por la ecuación 1.

Ecuación 1: Solubilidad aparente para una relación estequiométrica 1:1 (hospedero:huésped)

$$S_{tot} = S_0 + m [D_m \cdot CD]$$

Nota: S_0 es la solubilidad inherente del fármaco en medio acuoso, D_m es una molécula del fármaco (huésped) y $[D_m CD]$ es la concentración del complejo entre el fármaco y la ciclodextrina.

Si una molécula del fármaco forma un complejo soluble en agua con una molécula de ciclodextrina, entonces se obtendrá una pendiente en el diagrama de solubilidad que puede ser determinado por la Ecuación 2.

Ecuación 2: Pendiente del diagrama de solubilidad para una relación estequiométrica 1:1 (hospedero:huésped)

$$\text{Pendiente} = \frac{S_0 \cdot K_{1:1}}{S_0 K_{1:1} + 1}$$

Nota: $K_{1:1}$ es la constante de asociación para el complejo. En este caso, la pendiente es siempre menor a la unidad

Si el complejo formado fuera 2:1 (fármaco/ciclodextrina), entonces la pendiente podría ser determinado de acuerdo a la siguiente ecuación:

Ecuación 3: Pendiente del diagrama de solubilidad para una relación estequiométrica 2:1 (huésped:hospedero)

$$\text{Pendiente} = \frac{2 S_0^2 K_{2:1}}{2 S_0^2 K_{2:1} + 1}$$

Nota: $K_{2:1}$ es la constante de asociación del complejo, S_0^2 es la solubilidad intrínseca elevada al cuadrado. En este caso la pendiente es siempre menor que dos.

La desviación positiva de la linealidad (diagramas de Tipo A_p), sugiere la formación de complejos de alto orden con respecto a la ciclodextrina. La estequiometría del sistema puede ser probado por un modelo cuadrático con un buen ajuste para la estequiometría 1:2 (fármaco/ciclodextrina) que se muestra en la Ecuación 4.

Ecuación 4: Modelo de ajuste para una relación estequiométrica 1:2 (huésped:hospedero) para el diagrama de solubilidad

$$S_{\text{tot}} = S_0 + K_{1:1} S_0 [CD] + K_{1:1} K_{1:2} S_0 [CD]^2$$

Nota: $[CD]$ representa la concentración libre de ciclodextrina, S_0 es la solubilidad inherente del fármaco en medio acuoso, $K_{1:1}$ es la constante de asociación para una estequiometría 1:1 y $K_{1:2}$ es la constante de asociación para una estequiometría 1:2 [20][22].

El cálculo de la constante de estabilidad requiere de conocer la estequiometría. Pero esto no siempre es posible, obteniendo solo una estimación de la estequiometría de los diagramas de solubilidad. Por esta razón, los cálculos de la constante de asociación son frecuentemente basados en la asunción de una estequiometría razonable y el resultado es algunas veces ambiguo.

Es importante recordar que esta técnica no indica si el fármaco forma un complejo de inclusión con la ciclodextrina, solo evidencia cómo influencia la ciclodextrina sobre la solubilidad del fármaco. Estos estudios de diagrama de solubilidad son realizados en

soluciones acuosas saturadas con el fármaco donde la formación de complejos agregados de alto orden está más favorecida que en soluciones no saturadas [22].

3.5. COMPLEJOS DE INCLUSIÓN Y DE NO INCLUSIÓN

Los grupos hidroxilo existentes en la superficie exterior de la molécula de ciclodextrina son capaces de formar puentes de hidrógeno con otras moléculas y de esta manera las ciclodextrinas pueden formar complejos solubles en agua con compuestos lipófilos insolubles en agua. En soluciones acuosas saturadas, los complejos hospedero:huésped frecuentemente consisten en una mezcla de complejos de inclusión y no inclusión.

Esto puede explicar por qué el valor de la constante de asociación para el complejo de formación es dependiente de la concentración. Los complejos de no inclusión también pueden existir en situaciones en que ocurre adsorción del huésped y la superficie exterior de la ciclodextrina [Loftsson e col., 2002; Loftsson e col., 2004].

3.6. ECUACIÓN DE BENESI-HILDEBRAND

Este método presupone diferentes estequiometrías para el complejo de inclusión, y a partir de estas se deduce una expresión válida para el cálculo de la estequiometría real, confirmándose a partir de los resultados obtenidos si la estequiometría presunta es cierta o por el contrario es necesario ajustar otro modelo [25].

Si se supone una estequiometría 1:1 (hospedero:huésped), la constante de formación del complejo viene dada por la Ecuación 5.

Ecuación 5: Constante de formación del complejo 1:1 (hospedero:huésped)

$$K = \frac{[FBZ \cdot BCD]}{[FBZ] \cdot [BCD]}$$

Nota: [FBZ.BCD] es la concentración del complejo de β -ciclodextrina y fenbendazol en el equilibrio, [FBZ] es la concentración de fenbendazol libre en el equilibrio y [BCD] es la concentración de ciclodextrina libre en el equilibrio.

El método parte de las siguientes suposiciones:

- (1) La concentración inicial de la β -ciclodextrina y fenbendazol son $[BCD]_0$ y $[FBZ]_0$ respectivamente
- (2) La $[BCD]$ es mucho mayor que $[FBZ]_0$
- (3) La concentración de $[BCD \cdot FBZ]$ es x , entonces

$$K_a = \frac{x}{([FBZ]_0 - x)([BCD]_0 - x)}$$

Teniendo en cuenta que la longitud del paso óptico es 1,0 cm, la absorbancia dada a una longitud de onda puede ser descrita como sigue:

$$A = \epsilon_{BCD} ([BCD]_0 - x) + \epsilon_{FBZ} ([FBZ]_0 - x) + \epsilon_{BCD-FBZ} \cdot x$$

Nota: ϵ_{BCD} , ϵ_{FBZ} y $\epsilon_{BCD-FBZ}$ son los coeficientes de absorción molar de β -ciclodextrina, fenbendazol y del complejo, respectivamente.

Como no existe absorbancia para β -ciclodextrina en el rango de 220 a 350 nm, esta puede ser insignificante comparando con, ϵ_{FBZ} y $\epsilon_{BCD-FBZ}$. Tomando en cuenta esta aproximación y estableciendo que:

$$\Delta A = A - \epsilon S ([FBZ]_0)$$

$$\Delta \epsilon = \epsilon_{BCD-FBZ} - \epsilon_{FBZ}$$

$$[BCD]_0 \gg [FBZ]_0$$

se obtiene la ecuación de Benesi-Hildebrand, Ecuación 6 y 7.

Ecuación 6: Modelo de Benesi-Hildebrand para la relación estequiométrica 1:1 (hospedero:huésped)

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{\Delta \epsilon} + \frac{1}{k(\Delta \epsilon) \cdot [BCD]}$$

Y para un modelo estequiométrico 2:1 (hospedero:huésped), se tiene

Ecuación 7: Modelo de Benesi-Hildebrand para la relación estequiométrica 2:1 (hospedero:huésped)

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{\Delta \epsilon} + \frac{1}{k(\Delta \epsilon) \cdot [BCD]^2}$$

3.7. SIMULACIÓN COMPUTACIONAL

Diferentes enfoques pueden ser usados para investigar un fenómeno. El más común es realizar un experimento, el cual ha sido usado a lo largo del tiempo. A través de los experimentos, el observador puede obtener una representación real del proceso de interés. En base a estos, es posible comprobar o verificar las hipótesis planteadas y obtener una conclusión, de esta forma se obtiene teorías y leyes.

El segundo aproximamiento para investigar un fenómeno es una simulación, la cual es una imitación de un sistema real, en otros términos, la realidad es modelada en un sistema representativo. Las simulaciones son realizadas cuando el experimento no es posible realizar o llega a demandar un procedimiento tedioso o demandante de tiempo. Pero para obtener una simulación exitosa es necesario que sus condiciones impuestas sean lo suficientemente precisas; de esta manera los experimentos validan y confirman los resultados de la simulación.

Las simulaciones en computadores han llegado a ser una herramienta muy útil, no solo en la ciencia, si no en diferentes campos, como el manejo de riesgos, predicción del stock en las ventas, desarrollo de carros y planos, desarrollo de fármacos y muchos más. En esta parte del trabajo se enfocará a describir las interacciones en un sistema hospedero:huésped.

En la siguiente sección se describirá una breve introducción de los métodos computacionales empleados.

3.7.1. MÉTODOS COMPUTACIONALES

Los métodos computacionales para la simulación de biomoléculas han emergido rápidamente en los últimos años como un complemento útil para los experimentos. Los modelos generados por computadora y las simulaciones permiten analizar la estructura y los detalles cinéticos de sistemas biológicos grandes, que son difíciles de capturar experimentalmente. Estudios sistemáticos y análisis estadísticos proveen información acerca de conformaciones estables y cambios topológicos de un sistema debido a influencias externas e internas. Estos análisis pueden mejorar el entendimiento y predicción de funciones biológicas al proveer nuevas bases para la experimentación y aplicación práctica en medicina y tecnología.

Además, este campo de la química computacional puede ser considerado relativamente joven, debido a los recientes avances y desarrollo del poder computacional, capacidad de memoria, arquitectura en paralelo, cálculos en la nube y eficiencia de cálculo de algoritmos. De esta manera existen diversos programas que permiten realizar simulaciones de sistemas químicos y biológicos cubriendo diversas escalas de simulación dependiente del tiempo. Los modelos de simulación pueden cambiar dependiendo la propiedad que se desee observar y el tamaño del sistema (Figura 7).

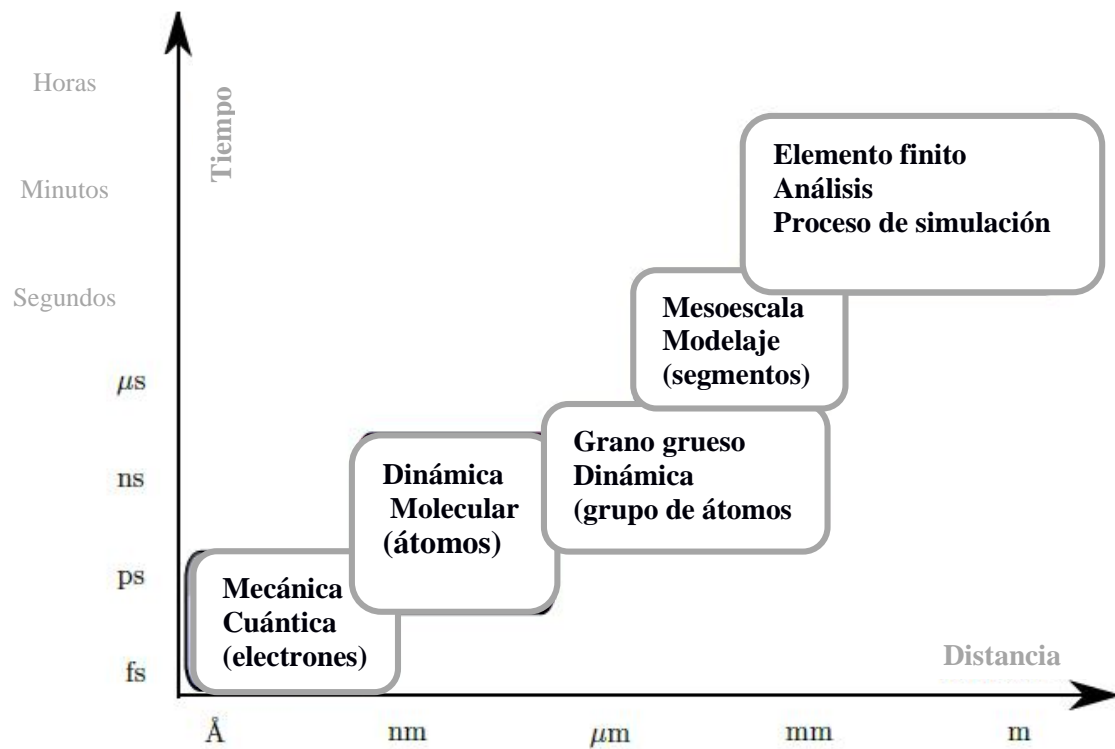


Figura 7: Modelos de simulación para un sistema de un determinado tamaño y escala de tiempo. Roca Sabio, A (2013).

Las técnicas de cálculos computacionales pueden ser clasificados bajo tres categorías: a) cálculos *ab initio* y de la estructura electrónica del funcional de densidad, b) métodos semiempíricos y c) mecánica molecular [27].

Los métodos de estructura electrónica utilizan las leyes de la mecánica cuántica en vez de la física clásica como base de sus cálculos. De acuerdo a esta, la energía así como otras propiedades de la molécula se pueden obtener mediante la resolución de la ecuación de Schrödinger (Ecuación 8).

Ecuación 8: Ecuación simplificada de Schrödinger

$$H \Psi = E \Psi$$

No obstante, para sistemas polielectrónicos grandes no es posible resolver esta ecuación de forma exacta, caracterizándose los métodos de estructura electrónica por diferentes aproximaciones matemáticas para su solución. Entre estos se tiene:

- Los métodos semiempíricos, los cuales usan modelos parametrizados a partir de datos experimentales con el fin de simplificar los cálculos.

- Los métodos *ab initio*, que se basan en las leyes de la mecánica cuántica y en un pequeño número de constantes físicas, como son: la velocidad de la luz, las masas y cargas de electrones y núcleos y la constante de Planck.
- Los métodos del funcional de densidad (DFT), que son similares a los *ab initio*, pero incluyen la correlación electrónica [27].

3.7.1.1. MÉTODOS SEMIEMPÍRICOS

Los métodos como el orbital molecular del electrón libre (FEMO), orbital molecular de Hückel (HMO) y el de Pariser-Parr-Pople (PPP), se aplican solamente a moléculas conjugadas planares con electrones π . Sin embargo, otros métodos semiempíricos, como de la teoría del orbital molecular (TOM) como AM1, PM3, PM6, PM7, CINDO y MINDO (se muestran a continuación) pueden ser aplicados a la mayoría de moléculas y consideran todos los electrones de valencia [28].

La teoría del orbital molecular semiempírico se subdivide en dos categorías:

- a. Los que usan el hamiltoniano, que es la suma de los términos de un electrón encontrados en la teoría de Hückel.
- b. Los que usan un hamiltoniano que incluye tanto términos de repulsión de dos electrones como términos de un electrón, encontrados en el método de Pariser-Parr-Pople.

3.7.1.1.1. MÉTODO DE PARISER-PARR-POPPE (PPP)

Este método es generalmente considerado ser el más confiable en predicción de la longitud de absorción máxima de moléculas conjugadas grandes y considera efectos interatómicos. Diferente a todos los demás métodos semiempíricos, el método PPP incorpora solo efectos de orbitales π y no considera los efectos σ . Cuando se compara a otros métodos, como CNDO, INDO, etc; este tiene las siguientes ventajas:

- a) habilidad para trabajar efectivamente con sistemas heteroatómicos
- b) habilidad para distinguir la geometría molecular
- c) habilidad para distinguir entre singletes y tripletes.

Este método usa la misma asunción del método de Hückel (HMO), sin embargo la diferencia es que en el caso del método PPP las cantidades de energía alfa o beta definidas en el determinante incluyen efectos de interacciones electrónicas [28].

3.7.1.1.2. MÉTODOS DEL DESPRECIO INTERMEDIO DEL SOLAPAMIENTO DIFERENCIAL (INDO) Y DESPRECIO COMPLETO DEL SOLAPAMIENTO DIFERENCIAL (CNDO)

Pertencen a la categoría de OM semiempíricos de dos electrones (generalizaciones del método PPP) que son aplicables a moléculas planares y no planares. El método de desprecio completo del solapamiento diferencial (CNDO), el método de desprecio intermedio del solapamiento diferencial (INDO). Ambos métodos tratan explícitamente solo con los electrones de valencia. CNDO e INDO son considerados obsoletos debido al avance de los otros métodos [28].

3.7.1.1.3. MÉTODO DEL MODELO 1 DE AUSTIN (AM1)

Fue desarrollado por Dewar et al. y fue parametrizado para compuestos que contienen H, B, Al, C, Si, Ge, Sn, N, P, O, S, F, Cl, Br, I, Zn y Hg al usar 100 compuestos modelo. La diferencia entre AM1 y MNDO es que los exponentes de orbital de valencia de tipo Slater de “s” y “p” sobre los mismo átomos son diferentes [28].

3.7.1.1.4. MÉTODO PARAMETRIZADO 3 (PM3)

El método PM3 toma la energía de valencia molecular V_{val} que incluye la repulsión internuclear, como la suma de la energía puramente electrónica $E_{\text{el-val}}$, más la energía de la repulsión core-core V_{cc} [29].

Ecuación 9: Ecuación de la energía de valencia molecular para el método PM3

$$V_{\text{val}} = E_{\text{el-val}} + V_{\text{cc}}$$

Los métodos tipo Dewar (MINDO, AM1, PM3) tratan a la molécula como una colección de electrones de valencia y centros atómicos, donde cada centro (core) consiste de un átomo y sus electrones internos. La aproximación más simple se puede escribir de la siguiente forma:

$$V_{\text{cc}} = \sum_{B>A} \sum_A [C_A C_B \langle S_A S_A | S_B S_B \rangle] + f_{AB}$$

Nota: $C_A C_B$ son las cargas del core A y B, además $\langle S_A S_A | S_B S_B \rangle$ es la integral de repulsión electrónica que involucra los orbitales de valencia s de los átomos A y B; el último término f_{AB} corresponde a un valor que varía según el método y que concuerda con los datos experimentales.

3.7.1.1.5. MÉTODO PARAMETRIZADO 6 (PM6)

Este nuevo método semiempírico que fue desarrollado en el 2004 es superior a los otros en varios aspectos. Está basado en el método NDDO y mejorado por la adopción de Viotyuk en los términos de interacción diatómica núcleo-núcleo y la aproximación de Thiel del orbital d.

Estas modificaciones permiten la parametrización de 80 elementos y también reducen el error para un grupo de elementos.

3.7.1.2. TEORÍA DEL FUNCIONAL DE DENSIDAD (DFT)

La teoría del funcional de densidad es un método computacional que deriva propiedades de la molécula basándose en la densidad del electrón de la molécula. DFT difiere de los métodos *ab initio*, donde la energía de la molécula y todos sus valores derivados dependen de la determinación de la función de onda. La función de onda no es una realidad física pero sí es una construcción matemática, mientras la densidad electrónica es una característica física de todas las moléculas. Esta es una primera ventaja al recurrir a DFT, al basarse en la densidad electrónica como una propiedad real de toda molécula. Otra ventaja al usar DFT es que esta densidad electrónica depende solo de las coordenadas (x, y, z) de un electrón, mientras que la función de onda es matemáticamente más complicada cuando aumenta el número de electrones. Sin embargo, la precisión del método DFT puede ser afectada debido a las aproximaciones que usa.

El fundamento matemático del método DFT es el funcional, que se entiende como una función de otra función, denotada como $Y = F[f(x)]$. Esto significa que el valor de Y es por sí misma dependiente de otra función. En el método DFT, la energía de la molécula es un funcional de la densidad del electrón. La densidad electrónica es una función el cual depende de tres variables, las coordenadas (x, y, z) correspondientes a las posiciones electrónicas. El funcional (F) de la densidad electrónica da la energía de la molécula.

$$\text{Densidad electrónica} = \rho(x, y, z)$$

$$\text{Energía} = F[\rho(x, y, z)]$$

Con el fin de encontrar el valor del funcional F , se realizan ciertas aproximaciones. Esta es una de las razones por la que hay muchos métodos diferentes de DFT, lo cual significa que hay muchas maneras de aproximar el funcional.

En 1960, Hohenberg y Kohn usaron el teorema de Thomas-Fermi para desarrollar una versión más detallada de la teoría. La teoría de Kohn y Sham describe la matemática de la densidad electrónica y su subsecuente correlación con la energía molecular, la cual se muestra en la Ecuación 10 [30].

Ecuación 10: Ecuación de Kohn y Sham

$$E_{\text{DFT}}[\rho] = T[\rho] + E_{\text{ne}}[\rho] + J[\rho] + E_{\text{xc}}[\rho]$$

Nota: donde E_{DFT} es la energía electrónica total, T es la energía cinética de los electrones, E_{ne} es la atracción núcleo-electrón (energía coulombica), J es la energía de repulsión electrón-electrón, y E_{xc} es la energía de correlación-intercambio electro-electrón, en tanto que ρ es por sí mismo una función de las coordenadas (x, y, z) del electrón [30].

Entonces, E_{DFT} , T , E_{ne} , J y E_{xc} son funcionales, donde el funcional E_{xc} está relacionado al principio de exclusión de Pauli, el cual establece que dos electrones no pueden ocupar el mismo nivel de energía [30].

Los métodos de DFT son complicados y diversos, pero generalmente pueden ser divididos en tres clases:

1. Métodos que usan la aproximación de la densidad local (LDA), donde el supuesto más importante es que, en estado gaseoso, una molécula con muchos electrones posee regiones del espacio donde la densidad electrónica se mantiene uniforme. Sin embargo, esta aproximación LDA no funciona bien con la estructura de banda electrónica de sólidos.
2. Métodos que aplican el factor de corrección de gradiente. La gradiente toma en cuenta la no uniformidad de la densidad electrónica en regiones del espacio alrededor de la molécula.
3. Métodos que son una combinación de la aproximación de Hartree-Fock y DFT para la energía de intercambio. Ellos son conocidos como los métodos híbridos [30].

Las fuerzas de dispersión de London constituyen un tipo de fuerza intermolecular que considera efectos de correlación, los cuales son cruciales, no solo en la

estabilidad de biomoléculas de agregados moleculares, sino también en las propiedades termoquímicas de sistemas de mediano tamaño, como son las energías de reacción o barreras energéticas. Debido a su universalidad, una descripción apropiada de las dispersiones de London, es un prerrequisito para la precisión de los métodos computacionales [31].

La teoría del funcional de Kohn-Sham (DFT) ha llegado a ser una importante metodología en química computacional, además que es considerada en principio, una teoría exacta. Sin embargo, es conocido que las aproximaciones realizadas mediante estos cálculos de energía no describen adecuadamente a las fuerzas de dispersión de London en el sistema [31].

En los últimos 10 años se ha desarrollado un gran esfuerzo para resolver este problema, y varias estrategias para tratar las dispersiones de London con DFT han sido desarrolladas y estas pueden ser clasificadas en cuatro categorías:

1. El funcional de densidad parametrizado en contra de la energía de interacción no-covalente, tales como los métodos usados en las formas reparametrizadas del funcional de intercambio de Perdew-Wang, donde también se incluyen los funcionales de Truhlar M05 y M06.
2. El funcional de densidad que directamente incluye una porción no local que permite la descripción de la dispersión de London. El funcional de densidad de tipo van der Waals (vdw) combina un funcional estándar de intercambio-correlación con un término de energía no local [31].
3. Correcciones de dispersión aditivas que pueden ser combinadas con funcionales de densidad estándar, asegurando el correcto comportamiento asintótico de la energía de dispersión por construcción. Estas correcciones pueden ser divididas en dos sub-categorías:
 - a. La primera pertenece el funcional de Grimme, correcciones atómicas por pareja independientes de la densidad, como DFT-D1, DFT-D2 y DFT-D3.
 - b. La segunda incluye las correcciones dependientes de densidad, como las del modelo por Becke y Johnson (XDM), el aproximamiento DFT + vdw/vdw-TS por Tkatchenko y Scheffler.
4. Los potenciales efectivos de un electrón diseñados para imitar efectos de dispersión de London multi-electrónicos. Este aproximamiento es inspirado

por la idea de potenciales efectivos del núcleo (ECPs), normalmente usados para describir los electrones del núcleo de elementos pesados [31].

De los métodos que pertenecen a la tercera categoría, en particular la corrección de Grimme, DFT-D3 ha recibido mucha atención y ha sido usado satisfactoriamente en varios estudios que han probado su universalidad, incluyendo estudios sobre termoquímica, geometría, energías relativas en conformeros de relevancia biológica [31].

3.7.1.3. DINÁMICA MOLECULAR

En general, el modelado molecular engloba varios métodos teóricos y técnicas computacionales, los cuales son usados para simular el comportamiento y características de biomoléculas u otra sustancia química.

Estas técnicas son mayormente aplicadas en el campo de la física, química y biología computacional, así como en bioinformática y ciencia de los materiales, para el estudio de sistemas moleculares desde el rango de compuestos químicos pequeños hasta sistemas biológicos complejos y agregados de materiales [32].

La característica común de la dinámica molecular (MD) es la descripción del nivel atómico del sistema, en contraste con simulaciones de química cuántica, donde la función de onda electrónica es considerada explícitamente. El beneficio de la dinámica molecular es que esta reduce la complejidad del sistema molecular, lo que permite que muchos átomos sean considerados durante la simulación por un largo periodo de tiempo [32].

En el método de dinámica molecular, lo que se analiza es la evolución temporal del modelo considerado, aquí destacan los *ensembles* de volumen constante y energía constante (NVE), volumen constante y temperatura constante (NVT), presión constante y temperatura constante (NPT). Por tanto, la parte central de este constituye el algoritmo de integración de las ecuaciones de movimiento de Newton, que son ecuaciones diferenciales ordinarias acopladas, no-lineales y de segundo orden, que deben ser resueltas numéricamente. Dadas las posiciones y velocidades iniciales a un tiempo inicial t_0 , la tarea del algoritmo es obtener las posiciones y velocidades iniciales a un tiempo $t_0 + \Delta t$ [32].

Existen numerosos algoritmos para integrar las ecuaciones de Newton. Todos ellos convierten las ecuaciones diferenciales en ecuaciones de diferencia finita. La elección del algoritmo es fruto del compromiso entre el grado de precisión requerido y el costo computacional. Los algoritmos más usados son el de *Verlet* y el *velocity Verlet* [32].

En resumen, un programa de dinámica molecular (MD) trabaja de la siguiente manera:

1. Se leen los parámetros que especifican las condiciones de la simulación
2. Se inicializa el sistema, se asignan posiciones y las velocidades iniciales
3. Se calculan las fuerzas sobre todas las partículas
4. Se integran las ecuaciones de movimiento de Newton, en este paso y junto con el anterior, conforman el núcleo de la simulación. Se repiten n veces hasta haber calculado la evolución temporal del sistema durante el tiempo total de simulación deseado. Se van guardando las posiciones, velocidades, fuerzas, etc, durante cada paso en un archivo para luego ser procesadas.
5. Se calculan e imprimen los diferentes promedios relevantes. Para ello se descartan n_0 pasos iniciales, correspondientes al periodo para alcanzar el equilibrio entre estados y se estima el promedio termodinámico de una magnitud dinámica arbitraria A como se observa en la ecuación 11

Ecuación 11: Promedio termodinámico de una magnitud dinámica arbitraria A

$$\langle A \rangle = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{1}{t} \int_{n_0 \Delta t}^t A(t) dt \approx \frac{1}{n - n_0} \sum_{i=n_0+1}^n A(t = i \Delta t)$$

Numerosos paquetes de programas de computadora existen para realizar simulaciones de dinámica molecular, uno de los cuales ha sido usado ampliamente es Amber, el cual contiene un paquete llamado AmberTools, con estos programas es posible desarrollar múltiples simulaciones químicas. El programa Amber refiere más que solo un paquete de dinámica molecular, esto incluye la colaboración de numerosos programas que trabajen juntos para configurar, desarrollar y analizar simulaciones de dinámica molecular desde la preparación hasta su análisis. El nombre Amber también refiere a una serie de campos de fuerza de mecánica molecular clásica, primariamente designada para la simulación de biomoléculas, también de aminoácidos, carbohidratos, fosfolípidos y moléculas orgánicas generales [45][46].

De aquí en adelante se describirá algunos conceptos usados por el *software* Amber 14, el cual fue usado para el desarrollo de la tesis.

1. APROXIMACIÓN DEL CAMPO DE FUERZA

Uno de los paquetes que contiene Amber 14 es el llamado *Sander*, es un programa de minimización de energía y de dinámica molecular el cual relaja la estructura por movimientos iterativos de átomos a través de un gradiente de energía y genera configuraciones por integración de las ecuaciones de Newton. Estas configuraciones son guardadas en intervalos regulares durante la simulación y después pueden ser procesados para el cálculo de propiedades químicas como por ejemplo el cálculo de energía libre [33].

La ecuación del campo de fuerza que utiliza este programa tiene la siguiente forma:

Ecuación 12: Ecuación del campo de fuerza para el programa AMBER 14

$$\begin{aligned}
 V(\mathbf{r}) = & \sum_{\text{enlaces}} K_b(d - d_0)^2 + \sum_{\text{ángulos}} K_\theta(\theta - \theta_0)^2 \\
 & + \sum_{\text{diedros}} (V_n/2)(1 + \cos[n\phi - \delta]) \\
 & + \sum_{\text{no enlazante } i j} ((A_{ij}/r_{ij}^{12}) - (B_{ij}/r_{ij}^6) + (q_i q_j / r_{ij}))
 \end{aligned}$$

Nota: d y d_0 son las distancias de enlace finales e iniciales respectivamente, θ y θ_0 son los ángulos finales e iniciales, K_b , K_θ son constantes de fuerza, $n\phi$ es la multiplicidad del diedro, δ es la fase del ángulo diedro, q_i , q_j son cargas atómicas parciales [45].

Los dos primeros términos representan la aproximación armónica de la física clásica, la cual se ejecuta en el modelo de mecánica molecular (MM), y corresponden a la vibración armónica y flexión del enlace químico. El sistema no tiene permitido ir más allá de su estado de equilibrio, el estiramiento del enlace químico llega hasta cierto punto en que se generan configuraciones impropias para los ángulos de enlaces. Estas perturbaciones permiten restaurar las fuerzas, las cuales aumentan la energía potencial del sistema [33].

Parámetros tales como ángulos diedros y de torsión restringen las rotaciones alrededor de los enlaces. El componente de energía potencial de cada rotación del enlace es dado por una serie de expansiones de Fourier alrededor del ángulo diedro de equilibrio, con una barrera de energía potencial y periodicidad [33].

El resto de la Ecuación 12 representa los términos no enlazantes dentro de la molécula, los cuales cambiarán la orientación espacial molecular global. Las fuerzas involucradas para estos términos son las van der Waals y las fuerzas electrostáticas. De acuerdo al campo de fuerza clásico de Amber, estos parámetros son definidos por un grupo de átomos que son separados por 4 enlaces o más [33].

2. SISTEMAS PERIÓDICOS

Las computadoras solo pueden guardar y manejar la información de la trayectoria para un número limitado de átomos en una simulación dada. Para tratar con esta limitación e imitar un sistema infinito, se introducen condiciones periódicas de contorno. La idea básica es que el sistema infinito es aproximado por un arreglo periódico de réplica de un sistema finito. La siguiente Figura muestra un sistema de dos dimensiones. Todos los átomos están contenidos en una celda central y cada celda está rodeada por ocho vecinos. Si un átomo deja un lado de la celda, este reingresa del lado opuesto con la misma velocidad. No existen paredes entre las celdas y los efectos superficiales son eliminados [34].

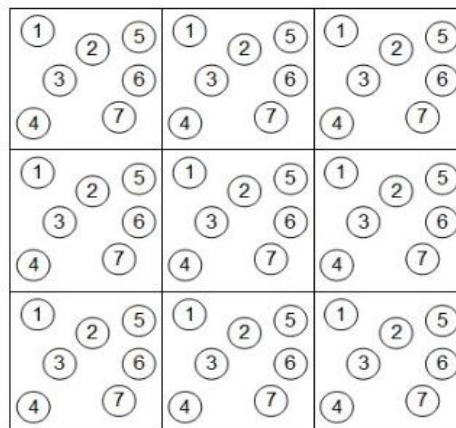


Figura 8: Condiciones periódicas de contorno. La célula central es replicada en ambas direcciones. Adaptada de Zhiju Zheng (2010).

3. EFICIENCIA DEL CÁLCULO

Para obtener las fuerzas, la función potencial debe ser evaluada, lo cual constituye el paso que más tiempo demanda en una simulación computacional. Un esquema común para reducir el tiempo computacional es considerar una esfera con un radio alrededor de cada partícula. Como se muestra en la Figura 9 las interacciones entre el átomo central y los

átomos contenidos en la esfera son incluidas, mientras que las interacciones con otros átomos fuera de la esfera son despreciadas.

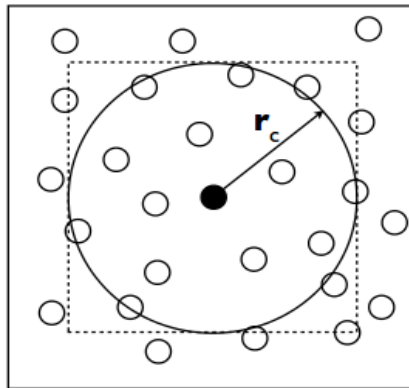


Figura 9: Sistema de átomos interactuantes que muestra un potencial cutoff. Adaptada de Zhiju Zheng (2010).

Nota: La caja punteada muestra una región óptima para testear si un átomo está dentro del cutoff.

El radio es llamado distancia *cutoff* y se emplea generalmente en las simulaciones un valor de cutoff de $2,5 \sigma$ (σ es el parámetro de Lennard-Jones, la distancia a la cual el potencial inter-partícula es cero), este potencial de Lennard-Jones contiene solo la interacción no enlazante. Cuando las interacciones electrostáticas de largo alcance están presentes, el *cutoff* debería ser más grande para reducir los errores. Esta es una manera eficiente para evitar calcular demasiadas distancias mientras se busca los átomos vecinos localizados en la esfera [34].

El procedimiento de la partícula de malla de Ewald (PME) o la suma completa de Ewald es usada para manejar las interacciones electrostáticas de largo alcance sobre condiciones periódicas de contorno, mientras que las de van der Waals son estimadas por el modelo continuo.

El tamaño del tiempo de paso en la dinámica molecular ($t = 1$ fs) es determinada por la rapidez de velocidad local del sistema y se aplica un algoritmo que permite restringir las longitudes de enlace llamado SHAKE, lo que mejora la velocidad de simulación.

Restringiendo el estudio a situaciones de equilibrio, es importante seleccionar las condiciones bajo las cuales se realizará la simulación, lo que nos seleccionará el colectivo de Gibbs que se deberá usar. Por ejemplo, si fijamos el número de partículas N , el volumen V y la energía E , el colectivo adecuado será el microcanónico (NVE), que es el colectivo convencional en dinámica molecular. En otras situaciones, interesará fijar la temperatura

T en vez de energía, por lo que habrá que considerar el colectivo canónico (NVT), que es el caso habitual para el método Monte Carlo. Si estamos interesados en transiciones de fase, es más conveniente usar colectivos generalizados, como el isoterma-isobaro (NPT). La elección del colectivo influye en la caracterización de las fluctuaciones de las magnitudes termodinámicas. Estas son importantes desde un punto de vista práctico ya que permiten calcular funciones respuesta como la capacidad calorífica o el módulo de elasticidad, etc.

4. DESVIACIÓN CUADRÁTICA MEDIA (RMSD)

La desviación de la estructura con respecto a una conformación particular es medida por el RMSD, el RMSD es definida por:

$$\text{RMSD} = \sqrt{\left(\frac{\sum_N (R_i - R_i^0)^2}{N}\right)}$$

Nota: N es el número total de átomos/residuos considerados en el cálculo y R_i es el vector posición de la partícula i en la imagen o en la conformación de referencia (con el 0 en superíndice), calculado después de la alineación de la estructura a la conformación de referencia usando el último encaje cuadrático.

5. MÉTODOS PARA DETERMINAR LA ENERGIA LIBRE DE UNION

Existen muchos métodos computacionales disponibles para determinar el $\Delta G_{\text{unión}}$. Sin embargo, no todos de ellos son aplicables en la práctica en sistemas grandes. Incluso métodos clásicos como perturbación termodinámica (FEP) o integración termodinámica (TI) son extremadamente rigurosos y requieren demasiado poder computacional para ser usado a gran escala [44].

5.1 MÉTODOS MMPBSA (MOLECULAR MECHANICS POISSON-BOLTZMAN SURFACE AREA) Y MMGBSA (MOLECULAR MECHANICS-GENERALIZED BORN SURFACE AREA)

Estos métodos calculan $\Delta G_{\text{bind,solv}}$ por utilizar un ciclo termodinámico descrito en la Figura 10. Todas las contribuciones pueden ser divididas de acuerdo a la siguiente ecuación

$$\Delta G_{\text{unión,solv}} = \Delta G_{\text{unión,vacio}} + \Delta G_{\text{solv,complejo}} - (\Delta G_{\text{solv,ligando}} + \Delta G_{\text{solv,receptor}})$$

El primer término describe la contribución de la mecánica molecular del campo de fuerza; la otra parte de la fórmula depende de la elección del método. En el método MM/PBSA, la ecuación de Poisson para encontrar el potencial electrostático es combinada con la ecuación de Boltzmann para encontrar la distribución de cargas para dar una ecuación linealizada de Poisson-Boltzmann. En el método de MM/GBSA se aplica el modelo generalizado de Born [44].

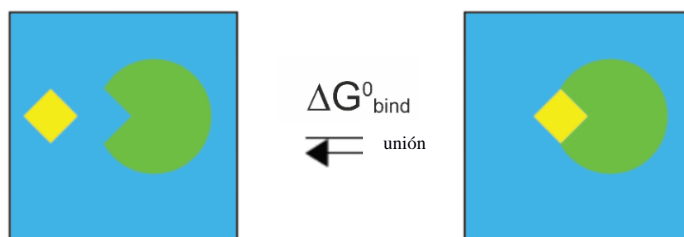


Figura 10: Ilustración del problema de calcular $\Delta G_{unión}^0$. Ross Walker (2006)

Adaptado de Hermansson, A. (2015)

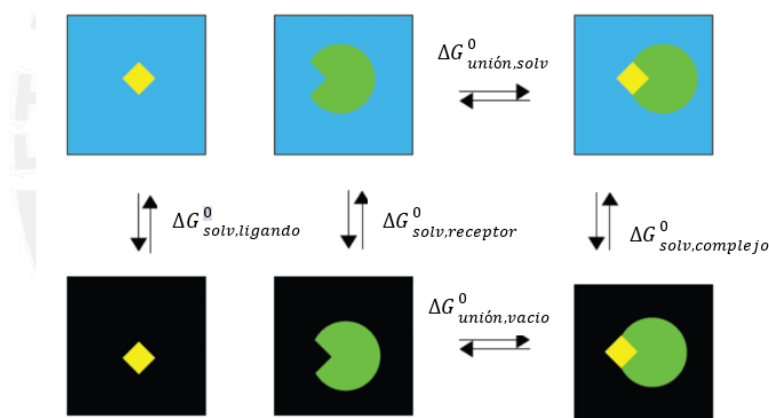


Figura 11: Ciclo termodinámico utilizado en cálculos de MM/PBSA y MM/GBSA.

Ross Walker (2006). Adaptado de Hermansson, A. (2015)

5.2. LA ENERGÍA LIBRE DE SOLVATACIÓN

La energía libre total de solvatación es dada por la siguiente ecuación:

$$G_{sol} = G_{elec} + G_{vdw} + G_{cav}$$

$$G_{cav} + \Delta G_{vdw} = \gamma A + b \quad *$$

Nota: G_{sol} es la energía libre de solvatación, G_{elec} es la energía de la contribución electrostática, G_{vdw} es la energía de la contribución de las fuerzas de van der Waals y G_{cav} es la energía de la cavidad o receptor. * La contribución no-polar es dada por una fórmula empírica, mientras la electrostática es un método independiente [44].

5.3. EL MODELO GENERALIZADO DE BORN

El método analítico generalizado de Born (GB) supone una alternativa para el cálculo del término electrostático de la energía libre de solvatación, debido a su menor coste computacional comparado con Poisson-Boltzman (PB), esta metodología se ha popularizado en dinámica molecular, para el reemplazo del solvente explícito [43].

A cada átomo de la molécula le corresponde una esfera de radio α_i con carga q_i centrada en el núcleo. En el interior del átomo, se asume un material dieléctrico de constante uno. La molécula está envuelta de un solvente de alta permitividad dieléctrica (80 para el agua a 300 K). La energía libre electrostática se determina a partir de la solvatación individual de Born para cada átomo, corregida por la perturbación del resto de átomos, según la ecuación 13.

Ecuación 13: Contribución electrostática según el modelo generalizado de Born

$$\Delta G_{\text{elec}} = -\frac{1}{2} \left(1 - \frac{1}{\epsilon}\right) \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{q_i q_j}{\mathcal{F}_{GB}(r_{ij}, R_i R_j)}$$

Nota: r_{ij} es la distancia entre cargas, y R_i y R_j son los denominados radios de Born (effective Born radii) [43].

5.4 ECUACIÓN DE POISSON-BOLTZMAN

La ecuación de Poisson resuelve el potencial electrostático ($\phi(r)$) generado por una distribución de cargas moleculares ($\rho(r)$) dentro de un medio con una determinada constante dieléctrica ($\epsilon(r)$). Si además se considera la presencia de iones, la distribución de los mismos se incluye en la ecuación de Poisson mediante una distribución de Boltzmann, de donde resulta la ecuación de Poisson-Boltzmann (Ecuación 14) [43].

Ecuación 14: Ecuación de Poisson- Boltzmann

$$\nabla \cdot \epsilon(r) \nabla \phi(r) - k' \phi(r) = -4 \pi \rho(r)$$

La constante dieléctrica es dependiente de la distancia $\epsilon(r)$ y equivale a la del agua en zonas alejadas del soluto y desciende rápidamente con la distancia en las zonas límite soluto-solvente [43].

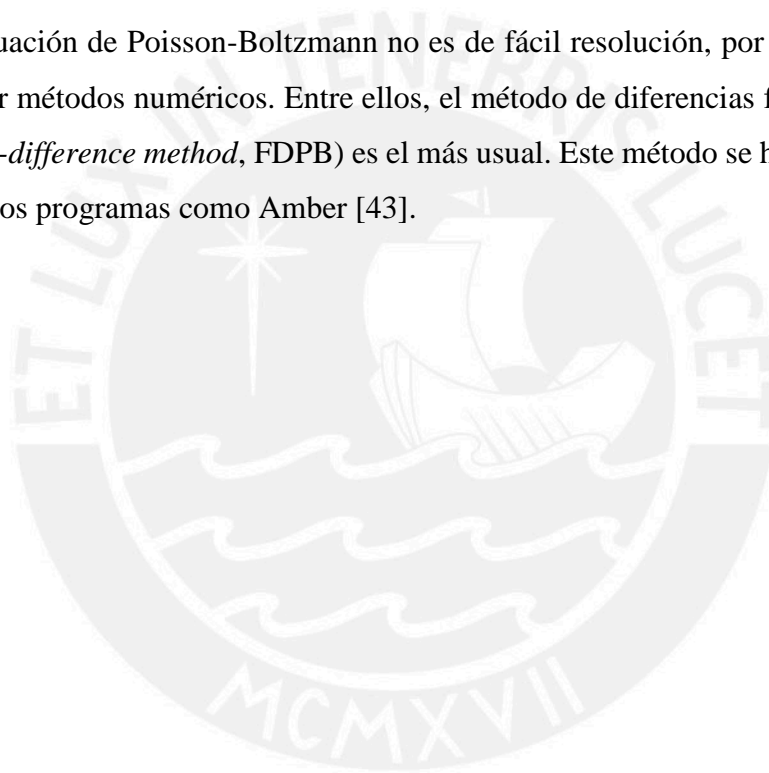
El parámetro (k'), inverso de la longitud de Debye-Hückel, adopta valores de 0,1 Å en condiciones fisiológicas. Una vez que se calcula el potencial $\varphi(r)$, la contribución electrostática a la energía de solvatación viene dada por:

Ecuación 15: Contribución electrostática según el modelo de Poisson- Boltzmann

$$\Delta G_{\text{elec}} = \frac{1}{2} \sum_i q_i (\varphi(r_i)_{\text{solv}} - \varphi(r_i)_{\text{vacío}})$$

Nota: q_i es la carga parcial del átomo en la posición r_i que genera la densidad molecular y $\varphi(r_i)_{\text{vacío}}$ es el potencial electrostático calculado para la misma distribución de cargas pero en ausencia de límites dieléctricos (en vacío, en el que se utiliza una dieléctrica de 1 tanto en la cavidad del soluto como fuera de ella) [43].

La ecuación de Poisson-Boltzmann no es de fácil resolución, por lo que se tiene que aplicar métodos numéricos. Entre ellos, el método de diferencias finitas en una malla (*finite-difference method*, FDPB) es el más usual. Este método se ha implementado en diversos programas como Amber [43].



4. METODOLOGÍA

4.1. PREPARACIÓN DEL COMPLEJO DE FENBENDAZOL: β -CICLODEXTRINA EN MEDIO ÁCIDO POR EL MÉTODO DE COPRECIPITACIÓN.

Se preparó el complejo (fenbendazol: β -ciclodextrina) en proporciones molares 1:1, 1:2 y 1:10. Para el complejo en relación 1:1, se disolvió $1,25 \times 10^{-4}$ mol de fenbendazol (37,42 mg) en 10 mL de etanol/HClcc (99:1) en un matraz volumétrico de 25 mL. De igual forma se disolvió una cantidad equimolar de β -ciclodextrina (141,87 mg) en 20 mL agua/etanol (2:1). Las soluciones se mezclaron de forma que la solución de fenbendazol fue agregada gota a gota a la solución de β -ciclodextrina y dejadas en agitación por 2 horas. Entonces el etanol se removió por medio de una estufa a 60 °C por un promedio de 12 horas. El complejo precipitado se redisolvió en agua y se dejó en agitación por un espacio de 8 horas, la suspensión resultante se filtró obteniendo el producto final. En la última etapa la solución se transfirió para un tubo tipo “falcon”, posteriormente se congeló sobre nitrógeno líquido y se liofilizó por 3 días, se obtuvo el complejo fenbendazol: β -ciclodextrina como un sólido fino y seco.

Después del secado, los complejos fueron pulverizados en un mortero de porcelana con ayuda de un pilón. Los productos fueron acondicionados en viales y almacenados en deseador de vidrio.

Nota: Debido al límite de solubilidad de β -ciclodextrina de 1,85 g/100 mL en agua, se consideró la relación 1:10 ($2,5 \times 10^{-6}$ M: $2,5 \times 10^{-5}$ M)

4.2. PREPARACIÓN DEL COMPLEJO DE FENBENDAZOL: β -CICLODEXTRINA EN MEDIO NEUTRO POR EL MÉTODO DE COPRECIPITACIÓN.

Se preparó el complejo (fenbendazol: β -ciclodextrina) en proporciones 1:1, 1:2 y 1:10. Para el complejo en relación 1:1, se disolvió $1,25 \times 10^{-4}$ moles de fenbendazol (37,42 mg) y una cantidad equimolar de β -ciclodextrina (141,87 mg) en 18 mL de agua. La mezcla fue agitada por 48 horas. Luego se procedió a filtrar y así obtener el producto final. En la última etapa la solución fue transferida a un tubo tipo “falcon”, posteriormente fue congelada sobre nitrógeno líquido y liofilizada por 3 días, se obtuvo el complejo fenbendazol: β -ciclodextrina como un sólido fino y seco.

Después del secado, los complejos fueron pulverizados en un mortero de porcelana con ayuda de un pilón. Los productos fueron acondicionados en viales y almacenados en deseador de vidrio.

4.3. PREPARACIÓN DE UNA MEZCLA FÍSICA DE FENBENDAZOL: β -CICLODEXTRINA

Se procedió a realizar una mezcla física por la cual se tomó fenbendazol y β -ciclodextrina en un mortero y se realizó una homogenización simple. Esta mezcla sirvió como punto de referencia para evidenciar si existe el proceso de inclusión en los métodos ensayados.

4.4. CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO FENBENDAZOL: β -CICLODEXTRINA EN SOLUCIÓN POR MEDIO DE LA ESPECTROSCOPIA DE UV/VIS

4.4.1. DIAGRAMA DE SOLUBILIDAD DEL COMPLEJO FENBENDAZOL: β -CICLODEXTRINA SEGÚN EL MODELO DE HIGUCHI-CONNORS

El diagrama de solubilidad es construido conforme a la metodología desarrollada por Higuchi y Connors, se prepararon soluciones saturadas de fenbendazol con soluciones acuosas de β -ciclodextrina a diferentes concentraciones (0; 1; 3; 5; 7; 10; 12 y 15 mM), para ello se adicionó 7 mg del fármaco a 10 mL de las respectivas soluciones de β -ciclodextrina. En seguida los viales fueron dejados en agitación magnética a 600 rpm con 10 Watt de potencia a temperatura de laboratorio por 48 h, hasta el equilibrio de solubilidad del fenbendazol. Después se retiró la agitación y se dejó reposar por un periodo de 1 h. Las respectivas soluciones fueron filtradas utilizando una jeringa acoplada de unidad filtrante millipore 0,45 μ m de diámetro, poro medio, para después cuantificar el fenbendazol por espectroscopia de UV/Vis.

Los espectros fueron obtenidos en el espectrofotómetro UV/Vis Agilent 8453 empleando una longitud de onda de 297 nm. El experimento se desarrolló por triplicado.

4.4.2. DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE ASOCIACIÓN DEL COMPLEJO

Se prepararon soluciones acuosas de β -ciclodextrina, para ello se partió de una solución madre de 100 mM y se realizaron diluciones para obtener concentraciones de β -ciclodextrina de 0; 1; 2; 3; 5; 7; 10 y 12 mM para un volumen de 18 mL. A estas soluciones fueron adicionadas 20 μ L de solución patrón de fenbendazol (48,63 mM en dimetilsulfóxido), llegando al volumen final de 18,02 mL, resultando en soluciones de fenbendazol de $5,4 \times 10^{-5}$ mol/L. Se dejó en agitación magnética a 700 rpm con 10 Watt de potencia por 24 horas. Después se retiró la agitación y se dejó reposar por un periodo de una hora. Las respectivas soluciones fueron filtradas utilizando una jeringa acoplada de unidad filtrante millipore 0,45 μ m de diámetro, poro medio, para después cuantificar el fenbendazol por espectroscopia de UV/Vis.

Los espectros fueron obtenidos en el espectrofotómetro UV/Vis Agilent 8453 (Figura 12) empleando una longitud de onda de 297 nm. El experimento se desarrolló por triplicado.



Figura 12: Espectrofotómetro UV/Vis 8453 de Agilent.

4.5. CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

Las lecturas de las muestras fueron realizadas en el espectrofotómetro, modelo Frontier FT/NIR Perkin – Elmer (Figura 13). El rango espectral que se utilizó fue de 650 cm^{-1} a 4000 cm^{-1}



Figura 13: Espectrofotómetro FT/NIR de Perkin-Elmer

4.6. CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO POR CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO

Los estudios termoanalíticos fueron realizados en el Instituto de Química-Física Rocasolano-Madrid y en el Laboratorio de Materiales de la Pontificia Universidad Católica del Perú, se utilizó el equipo de calorimetría diferencial de barrido (DSC), modelo Pyris 1 de Perkin Elmer y NETZSCH STA 449 F3 Jupiter (Figura 14).

Los estudios del comportamiento térmico fueron realizados, a partir de la célula calorimétrica con una razón de calentamiento de 10 °C/min .



Figura 14: Calorímetro diferencial de barrido NETZSCH STA 449 F3 Jupiter.

4.7. ESTUDIO TEÓRICO DEL COMPLEJO DE FENBENDAZOL: β -CICLODEXTRINA POR MÉTODOS CUÁNTICOS

La geometría inicial de β -ciclodextrina fue adquirida de Protein Data Base y del fármaco fenbendazol de Pubchem Database. Las estructuras fueron optimizadas previamente con el semiempírico PM6, para después construir manualmente los complejos en Gaussian View 5.0.

Los oxígenos glicosídicos de la β -ciclodextrina fueron posicionados en el plano XY y se localizó su centro con un *dummy atom* entre ellos para definir el centro del sistema de coordinación. La molécula de fenbendazol se posicionó en el plano Z y se hizo pasar a través de la cavidad de la β -ciclodextrina de -5 Å a 9 Å con un tamaño de paso de 1 Å, generándose múltiples confórmeros de partida derivadas a partir de dos orientaciones posibles (Ver Figura 15). Estos cálculos se realizaron a un nivel PM6 de partida y luego con DFT B3LYP/6-31G en fase gaseosa.

Además se consideró aplicar cálculos *single point* con el funcional DFT-D3 B3LYP/6-31G (d,p) y con el funcional de Truhlar M05-2x; los cuales consideran fuerzas de dispersión. Para el efecto del solvente se consideró un modelo continuo polarizable (PCM) Las simulaciones fueron realizadas con el paquete de Gaussian 09 Versión D01 del instituto de Química-Física Rocasolano - Madrid [49].

4.8. ESTUDIO TEÓRICO DEL COMPLEJO DE FENBENDAZOL: β -CICLODEXTRINA A TRAVÉS DE CÁLCULOS DE MECÁNICA MOLECULAR

La geometría de partida para la β -ciclodextrina fue construida con el programa *xleap* del paquete de modelamiento AmberTools 15. Los fragmentos de β -ciclodextrina fueron tomados de la base de datos R.E.DD.B (<http://q4md-forcefieldtools.org/REDDB>). Asimismo, los parámetros del campo de fuerza q4md-CD fueron aplicados para la β -ciclodextrina. Este campo de fuerza es una combinación de GLYCAM04 y AMBER99SB, el cual ha sido reportado con buenos resultados al usar AMBER 10. La geometría para la molécula de fenbendazol fue tomada de Pubchem Database, la cual fue optimizada con un nivel de teoría de HF/6-31G** con el paquete de Gaussian 09 Rev. D.01, también se calcularon las cargas parciales con el modelo RESP (Potencial electrostático restringido) con este programa, y junto con la herramienta *antechamber* del paquete Ambertools 15 se parametrizó la molécula de fenbendazol con el campo de fuerza GAFF (Campo de fuerza Generalizado de Amber)[46].

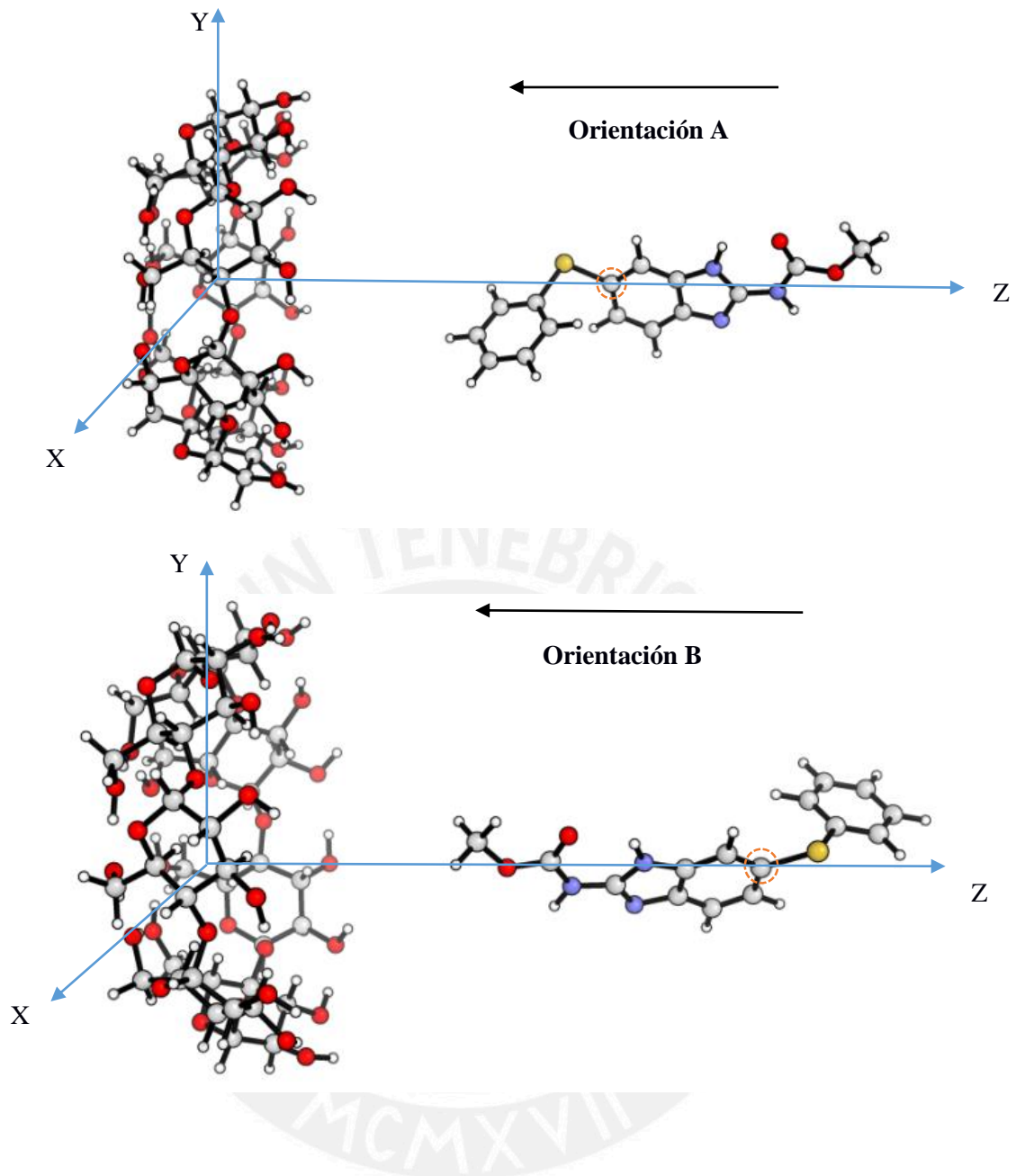


Figura 15: Sistema de coordenadas que describe el proceso de inclusión de la β -ciclodextrina y fenbendazol.

Nota: El átomo marcado con líneas punteadas es usado para expresar el átomo de referencia que ingresara a la cavidad de la β -ciclodextrina en pasos de tamaño de un 1Å.

Las simulaciones de dinámica molecular se desarrollaron con el módulo *Sander* de AmberTools 15. Se tomó las dos orientaciones mencionadas anteriormente para predecir el modo de inclusión y generar los conformeros. Los sistemas fueron solvatados en una caja cúbica con una distancia *buffer* de 12,0 Å (distancia entre los bordes de la caja y la molécula de interés). El parámetro utilizado para el agua es un modelo explícito TIP3P.

La preequilibración de los sistemas consistió en las siguientes etapas:

1. Minimización del soluto utilizando 1000 pasos del algoritmo de minimización de Dirección de Máximo Gradiente (*Steepest Descent*) y 500 pasos del algoritmo de Minimización Gradiente Conjugado (*Conjugate Gradients*), esto mantuvo el soluto fijo con una constante de fuerza de $500 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$.
2. Minimización de todo el sistema utilizando 2500 pasos del algoritmo de minimización de Dirección de máximo gradiente (*Steepest Descent*) y 1500 pasos del algoritmo de minimización Gradiente Conjugado (*Conjugate Gradients*).
3. Simulación de 10 ps en un ensamble NVT, con una rampa de temperatura desde 0 hasta 300 K, y se tuvo el soluto fijo con una constante de fuerza de $25 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$.
4. Simulación de 50 ps en un ensamble NPT para cinco subpasos, en cada uno de ellos se liberó gradualmente la restricción de la constante de fuerza de $25 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ hasta dejar el sistema relajado.

Una vez que se tiene preequilibrado el sistema, se procede a equilibrar para que los parámetros de densidad, presión y temperatura se encuentren estables y constantes para la producción de la dinámica.

5. Simulación de 25 ps de un ensamble NPT y NVT sin restricción del soluto.
6. Finalmente, una simulación de 50 ps de un ensamble NVE sin restricción del soluto [35].

Cuando el sistema estaba equilibrado, se procedió a realizar la producción de la dinámica molecular, por el cual se realizó 20 simulaciones de 1ns cada una por cada confórmero. Estos cálculos fueron realizados en el Sistema de súper cómputo Legión de la Dirección de Informática Académica (DIA) de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

5. PLAN DE ANÁLISIS DE DATOS

5.1. DETERMINACIÓN DE LA ESTEQUIOMETRÍA Y LA CONSTANTE DE ASOCIACIÓN DEL COMPLEJO DE INCLUSIÓN

La constante de asociación y estequiometría del complejo de inclusión entre fenbendazol y β -ciclodextrina es obtenido a partir de la Ecuación de Benesi-Hildebrand, los valores obtenidos de absorbancia fueron usados en las siguientes ecuaciones que describen los modelos estequiométricos 1:1 y 1:2 respectivamente (Ecuación 6 y 7)

$$\frac{1}{A - A_0} = \frac{1}{A' - A_0} + \frac{1}{K(A' - A_0)(CD)}$$

$$\frac{1}{A - A_0} = \frac{1}{A' - A_0} + \frac{1}{K(A' - A_0)(CD^2)}$$

En las ecuaciones mostradas, A_0 es la intensidad de absorción de la molécula huésped en ausencia de β -ciclodextrina, A es la absorbancia con una particular concentración de β -ciclodextrina, A' es la absorbancia al máximo de concentración de β -ciclodextrina usada y K es la constante de asociación. La linealidad es obtenida al graficar $1/A - A_0$ versus $1/CD$ para los complejos 1:1 y la gráfica de $1/A - A_0$ versus $1/CD^2$ para los complejos 1:2. La constante de asociación es calculada de la pendiente de la Ecuación de Benesi-Hildebrand [22][23][24].

Ecuación 16: Determinación de la constante de asociación para el modelo estequiométrico 1:1 y 1:2 según Benesi-Hildebrand

$$k = \frac{1}{\text{Pendiente}(A' - A_0)}$$

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. DIAGRAMA DE SOLUBILIDAD DE FASE

El diagrama de solubilidad de fase del fenbendazol en función de la concentración de β -ciclodextrina a temperatura ambiente es mostrado en la Figura 16 y 17. La solubilidad del fenbendazol aumenta con el incremento de la concentración de ciclodextrina indicando en una primera aproximación de que se trata de un diagrama de tipo A_L , el cual es característico de los complejos con una estequiometría 1:1 (fenbendazol: β -ciclodextrina). La constante aparente de estabilidad (K_s) del complejo fue calculado del *slope* y el intercepto del diagrama de solubilidad de fase de acuerdo a un rearrreglo de la Ecuación 2 (descrito en el apartado 3.4)

$$K_s = \frac{\text{slope}}{S_0(1 - \text{slope})}$$

Nota: S_0 es la solubilidad intrínseca del fármaco en ausencia de ciclodextrina, la cual estaría representado por el intercepto de la regresión lineal.

Diagrama de solubilidad de fase de fenbendazol con β -ciclodextrina en medio acuoso

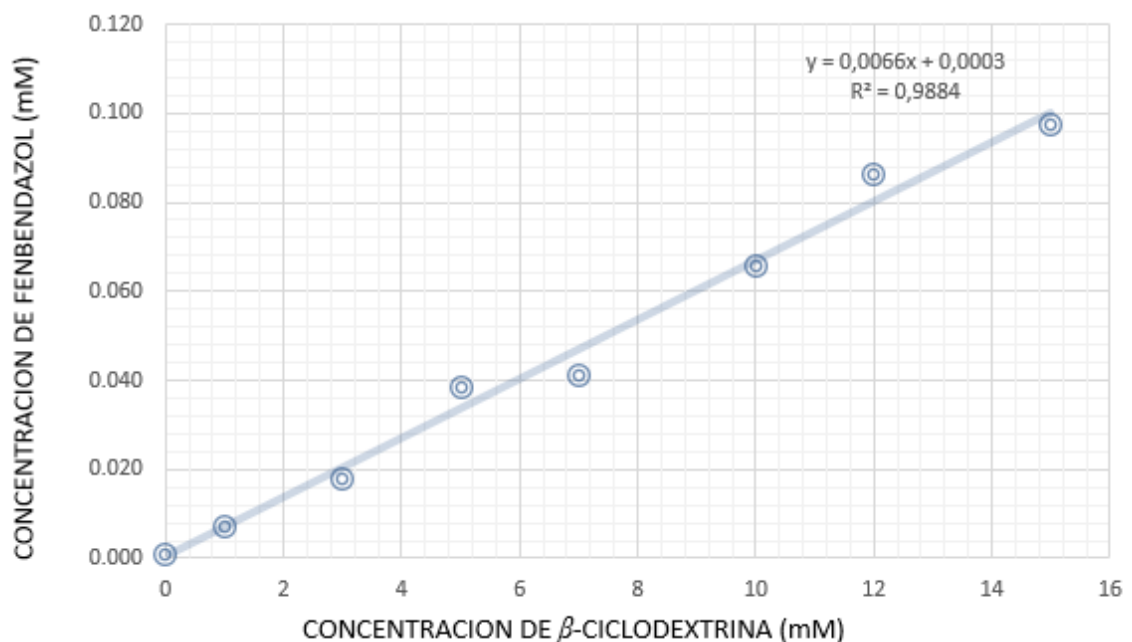


Figura 16: Diagrama de solubilidad del fenbendazol en presencia de β -ciclodextrina

La K_s del complejo fenbendazol: β -ciclodextrina fue calculado a ser $1,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Esta constante aparente de solubilidad está relacionada con la constante de asociación microscópica y la constante de asociación propia (*self-association*). Es decir que esta constante se encuentra enmascarada por efectos de autoagregación de la ciclodextrina con otras ciclodextrinas, e incluso es probable que exista un comportamiento micelar por el cual el fármaco es rodeado por moléculas de ciclodextrinas aumentando de esta manera la solubilidad [36].

De acuerdo a las observaciones de Loftson *et al.* (2005), sobre el diagrama de fases de Higuchi, establecen que su confiabilidad se ve limitada para drogas o fármacos que poseen una solubilidad intrínseca menor a 1 mg/mL, permitiendo considerar este diagrama solo como un estimativo de la estequiometría [22].

Con lo anteriormente considerado, se tiene que el fenbendazol es un fármaco pobremente soluble, que de acuerdo a la *Food Drug Administration* (FDA) tiene una solubilidad de 40 $\mu\text{g/L}$, y que el diagrama de tipo A_L obtenido solo sería un estimativo de la estequiometría al igual que la constante calculada. De acuerdo con la Figura 17, se puede observar el espectro UV/Vis de la interacción del fenbendazol y β -ciclodextrina, no se evidencia un cambio significativo del espectro en relación a un desplazamiento de la longitud de onda de máxima absorción, la cual se desplazó un nanómetro. Se observó que a medida que aumenta la concentración de β -ciclodextrina, la concentración de fenbendazol disuelto también aumentaba, lo que puede indicar que existe un proceso de inclusión o no-inclusión que permite aumentar la solubilidad del fenbendazol.

Un método más confiable de evaluación de las ciclodextrinas, que no involucren la variable de la solubilidad intrínseca, es la eficiencia de complejación (CE), el cual es igual a la fracción molar del complejo y la concentración libre de ciclodextrina y se halla de la pendiente del diagrama de solubilidad con la siguiente ecuación [22].

$$CE = \frac{\text{Pendiente}}{1 - \text{pendiente}}$$

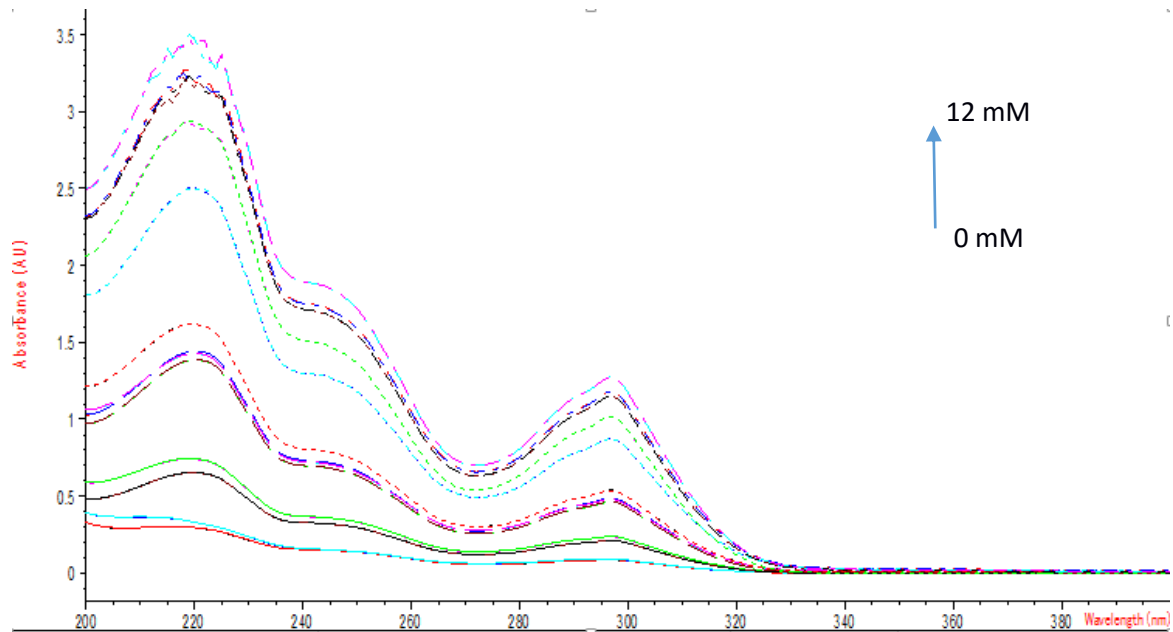


Figura 17: Espectro UV/Vis del complejo fenbendazol y β -ciclodextrina a concentración de 0 mM a 12 mM de β -ciclodextrina

Nota: Cada línea punteada pertenece a una concentración de β -ciclodextrina.

De esta ecuación se deduce que el valor de la CE es de 0,0066. Esta variable puede ser usada para calcular la proporción fenbendazol: β -ciclodextrina que corresponda a incrementar las concentraciones adecuadas a usar durante una formulación.

Ecuación 17: Relación molar para fenbendazol: β -ciclodextrina con la eficiencia de complejación

$$\text{Fenbendazol}:\beta\text{-ciclodextrina} = 1 : \left(1 + \frac{1}{CE}\right)$$

Se encuentra que la relación molar necesaria (MR) es de 1:152. Este valor bajo para CE es propio de fármacos con muy poca solubilidad. Entre otros ejemplos con baja eficiencia de complejación y una alta relación molar se tiene la ciclosporina A con una CE de 0,007 y 1:150 de MR, flunitrazepan con una CE de 0,006 y 1:170 de MR, omeprazol con una CE de 0,002 y 1:500 de MR, retinol con una CE de 0.007 y 1:150 de MR y tamoxifeno con una CE de 0,004 y 1:250 de MR de acuerdo a Loftsson *et al* (2007) [37].

6.2.DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE ASOCIACIÓN POR EL MÉTODO DE BENESI-HILDEBRAND

Para estimar la constante de asociación y estequiometría del complejo entre fenbendazol y β -ciclodextrina, se usó el análisis del test de Benesi-Hildebrand, asumiendo una concentración fija del fármaco y con adiciones sucesivas de la ciclodextrina y la condición experimental de que la concentración de ciclodextrina sea mayor a la del fármaco de tal manera de trabajar a concentraciones diluidas para evitar la influencia de formación de agregados moleculares y cuantificar exclusivamente la afinidad del fármaco por la ciclodextrina. Esta afinidad se cuantificó mediante el cambio de absorbancia según se muestra en la Figura 17.

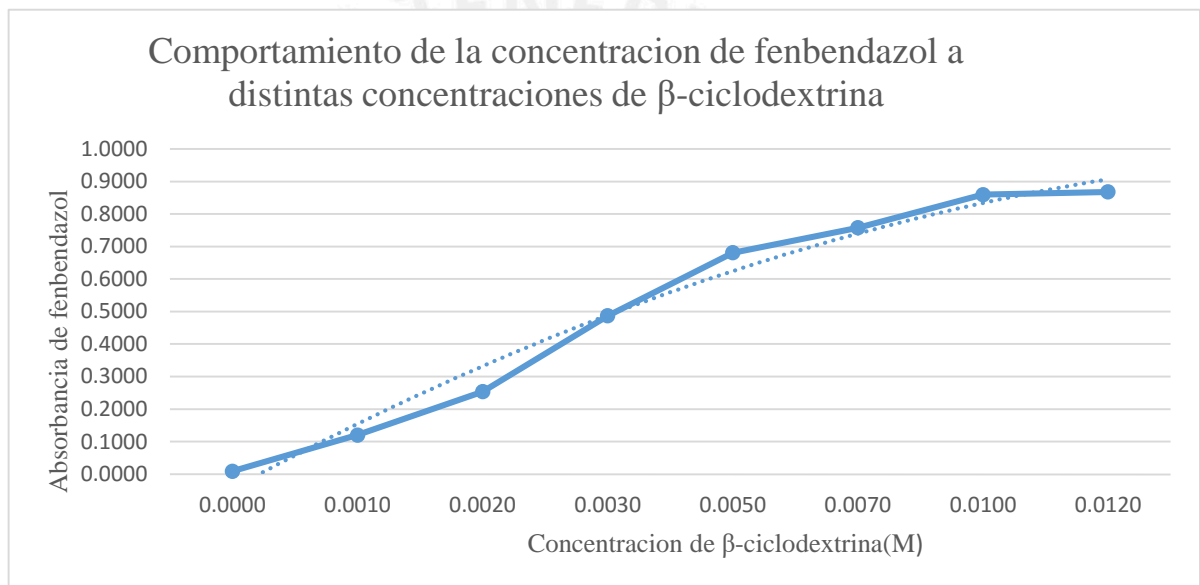


Figura 18: Comportamiento del fenbendazol a distintas concentraciones de β -ciclodextrina

El comportamiento que se muestra en la Figura 18 no es similar a un comportamiento dado según el diagrama de solubilidad de Higuchi, el cual se estimó de ser del tipo A_L para una estequiometría 1:1; por el contrario, esto evidencia que el comportamiento real puede encajar en una gráfica del tipo B, que refleja una estequiometría de grado superior. Este resultado está acorde de acuerdo con las investigaciones de Jang-Ha et al (2013)[38]. Las constantes de asociación calculadas con el método de Benesi-Hildebrand son de $10,9 \text{ M}^{-1}$ y $1,78 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ para una estequiometría 1:1 y 1:2, respectivamente. La gráfica de $(\Delta A)^{-1}$ vs $1/\beta$ -ciclodextrina para una estequiometría 1:1 (fenbendazol: β -ciclodextrina) se muestra en la Figura 19 y en la Figura 20 la estequiometría 1:2 (fenbendazol: β -

ciclodextrina). Aquí se puede observar que las dos estequiometrías se ven favorecidas por el coeficiente de correlación al ser similares, pero es importante resaltar que la estequiometría 1:2 presenta una constante de asociación relativamente grande evidenciando que el desplazamiento del equilibrio estaría dado para la constante $K_{1:2}$. Sin embargo, la constante de asociación suele ser sobrestimada por las múltiples asunciones de la ecuación de Benesi-Hildebrand. Un ejemplo de ellos es el tiempo por el cual alcanza el equilibrio afectaría en un incremento o disminución de la pendiente en la ecuación (Loftsson, T et al (2003)(2005)) [20][22][37].

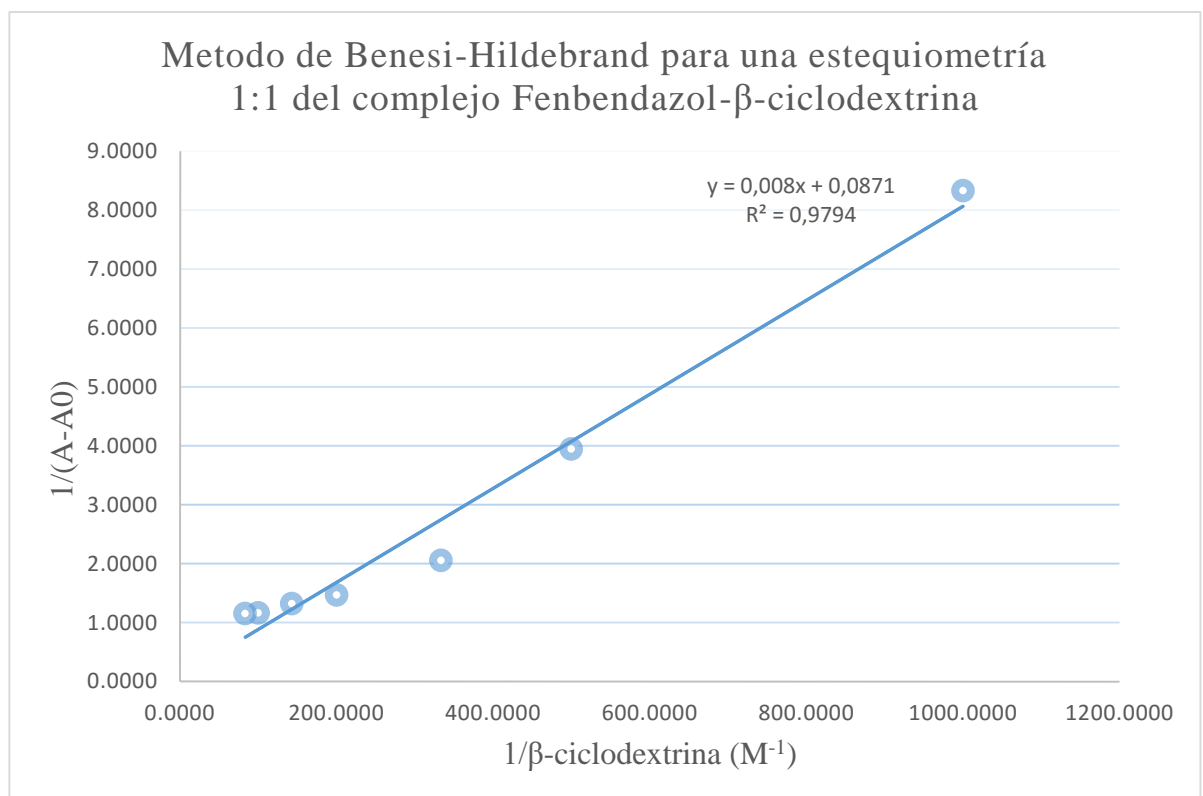


Figura 19: Método de Benesi-Hildebrand para una estequiometría 1:1 del complejo fenbendazol y β -ciclodextrina.

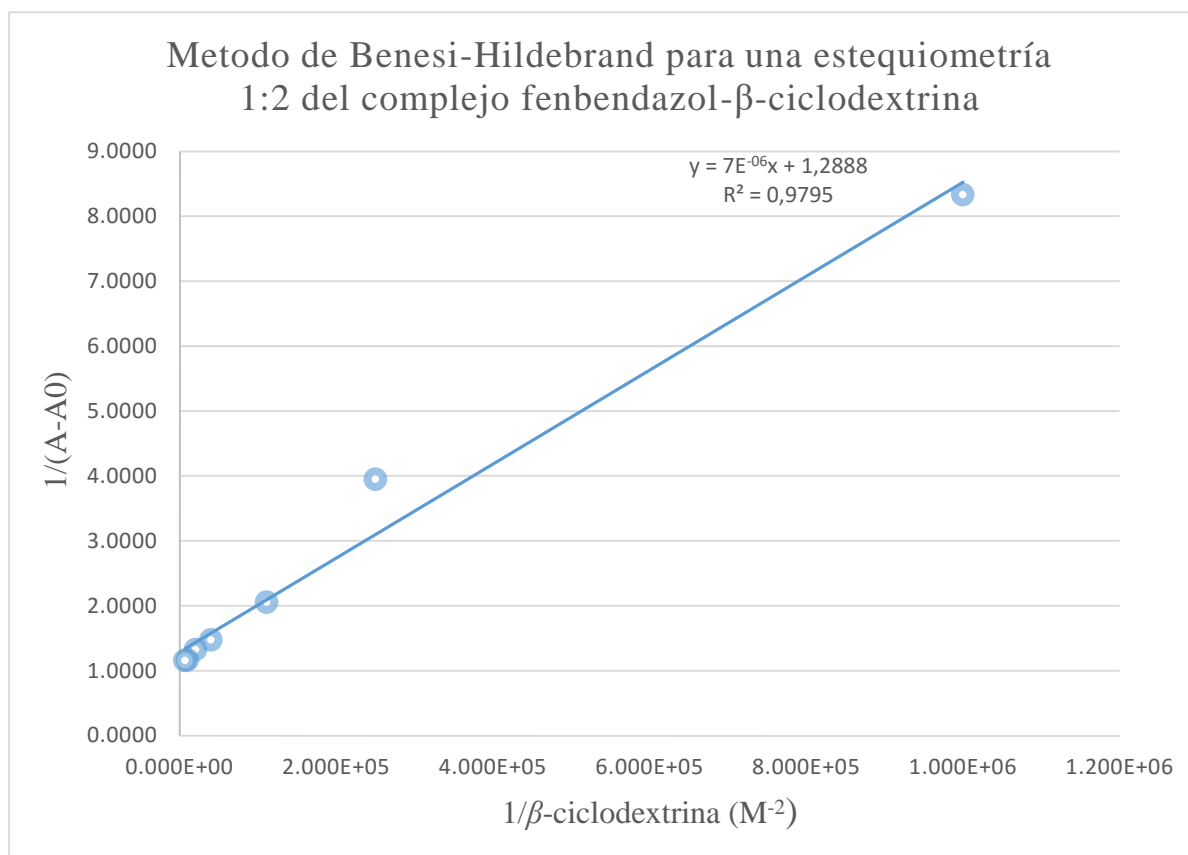


Figura 20: Método de Benesi-Hildebrand para una estequiometría 1:2 del complejo fenbendazol y β -ciclodextrina.

6.3. SÍNTESIS DE LOS COMPLEJOS EN MEDIO ACUOSO

Los compuestos sintetizados en medio acuoso por el método de coprecipitación permitieron obtener un aumento de la solubilidad en un rango de 5-9 veces la solubilidad intrínseca del fenbendazol en medio acuoso, esto representa un aumento desde 0,28 $\mu\text{g/L}$ hasta 1,6-2,5 $\mu\text{g/L}$ (Tabla 4).

No obstante, se hubiera esperado un aumento de la solubilidad conforme aumenta la relación molar de ciclodextrina, tal y como se observó en los diagramas de solubilidad, este puede deberse a dos hechos reportados por otros autores [45] como es el tiempo necesario para que el complejo formando alcance el equilibrio y la tecnología usada para la preparación del complejo.

Tabla 4: Concentración obtenida de fenbendazol en los complejos sintetizados

SUSTANCIAS ANALIZADAS	ABSORBANCIA	mg/ml DEL COMPLEJO	CONCENTRACIÓN DE FENBENDAZOL (µg/mL)
Fenbendazol en agua	0,0089	n.a	0,20
Complejo en relación molar 1:1 agua	0,1071	1,457	2,47
Complejo en relación molar 1:2 agua	0,0673	0,900	1,55
Complejo en relación molar 1:10 agua	0,0891	1,400	2,06

6.4. ESPECTROSCOPIA FT-IR DE LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS

En las próximas figuras se muestran el espectro FT-IR de (a) β -ciclodextrina, (b) fenbendazol, (c) mezcla binaria, (d) complejo fenbendazol: β -ciclodextrina en relación molar 1:1 en agua, (e) complejo fenbendazol: β -ciclodextrina en relación molar 1:2 en agua, (f) complejo fenbendazol: β -ciclodextrina en relación molar 1:10 en agua, (g) complejo fenbendazol: β -ciclodextrina en relación molar 1:2 en HCl/etanol (1 %), (h) complejo fenbendazol: β -ciclodextrina en relación molar 1:10 en HCl/etanol (1 %).

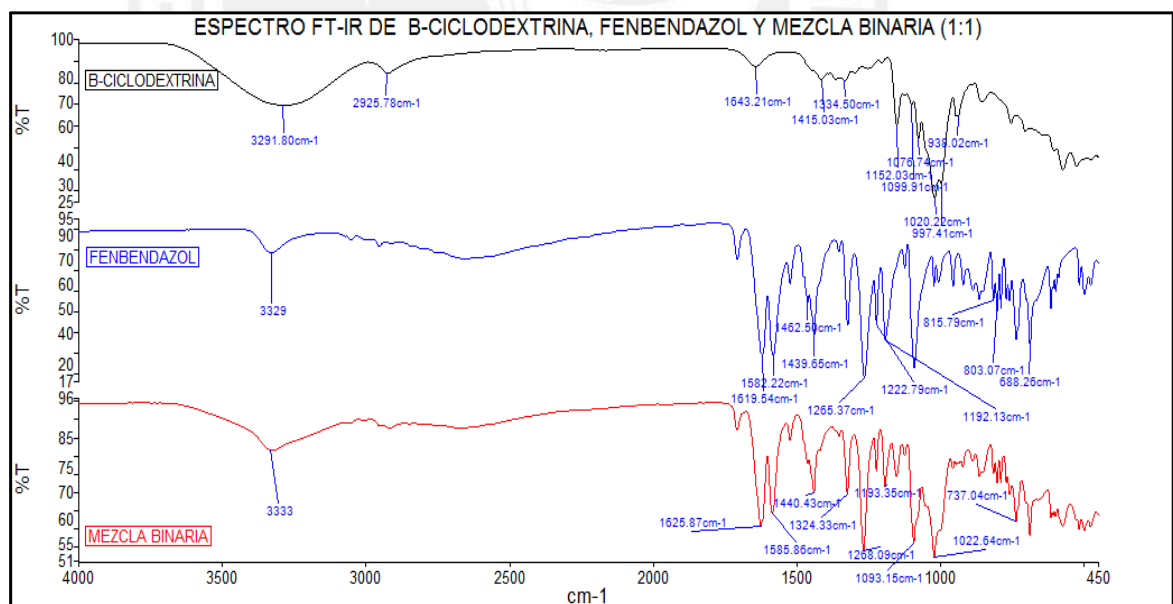


Figura 21: Espectro FT-IR de (a) β -ciclodextrina, (b) fenbendazol y (c) mezcla binaria.

Las frecuencias más características correspondientes a la β -ciclodextrina son observadas a 3291.80 cm^{-1} , 2925.78 cm^{-1} , 1152.03 cm^{-1} , 1020.22 cm^{-1} , los cuales corresponden al estiramiento simétrico y asimétrico de ν [OH], ν [CH₂], estiramiento

[C=O] y a la vibración del enlace [O-C-H], respectivamente. Mientras que las frecuencias características de fenbendazol son observadas a 3327.57 cm^{-1} , 2954.5 cm^{-1} , $1619.54\text{-}1582.22\text{ cm}^{-1}$, 1439.65 cm^{-1} y 1091.89 cm^{-1} y representan las señales del estiramiento N-H del grupo amida, el estiramiento característico [C-H], el enlace [C=O] de la porción del grupo carbamato, estiramiento del doble enlace [C=C] de la parte aromática y el estiramiento del enlace [S-C], respectivamente.

En los espectros FT-IR de la Figura 21 se observa particularmente las señales correspondientes a β -ciclodextrina y fenbendazol y que la mezcla binaria preparada por una simple mezcla de ambas materias primas es la superposición de ambos espectros.

En la Figura 22 se compara los espectros de fenbendazol y β -ciclodextrina con el complejo fenbendazol: β -ciclodextrina en relación molar 1:1 sintetizado en medio acuoso, que resulta en un espectro del complejo muy similar a la de β -ciclodextrina.

Este hecho lo corroboran muchas investigaciones donde afirman que es frecuente observar la desaparición o desplazamiento de las señales en los espectros FT-IR de los complejos de ciclodextrina-huésped. No obstante, este hecho también puede deberse a que la cantidad del fármaco incluido es demasiado baja.

Ante esta problemática, el uso de cálculos teóricos puede ayudar a demostrar la desaparición de estas señales. Sin embargo, son muy pocas las investigaciones realizadas en este tópico, pero se menciona el trabajo de Oliveira *et al*, en el cual concluyen que la desaparición de señales como las de carbonilo podría deberse a la interacción de este con grupos hidroxilo de la β -ciclodextrina. [39].

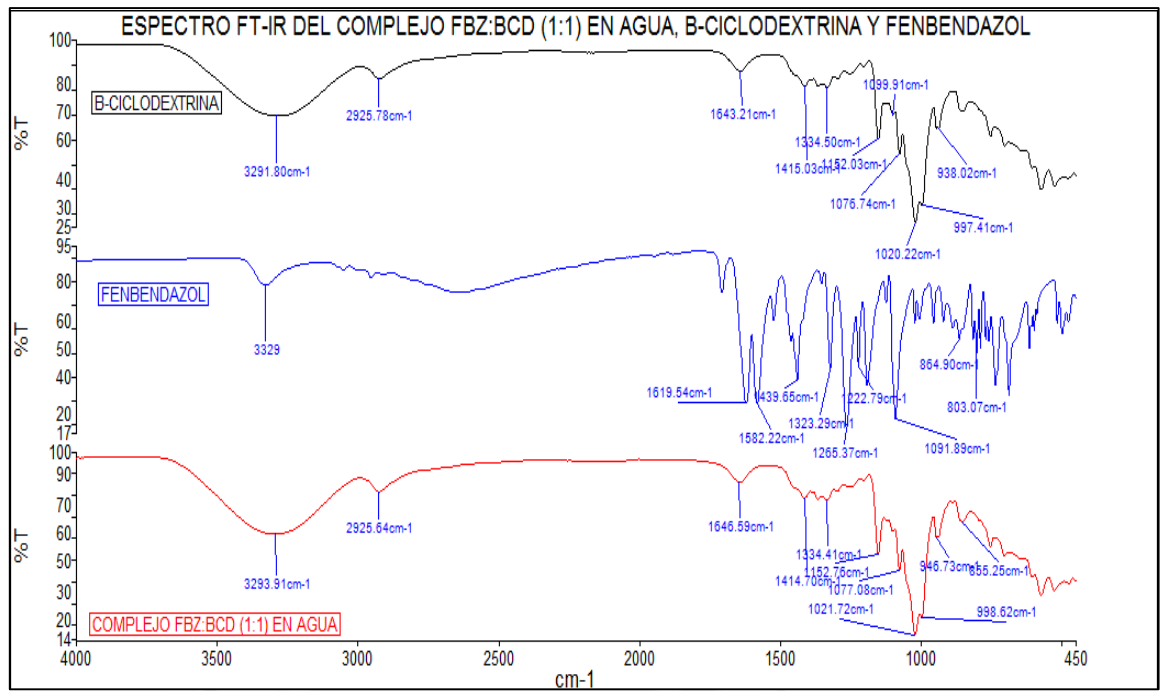


Figura 22: Espectro FT-IR de (a) β -ciclodextrina, (b) fenbendazol, (d) complejo fenbendazol: β -ciclodextrina en relación molar 1:1 en agua.

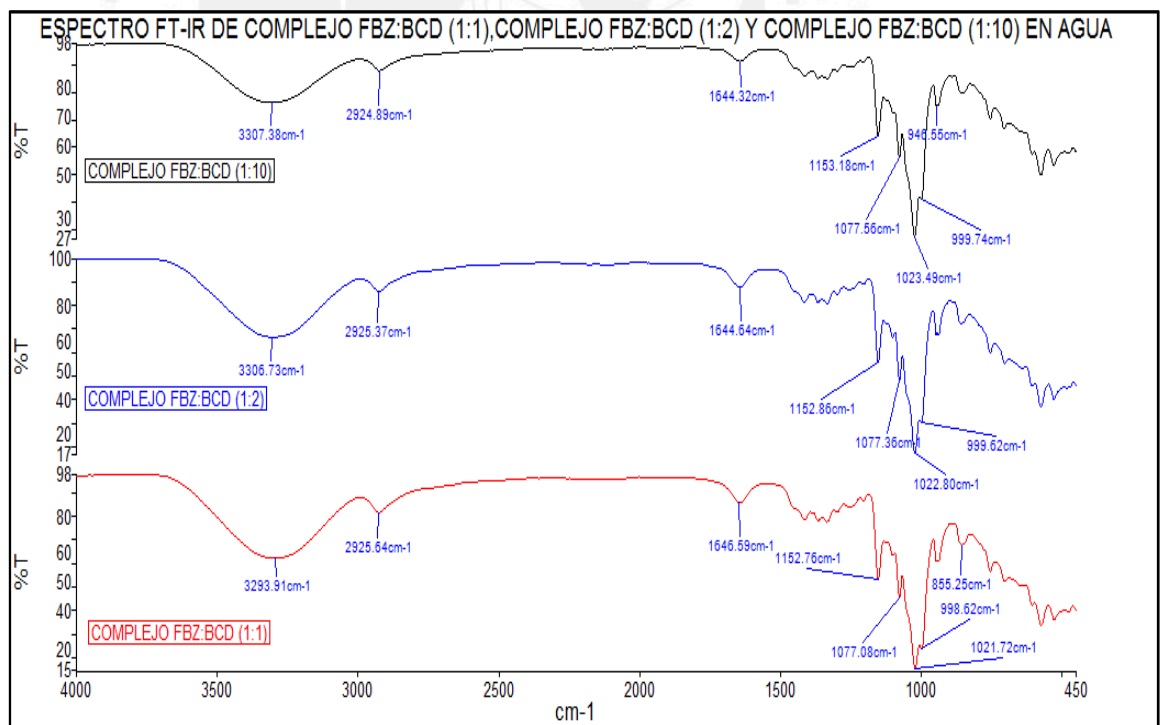


Figura 23: El espectro FT-IR de (d) complejo fenbendazol: β -ciclodextrina en relación molar 1:1 en agua, (e) complejo fenbendazol: β -ciclodextrina en relación molar 1:2 en agua, (f) complejo fenbendazol: β -ciclodextrina en relación molar 1:10 en agua.

En las Figura 23 y 24 se observa la comparación de los cinco complejos sintetizados en agua en relación molar 1:1; 1:2 y 1:10, y en medio ácido en relación molar 1:2 y 1:10, con el fin de observar variaciones en sus desplazamientos, lo que se detalla en la Tabla 5.

Estos desplazamientos son más notorios para el estiramiento del [O-H] a $3291,8\text{ cm}^{-1}$. Para los complejos en medio acuoso, se evidencia una disminución de la frecuencia, mientras que, para los complejos en medio ácido, un aumento de estos. Esta diferencia se debe precisamente a la presencia de más interacciones de puente de hidrógeno. Este comportamiento es también observado para las señales a $1152,03\text{ cm}^{-1}$, $1076,74\text{ cm}^{-1}$ y $1020,22\text{ cm}^{-1}$ (mostrados en la Tabla 5) pero en menor intensidad. Estas evidencias sugieren una mejor inclusión del fármaco al interactuar con una mayor cantidad de ciclodextrina. Este tipo de desplazamiento de las señales de la β -ciclodextrina es observado en trabajos de Mohan *et al* [40].

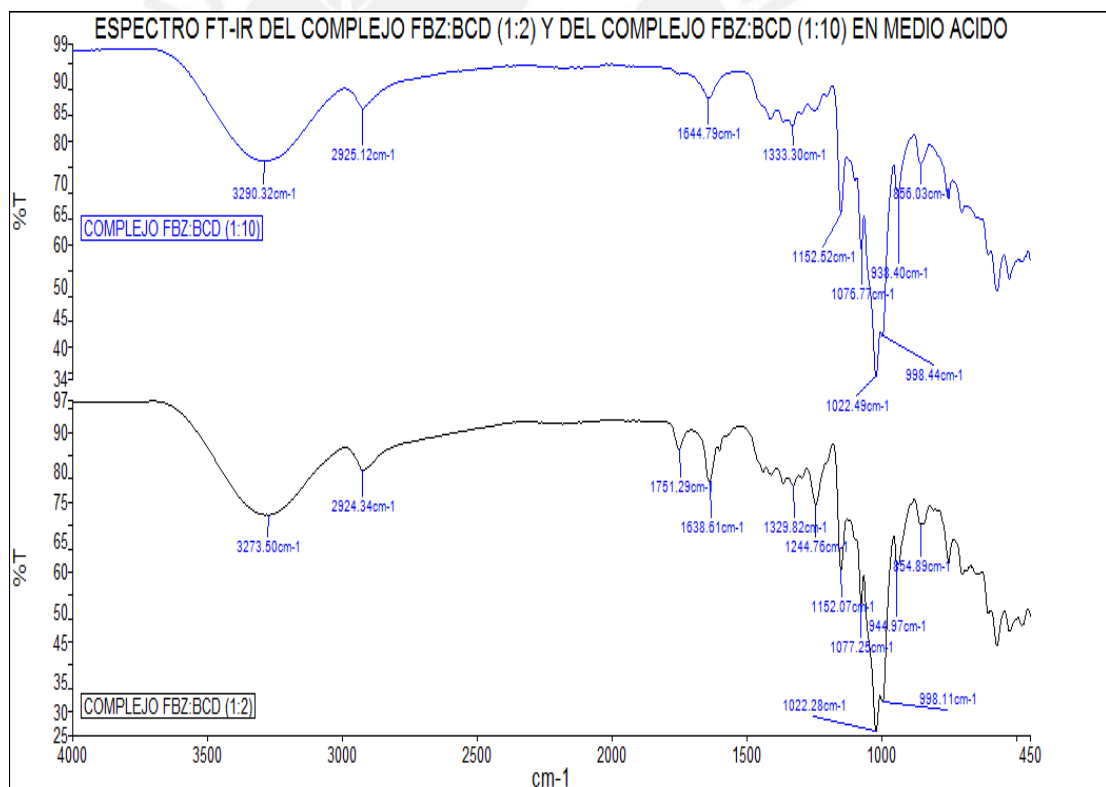


Figura 24: El espectro FT-IR de (g) complejo fenbendazol: β -ciclodextrina en relación molar 1:2 en HCl/etanol (1 %), (h) complejo fenbendazol: β -ciclodextrina en relación molar 1:10 en HCl/etanol (1 %).

Tabla 5: Distribución de frecuencias características de β -ciclodextrina y los complejos sintetizados.

Grupo Funcional	BCD	Longitud de onda (cm ⁻¹)					Desplazamiento $\Delta\delta$				
		Complejo de inclusión					(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
		(a)	(b)	(c)	(d)	(e)					
$\nu[\text{OH}]^a$	3291,8	3293,91	3306,73	3307,38	3273,5	3290,37	2,11	14,93	15,58	-18,3	-1,43
$\nu[\text{C-H}]^a$	2925,78	2922,64	2925,37	2924,89	2924,34	2925,12	-3,14	-0,41	-0,89	-1,44	-0,66
$\delta[\text{OH}_{\text{pri}}]^a$	1643,21	1646,59	1644,64	1644,32	1638,61	1644,79	3,38	1,43	1,11	-4,6	1,58
$\delta[\text{CCH}+\text{OCH}+\text{COH}]^b$	1365,61	1366,13	1366,36	1365,38	1365,96	1366,39	0,52	0,75	-0,23	0,35	0,78
$\nu[\text{CO}+\text{CC}]+\delta[\text{COH}]^b$	1152,03	1152,76	1152,86	1153,18	1152,07	1152,52	0,73	0,83	1,15	0,04	0,49
$\nu[\text{CO}+\text{CC}]+\delta[\text{COH}]^b$	1076,74	1077,08	1077,36	1077,56	1077,25	1076,77	0,34	0,62	0,82	0,51	0,03
$\nu[\text{CC}]+\delta[\text{OCH}+\text{CCO}]^b$	1020,22	1021,72	1022,6	1023,49	1022,28	1022,49	1,5	2,38	3,27	2,06	2,27

^aRef [41].

^bRef [39].

δ Flexión

ν Estiramiento

(a) complejo fenbendazol: β -ciclodextrina en relación molar 1:1 en agua, (b) complejo fenbendazol: β -ciclodextrina en relación molar 1:2 en agua, (c) complejo fenbendazol: β -ciclodextrina en relación molar 1:10 en agua, (d) complejo fenbendazol: β -ciclodextrina en relación molar 1:2 en HCl/etanol (1 %), (e) complejo fenbendazol: β -ciclodextrina en relación molar 1:10 en HCl/etanol (1 %).

6.5. ANÁLISIS POR CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO Y POR TERMOGRAVIMETRÍA.

Las ciclodextrinas son polvos cristalinos en forma de hidratos, para el caso de la β -ciclodextrina, el agua de constitución representa el 12 %. De esta forma se observa en la Figura 25 un pico amplio de naturaleza endotérmica que representa transiciones de deshidratación de agua aproximadamente por debajo de los 140 °C, corroborándose con la señal TGA una pérdida de masa de 7,1 %. Luego se observa el segundo pico endotérmico que corresponde al punto de fusión a 311,8 °C, acompañado de otro pico exotérmico debido a la descomposición a los 341 °C. Se evidenció con el análisis de TGA que la pérdida de masa es de alrededor de un 18,82 % comenzando a los 314,7 °C.

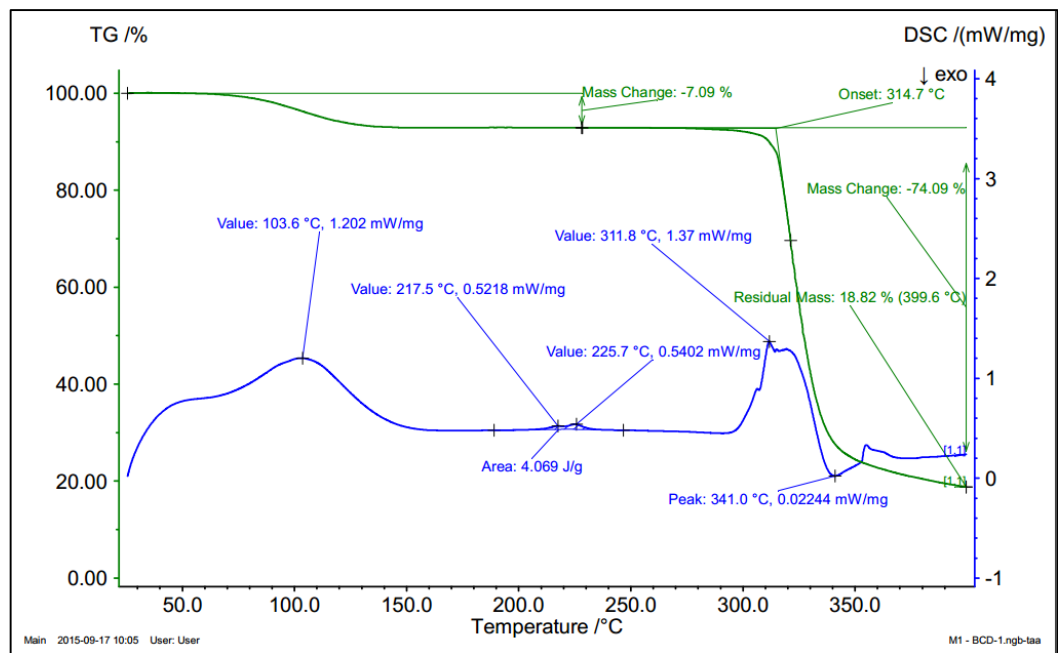


Figura 25: Espectro DSC-TGA de (a) β -ciclodextrina.

La Figura 26 corresponde al fármaco fenbendazol. Es notorio observar el pico endotérmico de fusión a los 226,9 °C. A su vez se observa un segundo pico a 233,6 °C, el cual podría ser indicativo de un compuesto enantioméricos o polimórfico. Se corroboró dos veces el ensayo, dando un resultado similar para la materia prima fenbendazol.

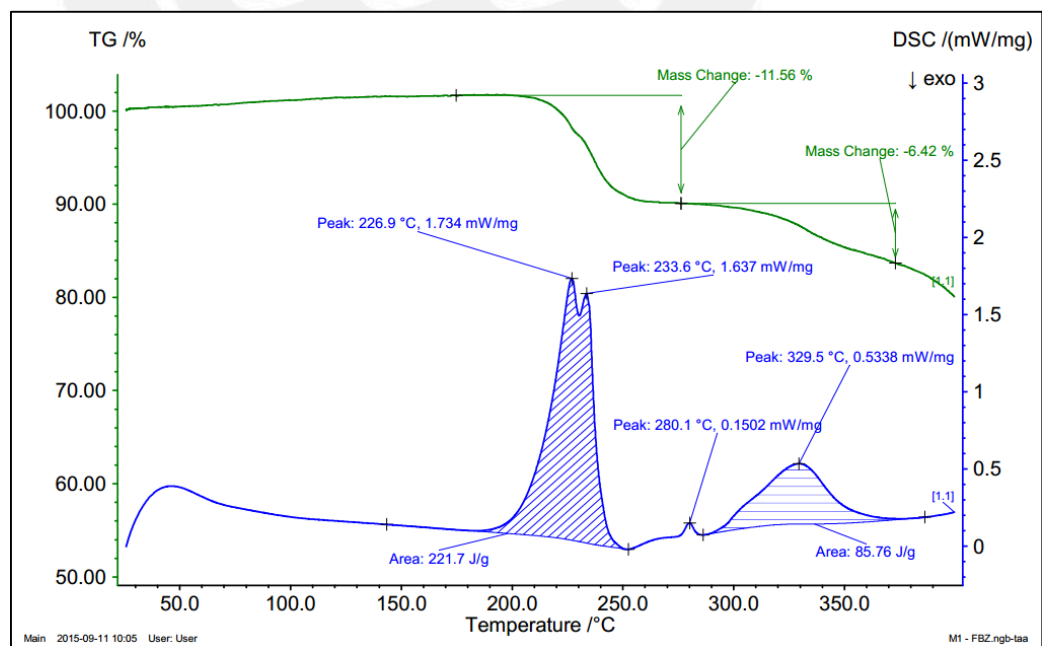


Figura 26: Espectro DSC-TGA de (b) fenbendazol

A su vez el grado de pureza indicado según certificación fue de 98 %. Este resultado es similar a los encontrados por Moriwaki *et al* (2008), el cual reporta la presencia de dos picos endotérmicos para la materia prima albendazol, molécula estructuralmente parecida a fenbendazol [42].

La Figura 27 pertenece a una mezcla binaria de fenbendazol y β -ciclodextrina, en ella se observa una superposición de señales, evidenciándose el pico endotérmico de fenbendazol a 225,8 °C; tres picos endotérmicos a β -ciclodextrina, siendo el primero correspondiente a la pérdida de agua a una temperatura < 120 °C, el segundo y tercer pico a 291,4 °C y 308,4 °C como los puntos de fusión de β -ciclodextrina, y el pico exotérmico de degradación en los 344,3 °C.

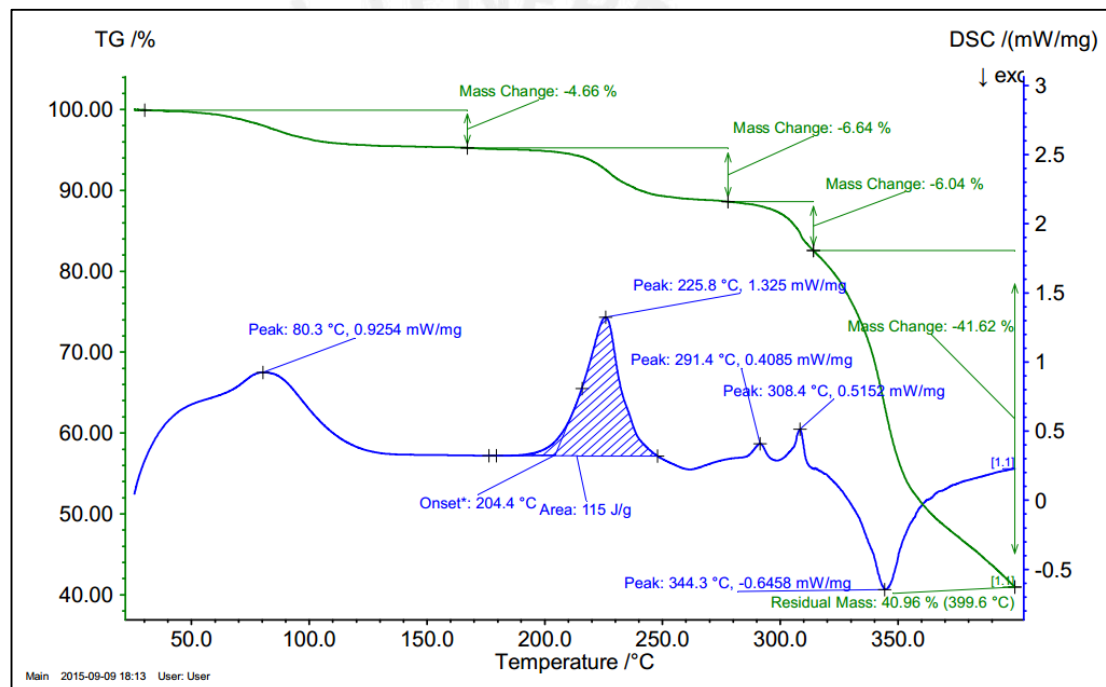


Figura 27: Espectro DSC-TGA de (c) Mezcla binaria

La Figura 28 pertenece al complejo fenbendazol: β -ciclodextrina en relación molar 1:1, en la cual se observan dos picos endotérmicos característicos. El primero pertenece al proceso de deshidratación y luego el segundo en 286,9 °C, para después empezar el proceso de degradación aproximadamente a los 310 °C y la señal perteneciente a fenbendazol desaparece totalmente. En comparación con la molécula de β -ciclodextrina, esta tiene un pico endotérmico prominente a los 311 °C, con la presencia adicional de un pequeño pico endotérmico a los 305 °C; lo cual demuestra una diferencia notable de aproximadamente 24 °C, diferenciándose de la materia prima.

De acuerdo a una revisión bibliográfica del comportamiento de los complejos de ciclodextrinas por calorimetría diferencia realizado por Takahashi *et al.* (2012); concluye que la evidencia de complejación se da cuando la señal del fármaco (huésped) se desplaza o desaparece completamente. Con los resultados obtenidos, se evidencia la complejación por la desaparición de la señal de la molécula de fenbendazol, además la señal se diferencia a la de la ciclodextrina al desplazarse a una menor temperatura de fusión menor a la de la ciclodextrina.

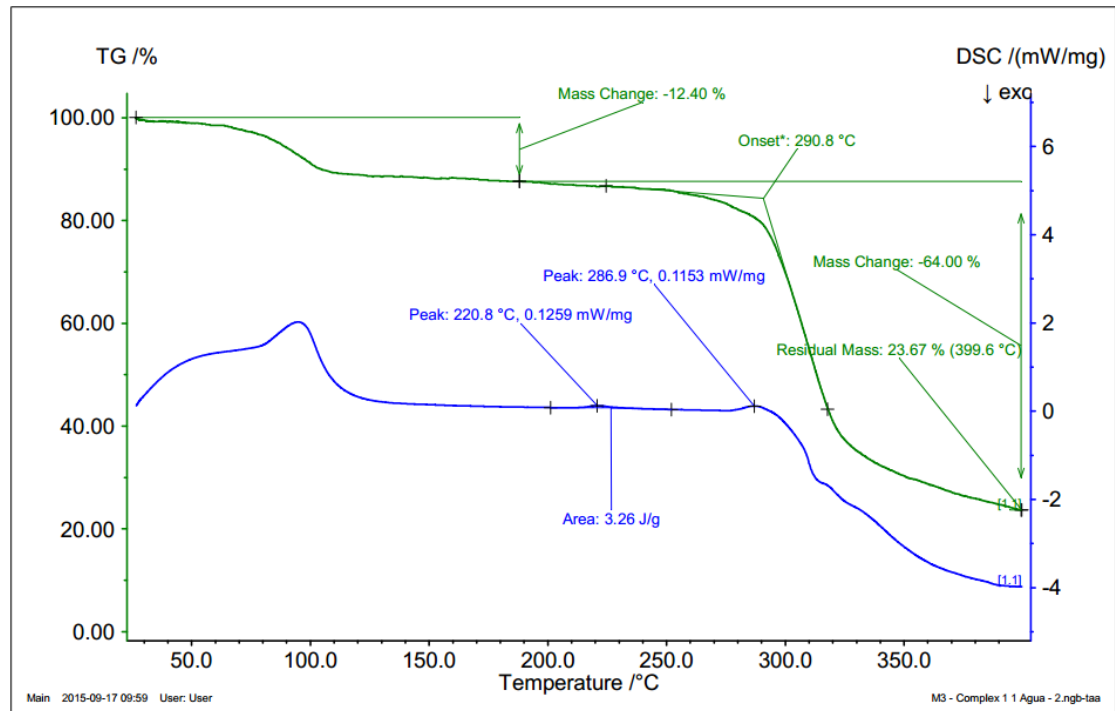


Figura 28: Espectro DSC-TGA de (d) Complejo fenbendazol: β -ciclodextrina (1:1) en agua

En la Figura 29 se observa las señales DSC y TGA del complejo fenbendazol: β -ciclodextrina en relación molar 1:2 en medio acuoso, el cual tiene un comportamiento similar al complejo fenbendazol: β -ciclodextrina en relación molar 1:1 y el segundo pico endotérmico está a los 286,2 °C, mientras que el pico exotérmico a los 308 °C. Y la Figura 30 es una superposición de las señales características de la β -ciclodextrina, fenbendazol, mezcla binaria y del complejo fenbendazol: β -ciclodextrina en relación molar 1:1 en medio acuoso; evidenciándose los desplazamientos del complejo y comportamiento diferente a las materias primas y mezcla binaria.

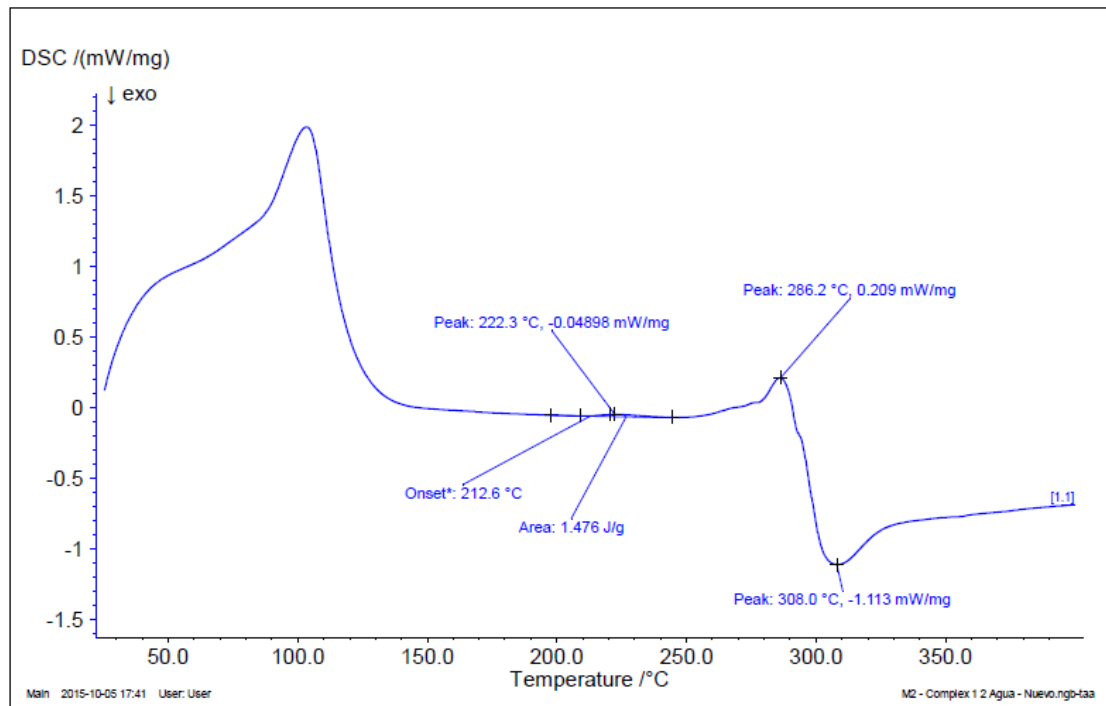


Figura 29: Espectro DSC-TGA de (d) Complejo fenbendazol: β -ciclodextrina en relación molar 1:2 en agua

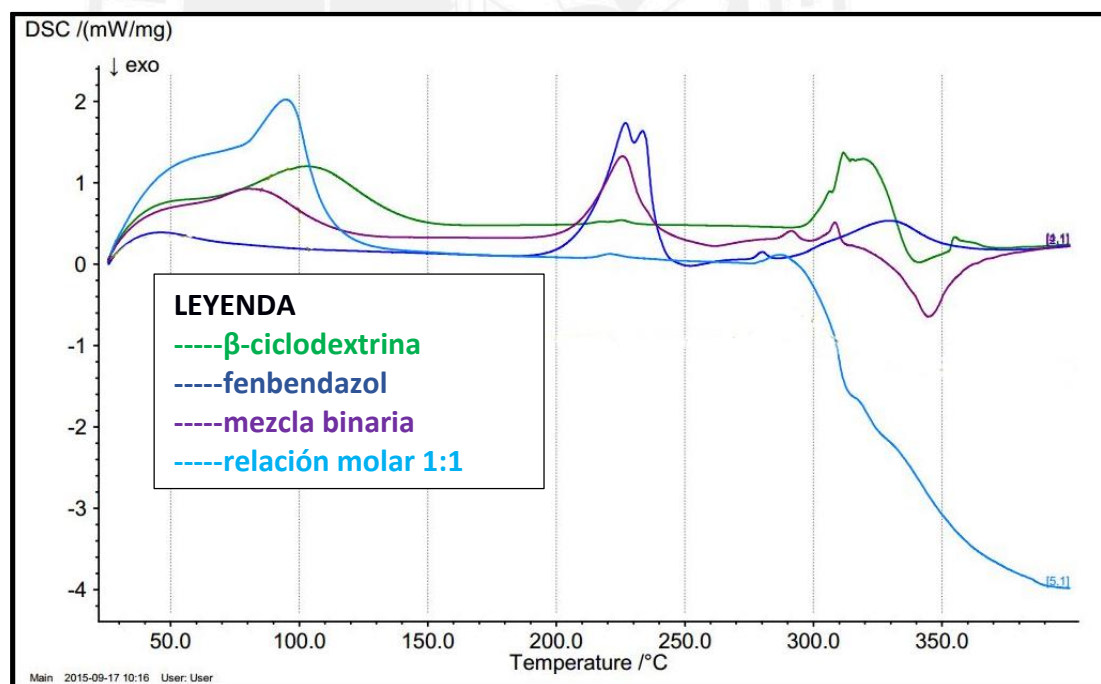


Figura 30: Espectro DSC-TGA de (a) β -ciclodextrina, (b) fenbendazol, (c) mezcla binaria (d) complejo fenbendazol: β -ciclodextrina en relación molar 1:1 en agua.

6.6. CÁLCULOS DE MECÁNICA CUÁNTICA

La inserción del fármaco fenbendazol en la cavidad de la β -ciclodextrina fue investigado por cálculos de mecánica cuántica con el uso del programa Gaussian 09 Rev.D.01, el cual permitió realizar cálculos de optimización geométrica y de *singlepoint* para obtener las energías asociadas de los conformeros estudiados. Las moléculas de partida se optimizaron con el semiempírico PM6 (Figura 15) y la relación energética encontrada para las orientaciones A y B (Figuras 31 y 32) establecen que para la orientación A se tiene 3 conformeros favorecidos energéticamente (conformeros 3,4 y 12) con un valor de energía de complejación de -13,3 kcal/mol, mientras que para la orientación B, se tiene 2 conformeros (conformeros 13 y 14) con una energía de complejación de -19,7 kcal/mol.

El cambio de la energía de complejación a valores mucho más negativos indica una inclusión más favorable. Así, la orientación B se encuentra favorecida energéticamente con una diferencia energética entre la orientación A de 6,4 kcal/mol.

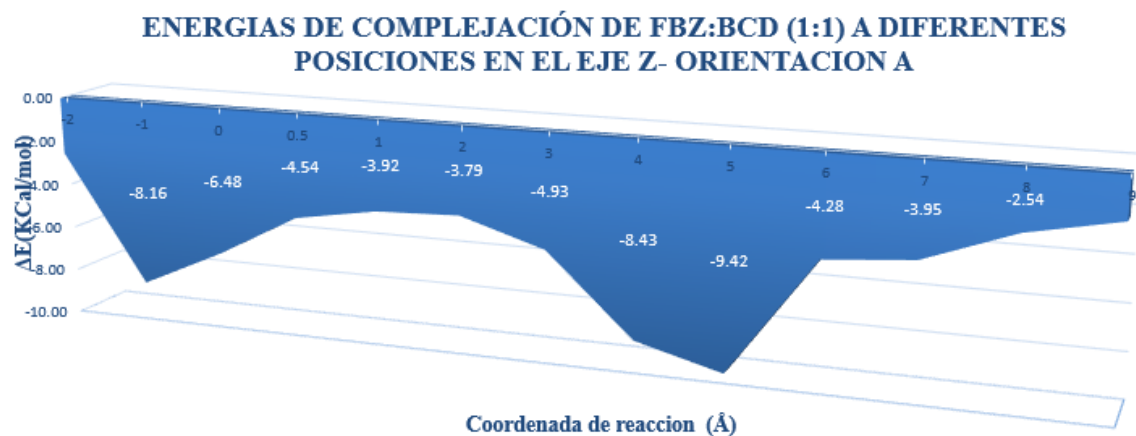


Figura 31: Energías de complejación de fenbendazol: β -ciclodextrina (1:1) a diferentes posiciones en el eje Z (coordenada de reacción) para la orientación A a un nivel del PM6

Nota: * Se indica que el cálculo realizado tiene restricción de coordenadas tanto para el fenbendazol y β -ciclodextrina

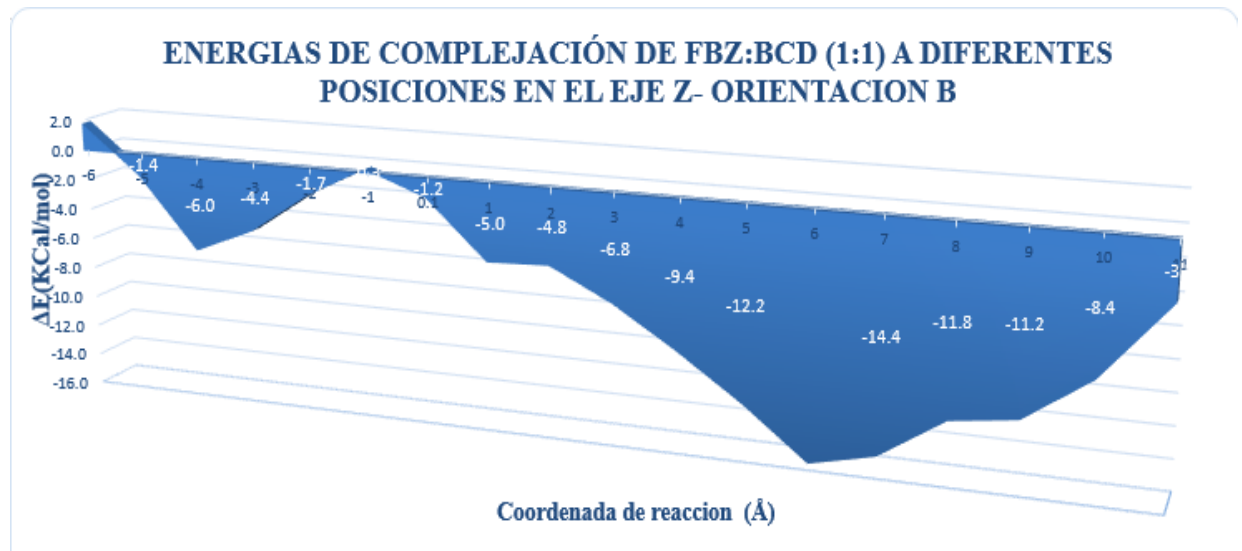


Figura 32: Energías de complejación de fenbendazol: β -ciclodextrina (1:1) a diferentes posiciones en el eje Z (coordenada de reacción) para la orientación B a un nivel de PM6

Nota: * Se indica que el cálculo realizado tiene restricción de coordenadas tanto para el fenbendazol y β -ciclodextrina

Antes de examinar la naturaleza de inclusión de los confórmeros considerados de menor energía, se debe tener en cuenta qué beneficios y limitaciones posee este nivel de cálculo. El método semiempírico PM6 (ver el apartado 3.7.1.1) está parametrizado para ciertos tipos de átomos al usar valores experimentales previos para sus cálculos de energía. La ventaja real es que debido a que la parte de dos electrones del hamiltoniano no está incluida explícitamente en los cálculos. Por ende, el sistema se simplifica enormemente y el tiempo de cálculo también. No obstante, esta simplificación, disminuye la precisión en el cálculo. En esta tesis, este cálculo permitió realizar un *scan* de la superficie potencial de una manera rápida, el uso de estos métodos es muy útil para realizar primeras investigaciones del sistema a estudiar.

Para aumentar el nivel de precisión de los cálculos, se consideró realizar una optimización geométrica con el método DFT y el funcional B3LYP/6-31G; con este método se resuelve la Ecuación de Schrödinger basándose en la densidad electrónica de la molécula y no en la función de onda como los métodos de Hartree-Fock.

En las Figuras 33 y 34 se encuentra el perfil de energía potencial para las dos orientaciones consideradas con el funcional B3LYP/6-31G, obteniéndose para la orientación A un confórmero favorecido energéticamente (confórmero 11) y para la orientación B se observó 4 confórmeros favorecidos energéticamente (confórmeros 14, 15, 16 y 17). Los resultados

en términos de energía de complejación sugieren que la orientación B está favorecida sobre la A con una diferencia energética de 6,4 kcal/mol, teniendo correlación con los cálculos a un nivel PM6.

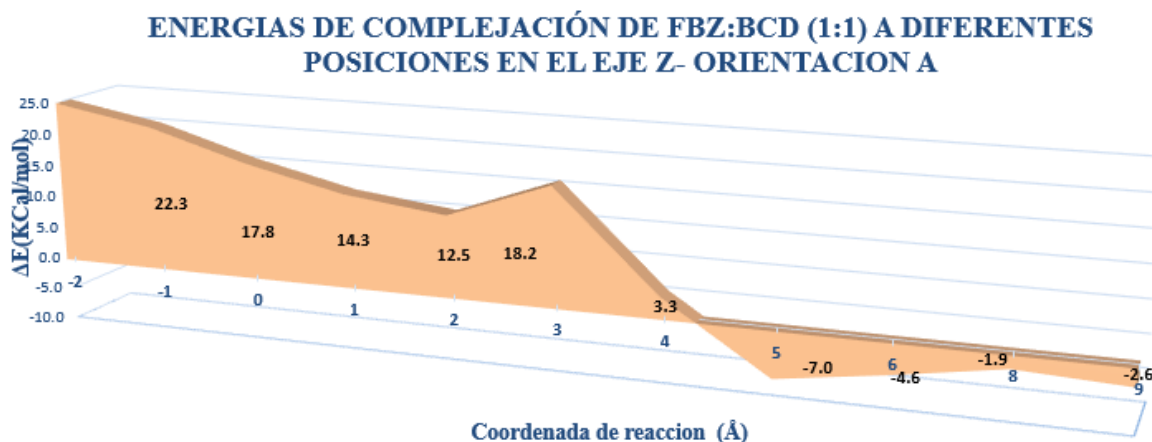


Figura 33: Energías de complejación de fenbendazol:β-ciclodextrina (1:1) a diferentes posiciones en el eje Z (coordenada de reacción) para la orientación A a un nivel de B3LYP/6-31G

Nota: * Se indica que el cálculo realizado tiene restricción de coordenadas tanto para el fenbendazol y β-ciclodextrina

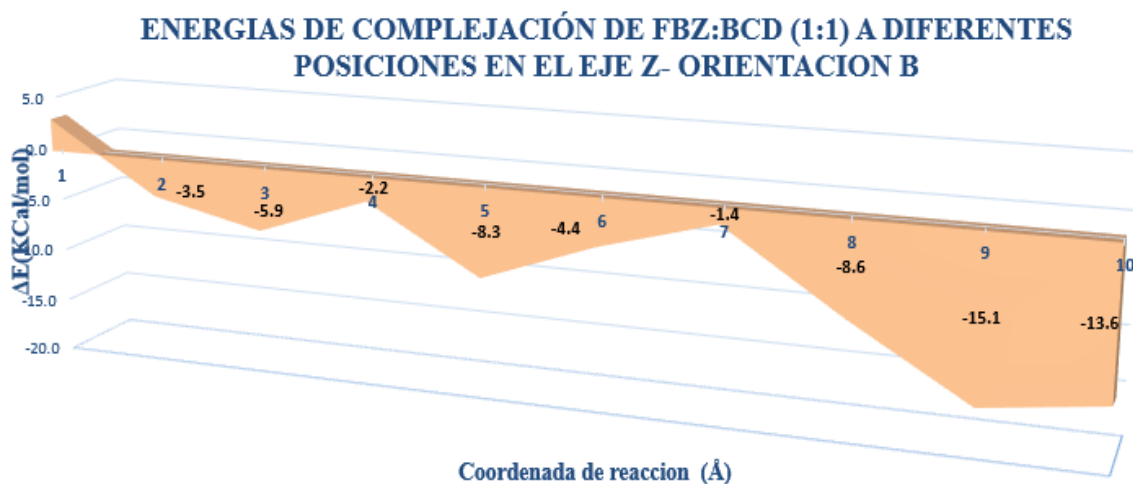


Figura 34: Energías de Complejacion de fenbendazol:β-ciclodextrina (1:1) a diferentes posiciones en el eje Z (coordenada de reacción) para la orientación B a un nivel de B3LYP/6-31G

Nota: * Se indica que el cálculo realizado tiene restricción de coordenadas tanto para el fenbendazol y β-ciclodextrina

Tabla 6: *Confórmeros de menor energía a diferentes niveles de teoría sin restricción alguna para las orientaciones A y B*

Nivel de Teoría del cálculo	Semiempírico PM6	DFT B3LYP76-31G
ORIENTACIÓN A	Confórmeros 3, 4 y 11, 12	Confórmero 11
ORIENTACIÓN B	Confórmeros 13 y 14	Confórmeros 14, 15, 16, 17

Nota: ver anexos

Al analizar las conformaciones obtenidas de menor energía para las orientaciones A y B (Figura 35), se observa que en la orientación A, la inclusión es por la parte aromática de la molécula de fenbendazol, específicamente por el grupo tiobencil. Además, la naturaleza no lineal del huésped favorece una inclusión parcial de la molécula. En la orientación B se observa que la inclusión por parte del grupo carbamato es favorecida, pero además se tiene que esta conformación es más favorable cuando se aleja del centro de la β -ciclodextrina, quedando también parcialmente incluida.

Sin embargo, estudios que fueron realizados en los últimos años por Kruse *et al*, establecen que las interacciones intermoleculares juegan un rol muy importante en la estabilización de este tipo de complejos y además indican que una de las debilidades del funcional B3LYP/6-31G es que no considera fuerzas de dispersión, ni de van der Waals, ni las de largo alcance. Debido a esto se ensayó con funcionales que incluyan estas fuerzas como lo es el de Grimme DFT-D3y de Truhlar M05-2X [43].

En la Tabla 6 se describe las energías de complejación determinadas con un cálculo único (*single point*) de energía con los funcionales de Grimme y Truhlar de las conformaciones optimizadas previamente, se evidenció que la orientación A se encontraba favorecida energéticamente por una diferencia de 1,6 kcal/mol para el funcional de Grimme; y de 0,9 kcal/mol para el funcional de Truhlar. Los resultados obtenidos sugieren que, en medio gaseoso, la orientación A está ligeramente más favorecida que la orientación B, en contradicción a los cálculos anteriores con el funcional B3LYP/6-31G. Esta postura finalmente obtenida se corrobora con los resultados por otros grupos de investigación como el de Kruse *et al*, Antony *et al*, Chen *et al*, por el cual describen que la corrección de la

dispersión por estos funcionales da un mejor *performance* de las características termoquímicas de estos complejos [44][45][46].

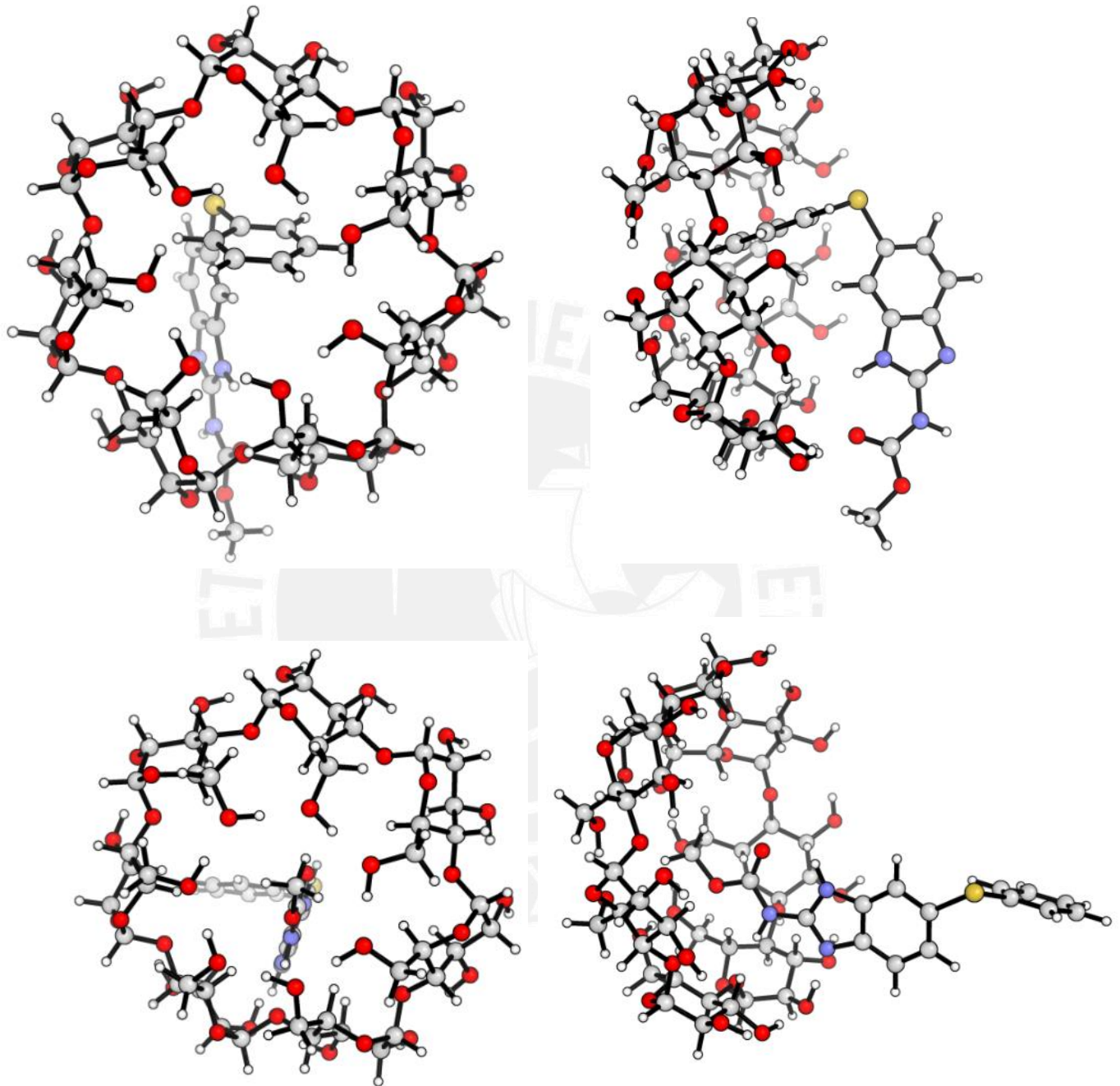


Figura 35: Estructura de los complejos fenbendazol: β -ciclodextrina (1:1) optimizados con el nivel B3LYP/6-31G para la orientación A (parte superior) y orientación B (parte inferior). Vista frontal (parte izquierda) y vista lateral (parte derecha).

Tabla 7: Energías de complejación a distintos niveles de teoría para el complejo fenbendazol: β -ciclodextrina (1:1) en medio gaseoso.

Nivel de teoría del cálculo	DFT B3LYP/6-31G (kcal/mol)	DFT B3LYP/6-31+G**-D3 (kcal/mol) (a)	M05-2x/6-31+G** (kcal/mol) (b)
ORIENTACIÓN A Confórmero 11	-10,66	-24,45	-14,47
ORIENTACIÓN B Confórmero 16	-17,09	-22,84	-13,60
ORIENTACION C	-110,23	108,00	-----

Nota: Los cálculos con los funcionales de Grimme (a) y de Truhlar (b) fueron realizar con un single point (ver Anexos)

La Tabla 7 corrobora los resultados obtenidos en medio gaseosos, la orientación A adquiere una energía de complejación más negativa por ende más probable de formación en medio acuoso, con una diferencia energética de 4,9 kcal/mol y 2,75 kcal/mol para los funcionales de Grimme y Truhlar. También se puede observar que la orientación C (estequiometría 1:2) posee una energía de complejación más favorable que las demás orientaciones con -110,23 kcal/mol.

Tabla 8: Energías de complejación a distintos niveles de teoría para el complejo β -ciclodextrina:fenbendazol (1:1) en medio acuoso.

Nivel de Teoría del cálculo	DFT B3LYP/6-31+G**-D3 (kcal/mol)	M05-2x/6-31+G** (kcal/mol)
ORIENTACIÓN A Confórmero 11	-22,6	-12,31
ORIENTACIÓN B Confórmero 16	-17,69	-9,56

Nota: Los cálculos con los funcionales de Grimme y de Truhlar fueron realizar con un single point

6.7. CÁLCULOS DE MECÁNICA MOLECULAR

Los cálculos de dinámica molecular fueron realizados con el programa Ambertools 15, el cual permitió realizar simulaciones de las estructuras de β -ciclodextrina y fenbendazol en relación estequiométrica 1:1 y se obtuvo que la orientación A era favorecida sobre la B por ocurrir espontáneamente. Esto se evidencia en la Figura 34, en la cual se extrajeron fotografías de las estructuras del complejo durante una simulación de 11 ns.

Se observa que en el proceso de inclusión por la parte del grupo tiobencil se da a partir de los 700 ps, manteniéndose de esta manera hasta alcanzar los 11 ns de simulación. Esto confirma el cálculo energético obtenido por mecánica cuántica con el funcional DFT-D3 y M05-2X, los cuales consideran las fuerzas de dispersión para el complejo fenbendazol: β -ciclodextrina.

En la orientación B considerada por cálculos de mecánica cuántica, por el cual la inclusión se daba por el grupo carbamato, no se observó en ningún momento de la simulación ni tampoco en subsecuentes simulaciones.

La estequiometría 1:2 se testeó también con cálculos de mecánica molecular. Sin embargo, aún no se logró observar la total inclusión con la segunda ciclodextrina. Esto podría requerir más tiempo de simulación o estudios más específicos de otras conformaciones con estequiometría 1:2. No obstante, se calculó la energía libre de unión de este cálculo con las aproximaciones de MM-PBSA para predecir su energética en relación a la orientación A (ver apartado 10.2).

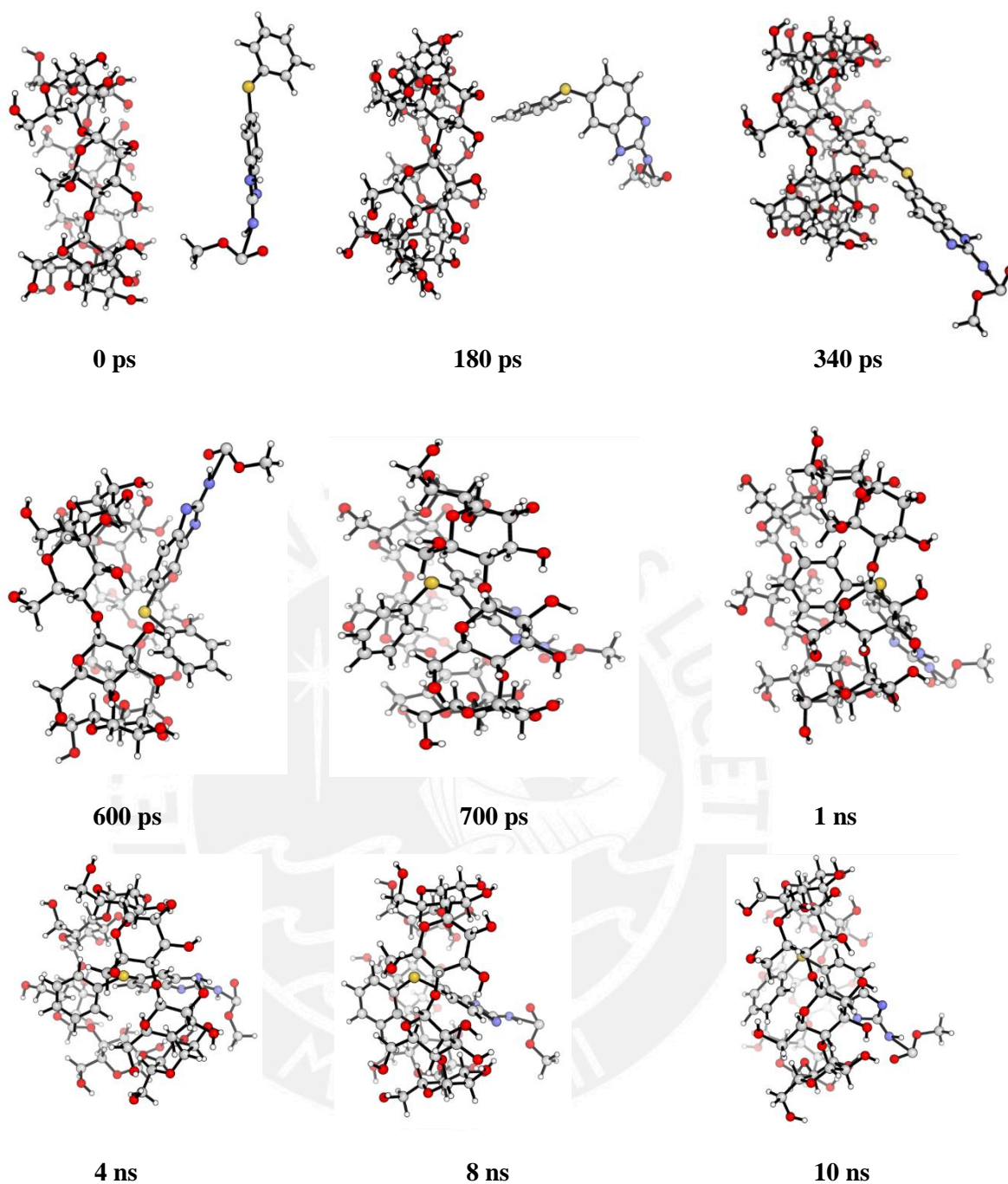


Figura 36: Estructuras del complejo fenbendazol:β-ciclodextrina (1:1) obtenidos para alcanzar la orientación A desde los 0ns hasta los 10 ns

6.7.1. ESTABILIDAD DEL SISTEMA

Para obtener alguna información acerca de la estabilidad del sistema después del proceso de equilibración del complejo de inclusión, se calculó la desviación cuadrática media (RMSD) relativa a la estructura inicial para todos los átomos del complejo, β -ciclodextrina y fenbendazol. Esto fue calculado a lo largo de la simulación de las orientaciones A (11 ns) y C (17 ns) usando el módulo Cpptraj del programa AmberTools 2015.

Las gráficas del RMSD para estos sistemas se muestran en la Figura 37. En las orientaciones A, y C, los valores de RMSD de los últimos 5 ns de simulación para el complejo (azul), β -ciclodextrina (marrón) y fenbendazol (negro) fueron encontrados hasta $\sim 3,5$ Å; $\sim 2,5$ Å y $\sim 2,0$ Å respectivamente para la orientación A. Para la orientación C valores para el complejo, β -ciclodextrina y fenbendazol de ~ 4 Å; ~ 4 Å y ~ 2 Å respectivamente.

Se tiene en consideración que valores bajos de RMSD (hasta 2 Å) son considerados como sistemas estables y de alta calidad de reproducción, pero también va a depender de la naturaleza del sistema. En este caso existen dos variables delimitantes a considerar. Una de ellas es el tiempo de simulación considerado. A pesar de ser un sistema pequeño, el tiempo de cálculo por cada nanosegundo con las condiciones que ofrece el servidor Legión requiere aproximadamente 50 horas de cálculo por nanosegundo. Se estima que para la total estabilización del sistema requiera mayor tiempo de simulación con ~ 30 ns como mínimo. La segunda variable a considerar, que afecta a la orientación C, es que en este sistema se considera dos moléculas de ciclodextrina, las cuales aumentan el grado de variabilidad de la estructura inicial de partida en comparación con las otras orientaciones consideradas.

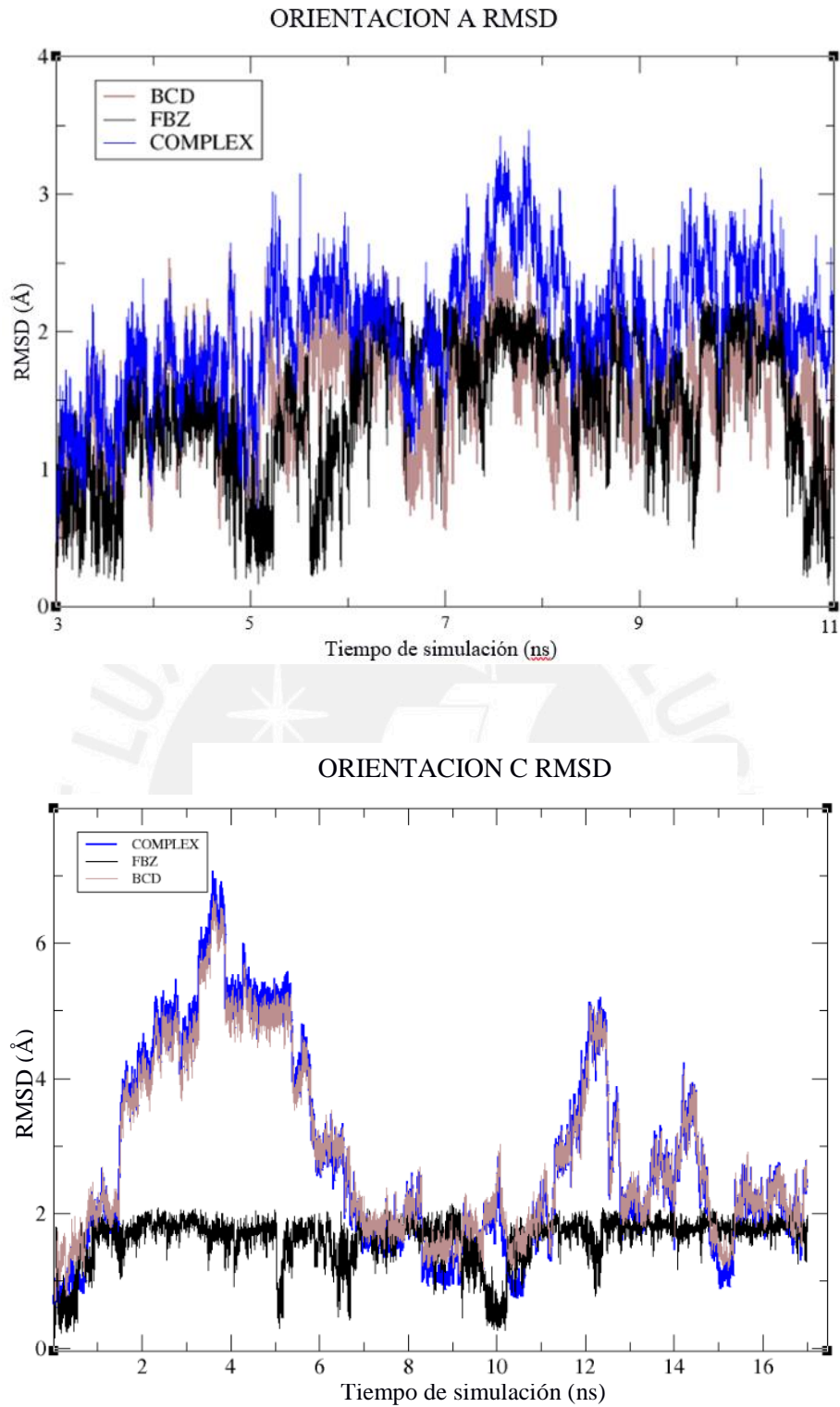


Figura 37: Gráfica de RMSD para el complejo fenbendazol: β -ciclodextrina, el ligando fenbendazol, la ciclodextrina para la orientación A y C

6.7.2. ENERGÍA LIBRE DE UNIÓN DEL COMPLEJO FENBENDAZOL: β -CICLODEXTRINA

El aproximamiento MM-PBSA es el cálculo para estimar la energía libre de unión. Este método combina las energías de mecánica molecular con los cálculos de solvatación. Con el fin de calcular la distribución electrostática de la energía libre de solvatación con una solución numérica, se aplicaron los métodos de Poisson-Boltzmann (PB) del programa AmberTools. Se extrajeron 200 fotografías de la fase de producción en cada sistema y fueron usadas para los cálculos de energía libre. En la Tabla 9 se tiene la energía libre de unión (ΔG) y otras energías de contribución. Las estructuras consideradas para estos cálculos se muestran a continuación en la Figuras 38 - 40.

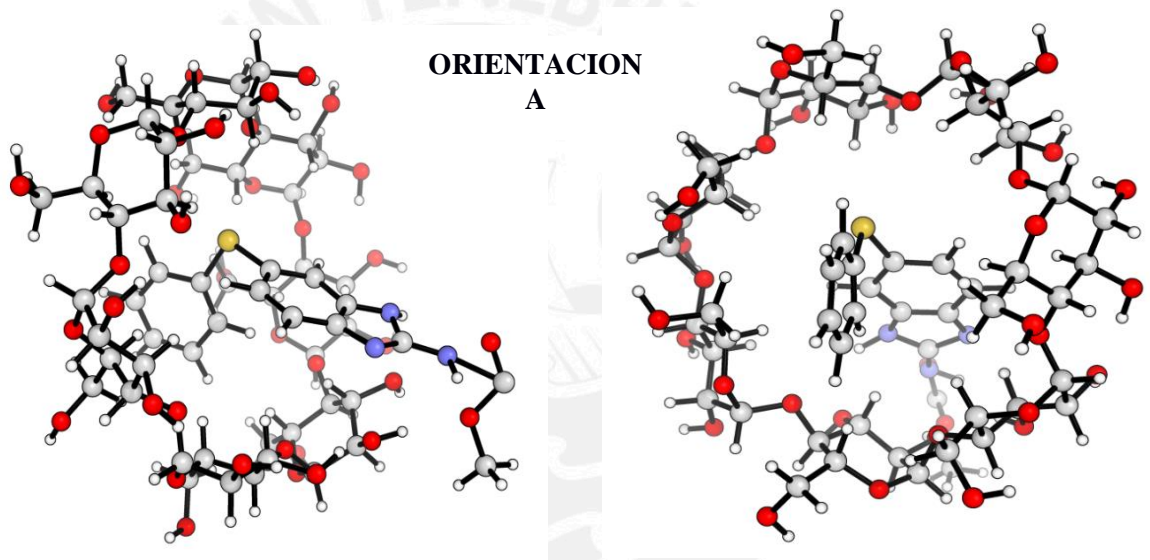


Figura 38: Estructura del complejo fenbendazol: β -ciclodextrina (1:1) de más baja energía en medio acuoso obtenidos en 10 ns de simulación

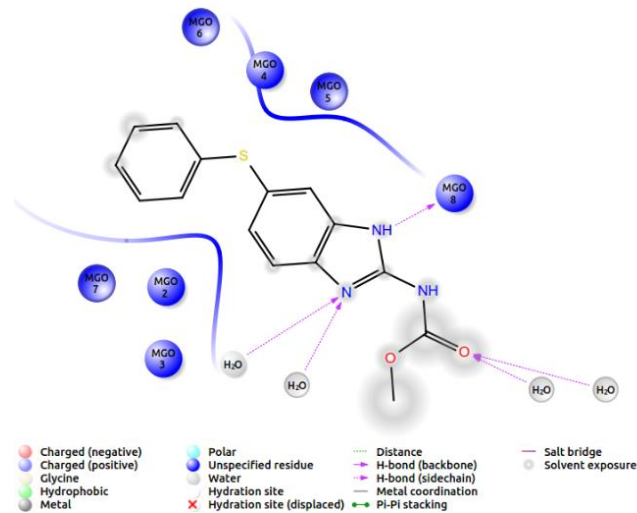


Figura 39: Representación esquemática de la interacción del fenbendazol y β -ciclodextrina de más baja energía en medio acuoso en 11 ns de simulación

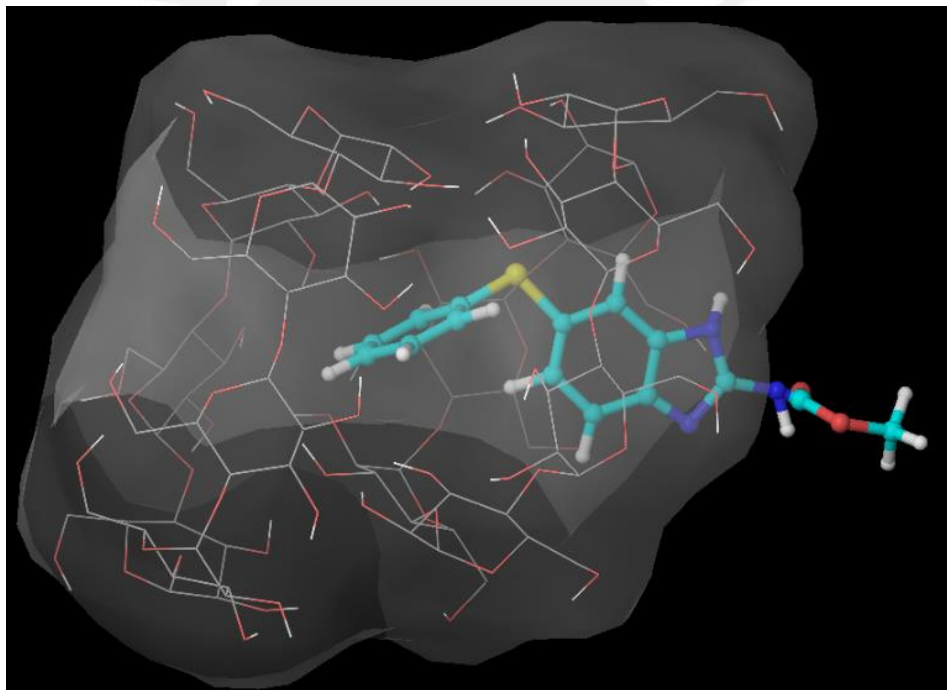


Figura 40: Estructura del complejo de fenbendazol: β -ciclodextrina (1:2) de la orientación C

Según la Tabla 9, la orientación C es la que se encuentra favorecida energéticamente con -22,6 kcal/mol, mientras que después prosigue la orientación A con -16,43 kcal/mol. Estos resultados se corroboran con la parte cuántica previamente descrita, reforzando la hipótesis de la formación de un complejo 1:2 para este sistema. Además,

se observa como las fuerzas electrostáticas y de van der Waals toman un papel importante en la estabilización de estos complejos de inclusión. Estas fuerzas se consideraron también en los cálculos mecano-cuánticos con los funcionales de Truhlar y Grimme.

Tabla 9: Energías libre de unión (kcal/mol) con la aproximación de MM-PBSA del sistema de fenbendazol: β -ciclodextrina

Contribución Energética	orientación A		orientación C	
	MEAN	STD	MEAN	STD
ELE	-7,05	4,8	-7,41	2,41
VDW	-24,52	1,38	-32,64	2,48
INT	0	0	0	0
GAS	-31,58	5,39	-40,05	3,74
PBSUR	-2,47	0,12	-2,74	0,13
PBCAL	17,62	4,9	22,2	2,88
PBSOL	15,15	4,79	19,46	2,79
PBELE	10,57	1,6	14,79	2,16
PBTOT	-16,43	1,77	-20,6	2,36

Donde ΔE_{ELE} es la energía electrostática calculada por el campo de fuerza, ΔE_{VDW} es la contribución de van der Waals calculada por MM, GAS es la energía total en fase gas (suma de ELE, VDW, INT), PBSUR es la contribución no polar para la energía libre de solvatación calculada por un modelo empírico, PBCAL, es la contribución electrostática a la energía libre de solvatación calculada por PB, PBSOL es la sumatoria de las contribuciones polares o no polares, PBELE es la suma de la contribución electrostática de la energía libre de solvatación y de la MM, PBTOTAL es la estimación final de la energía libre de unión calculada (kcal/mol).

La Figura 39 muestra la posible interacción del fenbendazol y β -ciclodextrina en la orientación A en medio acuoso. Se evidencia la formación de un puente de hidrógeno entre el átomo de nitrógeno del heterociclo del fenbendazol y un residuo de la β -ciclodextrina, además de la interacción con el solvente a través de puentes de hidrogeno con el átomo de oxígeno del grupo carbamato y el segundo átomo de nitrógeno del heterociclo, tal y como se observa en la Figura 36.

7. CONCLUSIONES

En base a los resultados presentados en la presente investigación se concluye lo siguiente:

- Se logró sintetizar los complejos de inclusión en medio acuoso lográndose aumentar la solubilidad del fenbendazol hasta 2,5 $\mu\text{g/mL}$.
- Los resultados por espectroscopía UV/Vis indican un claro efecto solubilizante de la β -ciclodextrina sobre el fenbendazol, obteniéndose un aumento de solubilidad hasta 29,9 $\mu\text{g/mL}$ con 15 mM de β -ciclodextrina y tomando en consideración el comportamiento del fenbendazol a concentraciones diluidas, se considera un diagrama de solubilidad de tipo B.
- El cálculo de la constante aparente de estabilidad (K_s) fue de $1,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Esto refleja que la interacción del fenbendazol con la ciclodextrina tiene un grado de estabilidad moderada a fuerte. Sin embargo, este valor solo es un estimativo debido a que la ecuación de Higuchi – Connors no brinda una confiabilidad exacta para fármacos con una solubilidad intrínseca menor a 1 mg/mL.
- La constante de asociación calculada por el método de Benesi-Hildebrand es de 10,9 M^{-1} y $1,78 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ para una estequiometría 1:1 y 1:2, respectivamente, no mostrando una selectividad por alguna estequiometría propuesta.
- Los espectros FT-IR y los termogramas DSC-TGA de los complejos se evidencian como una superposición de las señales de la β -ciclodextrina, desapareciendo completamente las señales características del fenbendazol. Estos fenómenos ocurren y son descritos en la literatura como evidencia de complejación.
- Los cálculos de mecánica cuántica obtenidos con el programa Gaussian 09 Rev.D.01 permitieron dilucidar el fenómeno de inclusión del fenbendazol con la β -ciclodextrina, obteniéndose que el grupo tiobencil es el más favorecido energéticamente para incluirse en la cavidad de la β -ciclodextrina. A su vez se obtuvo que las fuerzas de dispersión juegan un papel clave en la estabilización del complejo de inclusión. Los cálculos con los funcionales DFT-D3 y M05-2X permitieron describir este fenómeno. La diferencia energética de la orientación A sobre la B fue de 1,61 kcal/mol y 0,87 kcal/mol en medio gaseoso y de 4,9 kcal/mol y 2,5 kcal/mol en medio acuoso con los funcionales de Grimme y Truhlar respectivamente. Además, los cálculos para la orientación C con el funcional B3LYP/6-31G sugieren que la inclusión del complejo fenbendazol: β -ciclodextrina

es más favorecida para una estequiometría 1:2, lo cual se ratificó con los cálculos de mecánica molecular.

- Los cálculos de mecánica molecular obtenidos con el programa AmberTools 15, corroboran los resultados obtenidos por mecánica cuántica, obteniéndose que la orientación A se ve favorecida espontáneamente en un medio acuoso, y observándose el proceso de inclusión a los 700 ps de simulación. La orientación B no se observó en ninguna simulación realizada.
- La energética de la orientación C como un indicativo de la estequiometría 1:2 (fenbendazol: β -ciclodextrina) se demostró con los cálculos de MM-PBSA, estimando que la energía libre de unión para esta orientación fue de -20,60 kcal/mol, con una diferencia energética de 4,17 kcal/mol por encima de la orientación A (complejo 1:1).

8. RECOMENDACIONES

Según las conclusiones anteriores, se recomienda lo siguiente:

- Continuar estudios del fenómeno de inclusión con el uso de RMN para mediciones de distancias de protones de la β -ciclodextrina y fenbendazol, mediante análisis de ROESY-2D y COSY-2D.
- Examinar el proceso de inclusión considerando el medio ácido, o algún otro medio que beneficie la inclusión. Asimismo, verificar la estabilidad del complejo en un medio orgánico como el DMSO.
- Considerar en próximos estudios la adición de un tercer compuesto para aumentar la disgregación del fenbendazol. Actualmente los estudios con ciclodextrinas consideran compuestos ternarios que mejoran la formulación de compuestos insolubles.
- Continuar los estudios de mecánica molecular hasta obtener un RMSD menor a 2 Å. Se estima aumentar el tiempo de simulación hasta unos 60 ns.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Silva Arrais, M. (2012). Obtenção e caracterização físico química do complexo de inclusão dapsona: β cd e dapsona:sbe β cd para incremento de solubilidade em forma farmacêutica. Universidade Federal do Piauí, Piauí. Accedido el 20 de junio, 2015, desde http://www.ufpi.br/subsiteFiles/ppgcf/arquivos/files/9a_dissertacao_monica_amaral.PDF
2. Grebogi, I. Hinke. (2009). Obtenção e Caracterização de Complexos Binários e Ternários de Dapsona. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. Accedido el 29 de diciembre, 2015, desde http://dSPACE.c3sl.ufpr.br/dSPACE/bitstream/handle/1884/19464/DISSERTACAO_PDF.pdf?sequence=1
3. Yang, Haitao (2009) *uc781: Beta-cyclodextrin complexation and formulation as an anti-hiv microbicide*. Doctoral Dissertation, University of Pittsburgh. Accedido el 29 de diciembre, 2015, desde <http://d-scholarship.pitt.edu/6278/1/YanghaitaoOct172008.pdf>
4. García Rodríguez, J. J. (2009). Estudio biofarmacéutico y parasitológico de una formulación de albendazol en hidroxipropil- β -ciclodextrina. Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones. Recuperado a partir de <http://eprints.ucm.es/8745/>
5. Jullian Matthaei, C (2007). Estudio de compuestos de inclusión de ciclodextrinas con flavonoides. Efecto sobre su actividad antioxidante. (Tesis de doctorado, Universidad de Chile). Accedido el 29 de diciembre, 2015, desde http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2007/qf-jullian_c/pdfAmont/qf-jullian_c.pdf
6. Fermeglia, M., Ferrone, M., Lodi, A., & Pricl, S. (2003). Host-guest inclusion complexes between anticancer drugs and β -cyclodextrin: computational studies. *Carbohydrate Polymers*, 53(1), 15-44.
7. Cai, W., Sun, T., Liu, P., Chipot, C., & Shao, X. (2009). Inclusion Mechanism of Steroid Drugs into β -Cyclodextrins. Insights from Free Energy Calculations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(22), 7836-7843. doi:10.1021/jp901825w
8. Radi, A.-E., & Eissa, S. (2010). Electrochemistry of cyclodextrin inclusion complexes of pharmaceutical compounds. *Open Chem Biomed Meth J*, 3, 74-85.

9. Faucci, M. T., Melani, F., & Mura, P. (2002). Computer-aided molecular modeling techniques for predicting the stability of drug–cyclodextrin inclusion complexes in aqueous solutions. *Chemical physics letters*, 358(5), 383–390.
10. Guilherme Lionello ,A. (2011). Encapsulação, caracterização físico-química e estudo teórico do fármaco tiabendazol em «beta»-ciclodextrina. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. Accedido el 9 de junio, 2015, desde <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/zeus/auth.php?back=http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000854412&go=http://www.biq.iqm.unicamp.br/arquivos/teses/ficha95533.htm&code=000854412&unit=IQ>
11. Sharma, M. C., & Sharma, S. (2011). Preparation, Physicochemical Characterization, Dissolution, Formulation and Spectroscopic studies of β -Cyclodextrins Inclusion Complex. Accedido el 29 de diciembre, 2015, desde [http://sphinxesai.com/Vol.3No.1/chem_jan-mar11/pdf/CT=16\(104-111\)%20JMCT11.pdf](http://sphinxesai.com/Vol.3No.1/chem_jan-mar11/pdf/CT=16(104-111)%20JMCT11.pdf)
12. Snor, W., Liedl, E., Weiss-Greiler, P., Viernstein, H., & Wolschann, P. (2009). Density functional calculations on meloxicam– β -cyclodextrin inclusion complexes. *International Journal of Pharmaceutics*, 381(2), 146-152.
13. Fujisawa, M., & Kimura, T. (2006). Studies on molecular interactions of β -cyclodextrin and antiulcer agent. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, 85(3), 589–591.
14. Ferreira, B. A., & Alves, L. F. (2013). Modelagem molecular dos processos de inclusão do antihipertensivo valsartan em beta-ciclodextrinas. *BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports*, 2(2), 162–165.
15. Arias, J. L., López-Viota, M., Clares, B., & Ruiz, M. A. (2008). Stability of fenbendazole suspensions for veterinary use. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 34(4-5), 257-262. <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.04.008>
16. Cárdenas Rodríguez, M. I. R. (2005). Efectividad del fenbendazol y praziquantel en combinación, para el control en dosis única de nematodos y cestodes en perros. Accedido el 29 de diciembre, 2015, desde <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/715>
17. Soto, C., Otipka, R., Contreras, D., Yanez, J., & Toral, M. (2013). Co-determination of two antiparasitics drugs by derivative spectrophotometry and its photodegradation studies. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 58(3), 1824–1829

18. Cifuentes Eglehurst, Constanza Catalina de Lourdes (2009). Estudio termodinámico y estructural de los complejos de inclusión luteolina-ciclodextrinas. Universidad de Chile. Santiago. Accedido el 29 de diciembre, 2015, desde <http://www.repositorio.uchile.cl/handle/2250/105318>
19. Lee Wilson (1998). Binding Studies of Cyclodextrin-Surfactant complexes. Thesis for Degree of Doctor of Philosophy. University of Saskatchewan. Accedido el 29 de diciembre, 2015, desde <http://www.collectionscanada.gc.ca/obj/s4/f2/dsk2/ftp02/NQ32802.pdf>
20. Loftsson, T., Maasson, M., Brewster, M.E. (2003). Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *J. Pharm. Sci.* 93, 1091–1099
21. Crini, G. (2014). Review: A History of Cyclodextrins. *Chemical Reviews*, 114(21), 10940-10975.
22. Loftsson, T., Hreinsdóttir, D., & Másson, M. (2005). Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 302(1-2), 18-28.
23. Srinivasan, K., Stalin, T., & Sivakumar, K. (2012). Spectral and electrochemical study of host-guest inclusion complex between 2,4-dinitrophenol and β -cyclodextrin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 94, 89-100.
24. Vilar, M., & Navarro, M. (2010). Determination of cyclodextrin inclusion constant for aromatic carbonyl compounds through spectrophotometric and electrochemical methods. *Electrochimica Acta*, 56(1), 305-313.
25. P. J. Sinko. (2006). Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 5th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 72-80.
26. Miranda, J. C. de, Martins, T. E. A., Veiga, F., & Ferraz, H. G. (2011). Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47(4), 665–681.
27. Roca Sabio, A. (2013). Complejo de Lantanidos con propiedades predeterminadas: Sistemas basados en Macrociclos con grupos 6-metilpicolinato. Universidade da Coruña. Accedido el 29 de diciembre, 2015, desde http://ruc.udc.es/bitstream/2183/10330/2/RocaSabio_Adrian_TD_2103_1de2.pdf.
28. El-Shafei, A. M. (2004). Semi-Empirical Molecular Orbital Methods and Ab Initio Calculations in Dye Chemistry: Computational Studies Towards the Design and Synthesis of Organic Pigments. Accedido el 29 de diciembre, 2015, desde

- <http://repository.lib.ncsu.edu/ir/handle/1840.16/4446>
29. Angulo-Cornejo, J. R., & Tovar, C. F. (2014). Utilización de la química computacional: Método semiempírico PM3, para elucidar la estructura del complejo bis (1, 5-difenil-1, 2, 4-triazol-3-tionato) plomo (II)(Pb (DTT) 2). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 80(2), 136–143.
 30. Abrha Welearegay, M. (2014). Density Functional Theory and Information Theory based Indices as Tools to investigate the Reactivity of Chemical Systems and their applications. Institute of Physical Chemistry of Poland. Accedido el 29 de diciembre, 2015, desde http://ichf.edu.pl/r_act/PhD-theses/PhD-Welearegay.pdf
 31. Goerigk, L. (2014). How Do DFT-DCP, DFT-NL, and DFT-D3 Compare for the Description of London-Dispersion Effects in Conformers and General Thermochemistry? *Journal of Chemical Theory and Computation*, 10(3), 968-980. <http://doi.org/10.1021/ct500026v>
 32. Romero Hermida, M. (2012). Efecto de la composición de los gases de combustión en la captura de CO2 por nanotubos de carbono: un estudio de simulación. Universidad de Sevilla. Accedido el 29 de diciembre, 2015, desde <http://bibing.us.es/proyectos/abreproy/70358/>
 33. Vazdim Karpusenka. (2012). Free Energy and Structure of Helix-forming Peptides: A theoretical investigation. North Carolina State University. Accedido el 29 de diciembre, 2015, desde <http://repository.lib.ncsu.edu/ir/handle/1840.16/7412>
 34. Zhiju Zheng. (2010). Molecular Dynamics simulations on the inhibition of methane hydrates. Iowa State University. Accedido el 29 de diciembre, 2015, desde <http://lib.dr.iastate.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=2931&context=etd>
 35. Cézard, C., Trivelli, X., Aubry, F., Djedaïni-Pilard, F., & Dupradeau, F.-Y. (2011). Molecular dynamics studies of native and substituted cyclodextrins in different media: 1. Charge derivation and force field performances. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13(33), 15103. <http://doi.org/10.1039/c1cp20854c>
 36. Douhal, A. Cyclodextrins Materials Photochemistry, Photophysics and Photobiology Elsevier: Amsterdam, 2006.
 37. Loftsson, T., Hreinsdóttir, D., & Másson, M. (2007). The complexation efficiency. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 57(1-4), 545-552.
 38. Jang-Ha Ryu, James Diakur, Sandra E. Kelly, James C. Russell and Leonard I. Wiebe, (2013). A Water-Soluble Fenbendazole (FBZ) Formulation for Treating Pinworm Infections in Laboratory Animals, *Drug Delivery Letters*, volume 3.

39. Oliveira, C. X., Ferreira, N. S., & Mota, G. V. S. (2016). A DFT study of infrared spectra and Monte Carlo predictions of the solvation shell of Praziquantel and β -cyclodextrin inclusion complex in liquid water. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 153, 102-107
40. Mohan, P. R. K., Sreelakshmi, G., Muraleedharan, C. V., & Joseph, R. (2012). Water soluble complexes of curcumin with cyclodextrins: Characterization by FT-Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 62, 77-84.
41. Khedkar, J. K., Gobre, V. V., Pinjari, R. V., & Gejji, S. P. (2010). Electronic Structure and Normal Vibrations in (+)-Catechin and (-)-Epicatechin Encapsulated β -Cyclodextrin. *The Journal of Physical Chemistry A*, 114(29), 7725-7732.
42. Moriwaki, C., Costa, G. L., Ferracini, C. N., de Moraes, F. F., Zanin, G. M., Pineda, E. A. G., & Matioli, G. (2008). Enhancement of solubility of albendazole by complexation with β -cyclodextrin. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 25(2), 255–267.
43. Rabal Gracia, O.(2006). Herramientas de cribado virtual aplicadas a inhibidores de tirosina quinasas. Contribución al desarrollo del programa PRALINS para el diseño de quimiotecas combinatorias. Recuperado a partir de <http://tdx.cbuc.es/handle/10803/9303>
44. Hermansson, A. (2015). Calculating Ligand-Protein Binding Energies from Molecular Dynamics Simulations. Thesis in Physical Chemistry. School of Chemical Science and Engineering (CHE). Royal Institute of Technology. Suecia. Accedido el 29 de diciembre, 2015, desde <http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:839581/FULLTEXT01.pdf>
45. Iacovino, R., Rapuano, F., Caso, J. V., Russo, A., Lavorgna, M., Russo, C., Isernia, C. (2013). β -Cyclodextrin Inclusion Complex to Improve Physicochemical Properties of Pipemidic Acid: Characterization and Bioactivity Evaluation. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), 13022–13041. <http://doi.org/10.3390/ijms140713022>
46. Case DA, Darden TA, Cheatham TE III, Simmerling CL, Wang J, Duke RE, Luo R, Walker RC, Zhang, W, Merz KM, et al. AMBER 2015. San Francisco. University of California; 2015
47. R. Salomon-Ferrer, D.A. Case, R.C. Walker. An overview of the Amber biomolecular simulation package. *WIREs Comput. Mol. Sci.* 3, 198-210 (2013).

48. Khadka, P., Ro, J., Kim, H., Kim, I., et al. (2014). Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(6), 304-316. <http://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.05.005>
49. Gaussian 09, Revision D.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2009.



ANEXOS

Tabla 10: Optimización de energía y cálculos singlepoint de las moléculas de partida en el vacío.

MOLÉCULAS DE PARTIDA	OPTIMIZACIÓN PM6	OPTIMIZACIÓN B3LYP/6-31G	SINGLEPOINT DFT B3LYP/6-31+G**-D3 (HT)	SINGLEPOINT M05-2x/6-31+G** (HT)
β - CICLODEXTRINA	-2.51287403	-4273.956397	-4275.906263	-4275.16809
FENBENDAZOL	-0.01214372	-1292.069963	-1292.485128	-1292.29221

Tabla 11: Optimización de energía de los conformeros generados para la orientación A con el semiempírico PM6 en el vacío.

CONFORMEROS CONSIDERADOS	ORIENTACIÓN A (DISTANCIA EN Å DESDE LOS ATOMOS DE REFERENCIA)	OPTIMIZACIÓN DE ENERGIA PM6 RESTRAINT (HT)	ENERGIA DE COMPLEJACIÓN (Kcal/mol)	REOPTIMIZACIÓN PM6 SIN RESTRAINT (HT)	ENERGIA DE COMPLEJACIÓN (Kcal/mol)
1	-5	-2.52656031	-1.0	-2.52954259	-2.8
2	-4	-2.52535947	-0.2	-2.53148847	-4.1
3	-3	-2.52054064	2.8	-2.54614823	-13.3
4	-2	-2.52900457	-2.5	-2.54614813	-13.3
5	-1	-2.53802953	-8.2	-2.54184246	-10.6
6	0.5	-2.53224626	-4.5	-2.54126348	-10.2
7	1	-2.53127059	-3.9	-2.53703144	-7.5
8	2	-2.53105012	-3.8	-2.54373341	-11.7
9	3	-2.53287423	-4.9	-2.54598774	-13.2
10	4	-2.53845666	-8.4	-2.54469525	-12.3
11	5	-2.54003087	-9.4	-2.54444503	-12.2
12	6	-2.53183852	-4.3	-2.54618929	-13.3
13	7	-2.53130744	-3.9	-2.54132971	-10.2
14	8	-2.52905827	-2.5	-2.54006064	-9.4

Tabla 12: Optimización de energía de los conformeros generados para la orientación B con el semiempírico PM6 en el vacío.

CONFORMEROS CONSIDERADOS	ORIENTACIÓN B (DISTANCIA EN Å DESDE LOS ATOMOS DE REFERENCIA)	OPTIMIZACIÓN DE ENERGIA PM6 RESTRAINT (HT)	ENERGIA DE COMPLEJACIÓN (Kcal/mol)	REOPTIMIZACIÓN PM6 SIN RESTRAINT (HT)	ENERGIA DE COMPLEJACIÓN (Kcal/mol)
1	-6	-2.52214	1.8	-2.5271020	-1.3
2	-5	-2.52720	-1.4	-2.5359995	-6.9
3	-4	-2.53462	-6.0	-2.5359995	-6.9
4	-3	-2.53202	-4.4	-2.5367823	-7.4
5	-2	-2.52777	-1.7	-2.5327131	-4.8
6	-1	-2.52460	0.3	-2.5340835	-5.7
7	0.1	-2.52691	-1.2	-2.5454210	-12.8
8	1	-2.53291	-5.0	-2.5464039	-13.4
9	2	-2.53265	-4.8	-2.5456561	-13.0
10	3	-2.53585	-6.8	-2.5441545	-12.0
11	4	-2.53993	-9.4	-2.5441545	-12.0
12	5	-2.54441	-12.2	-2.5535257	-17.9
13	6	-2.54955	-15.4	-2.5563721	-19.7
14	7	-2.54802	-14.4	-2.5563722	-19.7
15	8	-2.54375	-11.8	-2.5476001	-14.2
16	9	-2.54287	-11.2	-2.5447263	-12.4
17	10	-2.53834	-8.4	-2.5483690	-14.7
18	11	-2.53064	-3.5	-2.5424618	-10.9

Tabla 13: Optimización de energía de los conformeros generados para la orientación A con el funcional B3lyp/6-31G en el vacío.

CONFORMEROS CONSIDERADOS	ORIENTACIÓN A (DISTANCIA EN Å DESDE LOS ATOMOS DE REFERENCIA)	OPTIMIZACION DE ENERGIA DFT B3LYP/6-31G RESTRAINT (HT)	ENERGIA DE COMPLEJACION (Kcal/mol)	REOPTIMIZACION DE ENERGIA DFT B3LYP/6-31G SIN RESTRAINT (HT)	ENERGIA DE COMPLEJACION (Kcal/mol)
4	-2	-5565.986604	24.95		
5	-1	-5565.99086	22.28		
7	1	-5566.003538	14.32		
8	2	-5566.006419	12.51		
9	3	-5565.997294	18.24	-5566.011707	9.20
10	4	-5566.021071	3.32	-5566.0427	-10.25
11	5	-5566.03747	-6.97	-5566.043347	-10.66
12	6	-5566.033639	-4.57	-5566.039659	-8.34
14	8	-5566.029356	-1.88		
15	9	-5566.030505	-2.60		

Tabla 14: Optimización de energía de los conformeros generados para la orientación B con el funcional B3lyp/6-31G en el vacío.

CONFORMEROS CONSIDERADOS	ORIENTACIÓN B (DISTANCIA EN Å DESDE LOS ATOMOS DE REFERENCIA)	OPTIMIZACIÓN DE ENERGIA DFT B3LYP/6-31G RESTRAINT (HT)	ENERGIA DE COMPLEJACIÓN (Kcal/mol)	REOPTIMIZACIÓN DE ENERGIA DFT B3LYP/6-31G SIN RESTRAINT (HT)	ENERGIA DE COMPLEJACIÓN (Kcal/mol)
8	1	-5566.021526	3.0	-5566.030425	-2.550
9	2	-5566.032013	-3.5		
10	3	-5566.03577	-5.9	-5566.049016	-14.216
11	4	-5566.029874	-2.2	-5566.03856	-7.655
12	5	-5566.039563	-8.3		
13	6	-5566.033378	-4.4	-5566.040843	-9.088
14	7	-5566.028627	-1.4	-5566.053594	-17.089
15	8	-5566.040035	-8.6	-5566.053596	-17.090
16	9	-5566.050348	-15.1	-5566.053598	-17.092
17	10	-5566.048034	-13.6	-5566.053595	-17.090

Tabla 15: Cálculo de energía del tipo singlepoint de los conformeros generados para la orientación A con los funcionales de Grimme y de Truhlar en el vacío.

CONFORMEROS CONSIDERADOS	ORIENTACIÓN A (DISTANCIA EN Å DESDE LOS ATOMOS DE REFERENCIA)	ENERGIA DE COMPLEJACIÓN (Kcal/mol)	<i>SINGLEPOINT</i> DFT B3LYP/6-31+G**-D3 (HT)	ENERGIA DE COMPLEJACIÓN (Kcal/mol)	<i>SINGLEPOINT</i> M05-2x/6-31+G** (HT)	ENERGIA DE COMPLEJACIÓN (Kcal/mol)
9	3	9.20				
10	4	-10.25				
11	5	-10.66	-5568.430354	-24.449	-5567.483352	-14.466
12	6	-8.34				

Tabla 16: Cálculo de energía del tipo singlepoint de los conformeros generados para la orientación B con los funcionales de Grimme y de Truhlar en el vacío.

CONFORMEROS CONSIDERADOS	ORIENTACIÓN B (DISTANCIA EN Å DESDE LOS ATOMOS DE REFERENCIA)	<i>SINGLEPOINT</i> DFT B3LYP/6-31+G**-D3 (HT)	ENERGIA DE COMPLEJACIÓN (Kcal/mol)	<i>SINGLEPOINT</i> M05-2x/6-31+G** (HT)	ENERGIA DE COMPLEJACIÓN (Kcal/mol)
15	8	-5568.4277908	-22.8405		
16	9	-5568.4277963	-22.8439	-5567.481976	-13.6025
17	10	-5568.4277909	-22.8405		

