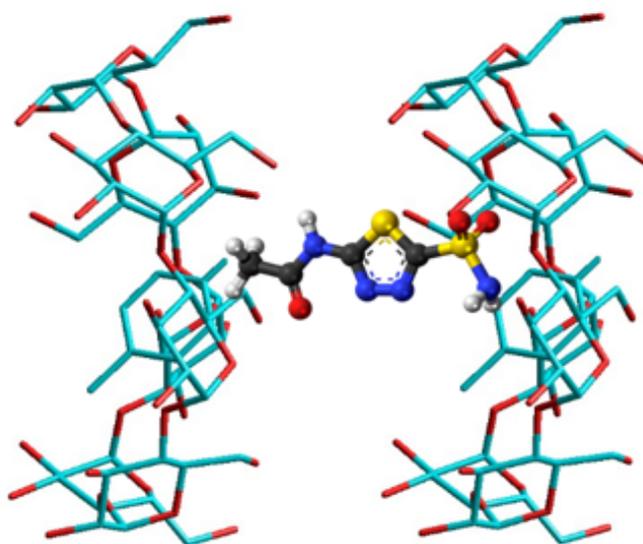




# UNIVERSIDAD DE SEVILLA

## Facultad de Farmacia

### Modelización molecular de complejos de inclusión de Ciclodextrinas con Acetazolamida



Cristina Ortega Miranda

DEPARTAMENTO DE  
FARMACIA Y TECNOLOGÍA  
FARMACÉUTICA



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Farmacia

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN FARMACIA

MODELIZACIÓN MOLECULAR DE COMPLEJOS DE  
INCLUSIÓN DE CICLODEXTRINAS CON ACETAZOLAMIDA

CRISTINA ORTEGA MIRANDA

Sevilla, 6 Julio 2016. Facultad de Farmacia, Aula multimedia.

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.

Prof. Dr. José Ramón Moyano Méndez.

Trabajo experimental.

## Resumen

---

Las ciclodextrinas (CDs) son oligómeros cíclicos constituidos por seis, siete, ocho o más unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranososa unidos por enlaces 1-4. Se obtienen por una reacción de degradación de la enzima ciclodextrin-glucotransferasa sobre el almidón. Tanto las CDs naturales como sus diferentes derivados poseen la capacidad de formar compuestos de inclusión con una amplia variedad de especies químicas, modificando las propiedades fisicoquímicas de las mismas de forma ventajosa. Este fenómeno constituye la base de múltiples aplicaciones en el campo de la Medicina, Farmacia, Química, Agricultura, Alimentación y Medio ambiente, entre otras.

En la actualidad, en nuestro departamento se están estudiando diferentes aspectos de la complejación de ACZ con CDs, con objeto de aumentar su solubilidad y permitir la incorporación de una mayor concentración de fármaco en el desarrollo de un medicamento solución oftálmica para tratamiento del glaucoma. En este trabajo, intentaremos profundizar el conocimiento de las interacciones entre ACZ y una serie de CDs, en concreto  $\beta$ -CD e hidroxipropil  $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD) al formar complejos de inclusión a través de modelización molecular (*in silico*), mediante el uso de software de modelización molecular. Para ello, se acudió al empleo de mecánica molecular (campo de fuerza MM+ en el vacío), complementándose con la aplicación de métodos semiempíricos de mecánica cuántica (Parametric Model 3). Para la correcta realización de esta técnica y así poder hallar el mínimo global de energía, fue necesario partir de estructuras de mínima energía de los monómeros (fármacos y CDs). Los resultados obtenidos sugieren la formación de complejos estables y por tanto viables, para los cuales se observó que los puentes de hidrógeno jugaban un papel muy importante. En general, los valores de diferencial de energía HOMO-LUMO se hallaron en buena correlación con los valores de energía de complejación e interacción confirmando también la estabilidad de los complejos.

**Palabras clave:** acetazolamida, ciclodextrina, complejo de inclusión, modelización molecular.

# Índice

---

1. Introducción y antecedentes.....	4
1.1. Historia y características de las ciclodextrinas.....	4
1.2. Complejos de inclusión.....	8
1.3. Métodos de elaboración de complejos de inclusión.....	10
1.4. Aplicaciones de los complejos de inclusión.....	11
1.5. Modelización molecular.....	14
2. Objetivos.....	17
3. Metodología.....	18
4. Resultados.....	21
5. Discusión.....	24
6. Conclusiones.....	29
7. Bibliografía.....	30

# 1. Introducción y antecedentes

---

## 1.1. Historia y características de las ciclodextrinas

Las ciclodextrinas (CDs) son un conjunto de sustancias obtenidas a partir de la degradación enzimática del almidón. Las CDs pertenecen a la familia de moléculas cuya estructura se compone de una cavidad hidrófoba dimensionalmente estable que puede atrapar o encapsular otras moléculas. Las notables propiedades de encapsulación conducen a una relación de tipo "hospedador-huésped" que se pueden modificar y / o mejorar las características físicas, químicas, y biológicas de la molécula huésped (Crini, 2014).

La historia de las CDs se inició en Francia a finales del siglo XIX con la labor del farmacéutico y químico Antoine Villiers sobre la acción de las enzimas en diversos hidratos de carbono; en particular, los estudios que utilizan las procedentes del *Clostridium butyricum* sobre la de fécula de patata. Villiers describe que, bajo ciertas condiciones, el almidón de patata puede fermentar para producir principalmente dextrinas. En junio de 1891, Villiers describe la composición química de estos hidratos de carbono cristalinos y propuso el nombre de "celulosina" debido a las similitudes con la celulosa (Crini, 2014).

A principios del siglo pasado en Viena, el químico y bacteriólogo austríaco Franz Schärddinger, estudió los microorganismos resistentes al calor y tenía como objetivo mejorar la comprensión de la química y la degradación del almidón. En 1903, descubrió que un tipo de microorganismo muy resistente al calor era capaz de disolver el almidón y formar subproductos cristalinos, distinguiendo dos tipos de polisacáridos a los que llamó dextrina cristalina A y dextrina cristalina B. La forma B se parecía celulosina de Villiers. Entre 1905 y 1911, Schärddinger da la primera descripción detallada de la preparación, separación y purificación de estas dos primeros celulosinas (Crini, 2014).

En 1910, Hans Pringsheim, químico y bioquímico alemán, aisló  $\alpha$ -dextrinas y  $\beta$ -dextrinas puras, y describió sus propiedades fundamentales, confirmando las conclusiones previamente publicadas por Schärddinger. También mostró que las dos dextrinas eran solubles en agua, pero insolubles en alcohol, éter y cloroformo, y éstas no se reducían en la solución de Fehling. Además, Pringsheim descubre el poder complejante de estos compuestos y su capacidad para formar compuestos de inclusión (Crini, 2014).

Estudios posteriores revelaron que las CDs están formadas por seis, siete, ocho o más unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosas unidos por enlaces 1-4, y se producen por una reacción de degradación de la enzima ciclodextrin-glucotransferasa sobre el almidón (Martín del Valle, 2004).

Por tanto, las CDs son oligómeros cíclicos que contienen varias unidades de glucosa unidas por medio de enlaces  $\alpha$  (1-4) conformando un anillo. Poseen un extremo que contiene grupos hidroxilo primarios, otro extremo con grupos hidroxilos secundarios y en el interior de la cavidad los grupos CH y oxígenos glucosídicos. El extremo donde se sitúan los grupos hidroxilo primarios tiene un diámetro reducido comparado al extremo donde se encuentran los grupos hidroxilo secundarios. Estos extremos de la CD que contienen los grupos hidroxilo son polares, mientras que su interior es relativamente no polar. Una cualidad que caracteriza a las CDs es la forma toroidal que delimita una cavidad apolar, mientras que en el exterior el ambiente es hidrófilo, gracias a los hidroxilos previamente descritos (Jullian, 2007) (Figuras 1 y 2).

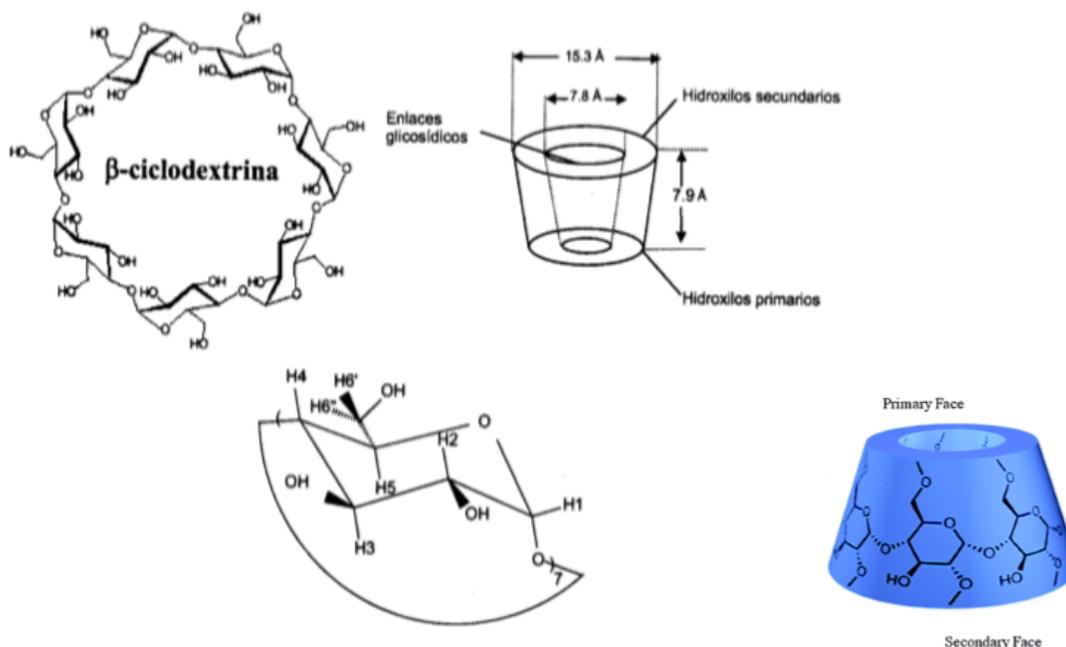
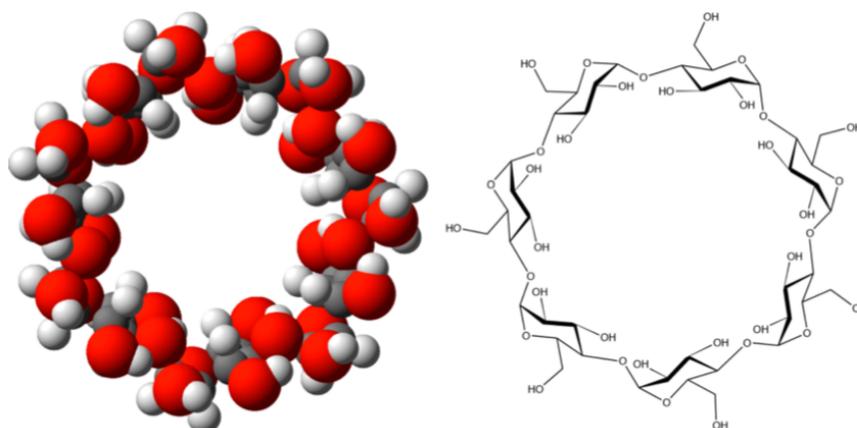


Figura 1. Estructura química y dimensiones aproximadas de la beta-CD (Martínez y Gómez, 2007).



**Figura 2. Estructura beta-CD: Modelo molecular de Stuart (izquierda) y estructura (derecha) (Crini, 2014).**

Los hidroxilos secundarios -OH (3) son los menos reactivos, pudiendo reaccionar selectivamente cuando los -OH (2) y -OH (6) han sido bloqueados previamente. Como consecuencia de que los grupos hidroxilo libres están situados en el exterior de la superficie de los anillos, las CDs son hidrófilas y solubles en agua y su solubilidad es el resultado de la capacidad de interacción de dichos grupos hidroxilo con el medio acuoso, siendo mayor para la  $\gamma$ -CD y la  $\alpha$ -CD. Las CDs son igualmente solubles en disolventes apróticos fuertemente polares, como el dimetilsulfóxido y la dimetilformamida. Las CDs son estables en disoluciones neutras y básicas, pero se degradan lentamente en pH ácido. En estado sólido se descomponen por encima de 200 °C (Martínez y Gómez, 2007).

Los grupos hidroxilo de las CDs son reactivos y permiten mediante síntesis química la obtención de derivados mediante la introducción de diferentes sustituyentes, que alteran de forma significativa las propiedades de las CDs de origen. (Cyclolab, 2016; Szejtli, 1998; Uekama y cols., 1998) (Figura 3).

Cyclodextrin (CD)	Abbreviation
$\alpha$ - cyclodextrin	$\alpha$ - CD
$\beta$ - cyclodextrin	$\beta$ - CD
$\gamma$ - cyclodextrin	$\gamma$ - CD
Hydroxyethyl- $\beta$ -CD	HE - $\beta$ -CD
Hydroxypropyl- $\beta$ -CD	HP- $\beta$ -CD
Sulfobutylether- $\beta$ -CD	SBE- $\beta$ -CD
Methyl- $\beta$ -CD	M- $\beta$ -CD
Dimethyl- $\beta$ -CD	DM- $\beta$ -CD (DIMEB)
Randomly dimethylated - $\beta$ -CD	RDM- $\beta$ -CD
Randomly methylated- $\beta$ -CD	RM- $\beta$ -CD (RAMEB)
Carboxymethyl - $\beta$ -CD	CM- $\beta$ -CD
Carboxymethyl ethyl- $\beta$ -CD	CME- $\beta$ -CD
Diethyl- $\beta$ -CD	DE- $\beta$ -CD
Tri-O-methyl- $\beta$ - CD	TRIMEB
Tri-O-ethyl- $\beta$ -CD	TE- $\beta$ -CD
Tri-O-butyryl- $\beta$ -CD	TB- $\beta$ -CD
Tri-O-valeryl- $\beta$ -CD	TV- $\beta$ -CD
Di-O-hexanoyl- $\beta$ -CD	DH- $\beta$ -CD
Glucosyl- $\beta$ -CD	G <sub>1</sub> - $\beta$ -CD
Maltosyl- $\beta$ -CD	G <sub>2</sub> - $\beta$ -CD
2-hydroxy-3-trimethyl-ammoniopropyl- $\beta$ -CD	HTMAPCD

**Figura 3. Derivados más usuales de las CDs (Cyclolab, 2016).**

Entre las modificaciones más ventajosas están la reducción de toxicidad, el aumento de solubilidad intrínseca, la mejora de la selectividad en proceso de separación química/catálisis, la formación de polímeros de CDs, etc.

Uno de los derivados más utilizados son las CDs hidroxipropilados, que poseen una alta solubilidad y baja toxicidad con respecto a las CDs de origen, lo cual las hace un candidato ideal para la vehiculización de principios activos de baja solubilidad en soluciones parenterales y oftálmicas, entre otras. Con diferentes grados de sustitución, destaca la hidroxipropil  $\beta$ -CD, una de las CDs que formarán parte de este estudio.

Asimismo, los derivados sulfobutiléter y metilados ocupan un lugar destacado en cuanto a su uso y potencialidades (Stella Rajewsky, 1994, Szejtli, 1998).

## 1.2. Complejos de inclusión

El término "einschlussverbindurg" (compuesto de inclusión) fue introducido por Schlenk en 1950; también se conoce en la literatura a través de otras denominaciones, tales como aducto, clatrato, compuesto molecular y complejo (Szejtli, 1998).

Los complejos de inclusión son sistemas que presentan la estructura de un clatrato, es decir una molécula que contiene un segundo tipo de molécula. El compuesto huésped se sitúa en la cavidad del hospedador sin alterar su estructura de forma significativa pudiendo formar compuestos cristalinos a partir de moléculas en cualquier estado de la materia (Szejtli, 2004).

En medio acuoso la cavidad de la CD se halla ocupada por moléculas de agua. Al ser esta de carácter apolar se produce una interacción desfavorable, por lo que es fácil que estas moléculas de agua sean sustituidas por moléculas huésped menos polares, lo que da lugar al complejo de inclusión (Szejtli, 2004).

La formación de puentes de hidrógeno permite que las CD puedan interactuar entre sí, pudiendo dar lugar a dímeros, lo que favorece la unión con moléculas hidrófobas de gran tamaño como los esteroides y esteroides (Loftsson y cols., 2006). También se puede dar la unión de varias CD dando lugar a un sistema polimérico (Wintgens y cols., 2012). La formación de complejos de inclusión de moléculas de fármaco con CDs suele ir acompañada de cambios favorables en las propiedades fisicoquímicas del fármaco, tales como la solubilidad, velocidad de disolución, la estabilidad y la biodisponibilidad (Al Azzam y cols., 2015)

La estequiometría más común de los complejos de fármaco-CD es 1: 1, es decir, una molécula de fármaco forma un complejo con una molécula de CD. La estequiometría de los complejos en estado puro depende solamente de la naturaleza de la sustancia a complejar y de las dimensiones de la cavidad de la CD o sus sustituyentes. Así, no sólo podemos encontrar en solución complejos de estequiometría 1:1, sino también 1:2, 2:1, ó 2:2. En solución, el equilibrio de asociación-disociación, así como la concentración del huésped y/o de CD, determina la relación forma libre/forma complejada para el huésped y la CD (Loftsson y cols., 2004).

La gran importancia de las CDs reside en su capacidad de formar complejos de inclusión de forma selectiva con otras moléculas, iones e incluso radicales, modificando dicha unión las propiedades de las moléculas huésped y hospedadora (Dodziuk, 2006).

Los complejos de inclusión se forman cuando la molécula "invitada" está parcial o totalmente incluida dentro de la "cavidad de acogida". Debido a la cavidad hidrofóbica, las CDs ofrecen al huésped un ambiente adecuado para la interacción. La esfera exterior de las CDs es compatible con el agua, lo que permite la unión mediante puentes de hidrógeno. Debido a esta característica, las CDs forman complejos de inclusión con una amplia variedad de compuestos hidrófobos y cambian las propiedades fisicoquímicas y biológicas de las moléculas huésped. Estos cambios pueden mejorar el potencial terapéutico de los fármacos por la disminución de su descomposición antes de que entren los tejidos y mediante la alteración de la forma en que entran en el tejido. (Gidwani y Vyas, 2015).

Puesto que la formación de complejos influirá en las propiedades fisicoquímicas de los medios de complejación acuosa, los métodos que monitorizan estos cambios de los medios se pueden aplicar para estudiar la formación de complejos. Por ejemplo, las mediciones de los cambios de conductividad, determinaciones de depresión del punto de congelación, las medidas de viscosidad y titulaciones calorimétricas. Sin embargo, sólo unos pocos de estos métodos se pueden aplicar para obtener información estructural de los complejos de fármaco / CD. Para clasificar los complejos basándonos en su efecto sobre la solubilidad del sustrato, se usan los perfiles de solubilidad de fase (Higuchi y Connors, 1965; Loftsson y cols., 2002) (Figura 4).

Los perfiles de solubilidad de fase tipo A se obtienen cuando la solubilidad del sustrato aumenta con el aumento de la concentración de ligando (es decir CD). Cuando el complejo es de primer orden con respecto al ligando y primero o superior orden con respecto al sustrato, los perfiles de solubilidad de fase se obtienen de tipo  $A_L$ . Si el complejo es de primer orden con respecto al sustrato pero de segundo o más alto orden con respecto al ligando, se obtienen perfiles de solubilidad de fase de tipo  $A_P$ . Los perfiles de solubilidad de fase de tipo  $A_N$  pueden ser difíciles de interpretar. Los perfiles de solubilidad de fase de tipo B indican la formación de complejos con solubilidad limitada en el medio de complejación acuosa. En general, los derivados de CD solubles en agua forman perfiles de solubilidad de fase de tipo A, mientras que las CDs naturales menos solubles con frecuencia forman perfiles de tipo B. En el primer punto de la curva tipo B la solución está saturada, lo que produce la formación de una meseta en la gráfica al añadir más CD. El final de la meseta corresponde con una precipitación del complejo debido a la adición de CD extra. Se cree que la mayoría de los complejos de fármaco / CD son complejos de inclusión, pero también se conocen CDs para formar complejos de no inclusión y agregados de complejos capaces de disolver medicamentos a través de estructuras de tipo micela. Los perfiles de solubilidad de fase no verifican

la formación de complejos de inclusión, sólo describen cómo la creciente concentración de CD influyen en la solubilidad del fármaco (Loftsson y cols., 2002).

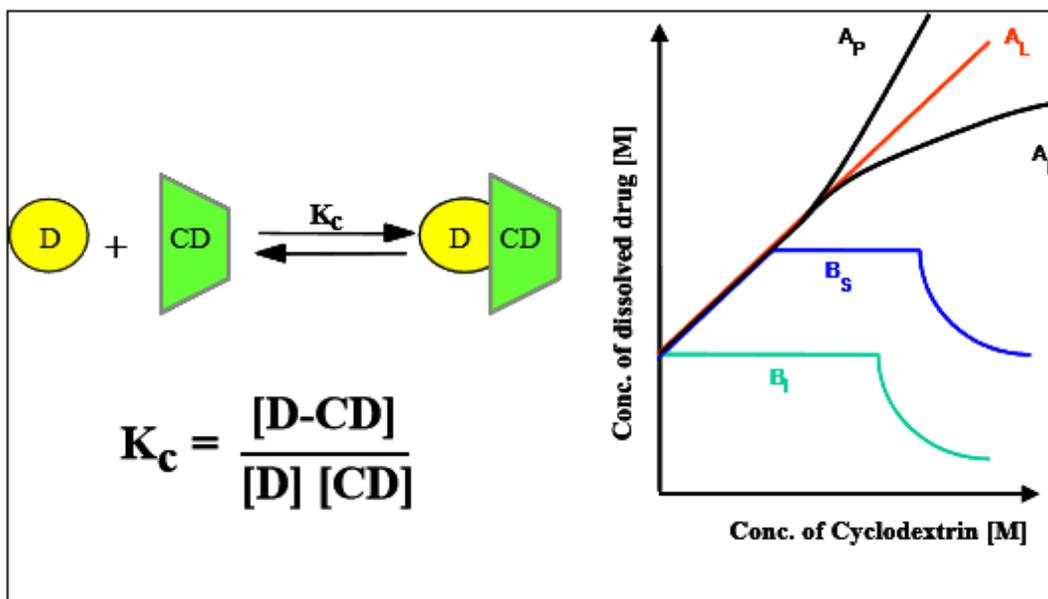


Figura 4. Diagrama de solubilidad de fases (Loftsson y cols., 2002)

### 1.3. Métodos de elaboración de complejos de inclusión

Los métodos de elaboración de los complejos de inclusión recogidos en la bibliografía son muy diversos. Sin embargo, éstos pueden ser agrupados en distintos tipos, pudiendo presentar cada uno de ellos diferentes variantes. A continuación se exponen los más usuales (Moyano y cols., 1994; 1995).

#### 1.3.1. Preparación de complejos en medio líquido:

##### 1.3.1.1. Preparación en solución:

- Coprecipitación: La mezcla se somete a agitación a temperatura constante hasta alcanzar el equilibrio. El complejo precipita en forma de un polvo microcristalino, se filtra y se seca (Moyano y cols., 1998).
- Neutralización: Consiste en adicionar a una solución ácida o básica de CD, el principio activo en forma de sal, se ajusta el pH del medio a la neutralidad y el precipitado obtenido se filtra y se somete a secado (Moyano y cols., 1998).

- Atomización: Se basa en preparar una solución de la CD y del principio activo en agua o disolvente orgánico, se somete a agitación durante, tras la cual es introducida en un atomizador (Spray-Dryer), donde es nebulizada en forma de gotículas a alta temperatura, evaporándose el disolvente y recogiéndose las partículas de soluto.
- Liofilización: Se procede de la misma forma que en el método anterior, pero en este caso la solución se liofiliza, aislándose el compuesto de inclusión.
- Evaporación (co-evaporación): Consiste en preparar una solución, generalmente etanólica, de la CD y del principio activo en proporciones molares enteras (1:1, 1:2 3:4), se somete a agitación y se deja evaporar el disolvente.

#### 1.3.2. Preparación de complejos en medio sólido:

- Amasado: se usa en fármacos de baja solubilidad. La mezcla de principio activo y CD junto con una solución acuosa o hidroalcohólica se amasa en un mortero y la masa posteriormente se seca hasta la evaporación completa del líquido. (Hirayama y cols., 1988).
- Trituración: Consiste en la trituración de la mezcla de CD y principio activo mediante diferentes técnicas (molino vibracional, molino cerámico, mortero, etc.) (Mura y cols., 2001).
- Fusión: Mediante fusión del principio activo, al que se adiciona la CD pulverizada. Tras enfriamiento, el exceso es retirado por lavado con un disolvente que posea baja tendencia a incluirse en la cavidad de la CD.
- Calentamiento en contenedor sellado: Consiste en introducir una mezcla triturada de CD y principio activo en un recipiente cerrado, se somete a agitación y calentamiento a una temperatura y tiempo definidos.
- Método de compactación: Se basa en someter una mezcla física de fármaco y CD a la acción de una prensa hidráulica, dando lugar a la formación del compuesto de inclusión.

## 1.4. Aplicaciones de los complejos de inclusión

Es conocido y ampliamente descrito en la literatura que las CDs y sus derivados tienen una amplia variedad de aplicaciones prácticas: Farmacia, Medicina, Alimentación, Cosmética, Química, Catálisis, Biotecnología, Industria textil, etc. La investigación sobre CDs también es muy activa en campos tales como la formulación de detergentes y adhesivos, el sector de los plásticos y la industria de fibras y papel. La gran mayoría de estas aplicaciones químicas y biológicas se basan en la capacidad de formar complejos de inclusión (Crini, 2014).

Los campos de aplicación son diversos. Destacamos el empleo de CDs, aunque asociadas a sistemas poliméricos, para la purificación de aguas. Existen importantes proyectos internacionales que intentan desarrollar sistemas que permitan eliminar sustancias contaminantes (metales pesados y pesticidas) a través de CDs funcionalizadas que retendrían moléculas hidrofóbicas presentes en el medio acuoso (Martínez y Gómez, 2007).

Un importante porcentaje de CDs usadas comercialmente corresponde a la alimentación y a la cosmética y aseo personal como, por ejemplo, la eliminación de olores formados en la degradación microbiana del sudor, incorporándose con este fin en desodorantes de barra (Martínez y Gómez, 2007).

Sin embargo, es indudable que el mayor esfuerzo en investigación está relacionado con su potencial en el campo farmacéutico (Tabla 1). La inmensa mayoría de los principios activos son poco solubles en agua y, consecuentemente, su velocidad de disolución y su absorción biológica es lenta y frecuentemente poco eficaz. La solubilización de fármacos poco solubles mediante el empleo de CDs contribuye decisivamente a la mejora de su biodisponibilidad (Carrier y cols., 2007; Uekama y cols., 1998) (Figura 5).

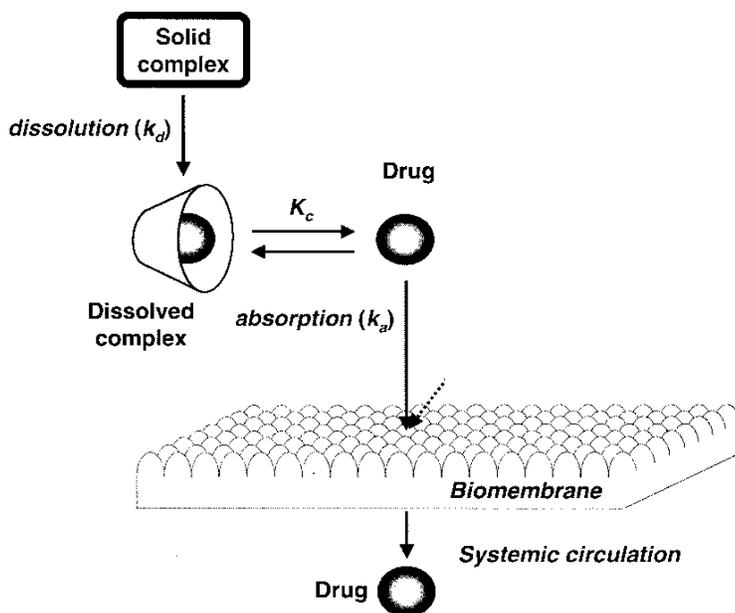


Figura 5. Efecto de la complejación con CDs sobre la biodisponibilidad de API tras administración no parenteral (Uekama y cols., 1998).

Otros principios activos son sensibles a la oxidación o hidrólisis y pueden descomponerse por la luz y el calor. Muchas de estas moléculas son capaces de formar fácilmente complejos con las CDs, por lo que la mayoría de sus limitaciones de uso pueden quedar solventadas mediante dicha asociación (Martínez y Gómez, 2007). De forma general, la situación de máxima absorción del fármaco se alcanza con la mínima cantidad de CD que es capaz de solubilizar todo el fármaco en disolución, mientras que la adición de mayor cantidad de CD disminuye la cantidad de fármaco libre y por tanto de su biodisponibilidad (Uekama y cols., 1998).

**Tabla 1. Ejemplos de medicamentos comercializados que contienen CDs (Loftsson y cols., 2005).**

<b>Drug</b>	<b>Administration route</b>	<b>Trade name</b>	<b>Market</b>
<b><math>\alpha</math>-Cyclodextrin</b>			
Alprostadil (PGE <sub>1</sub> )	IV	Prostavastin	Europe, Japan, USA
Cefotiam hexetil HCl	Oral	Pansporin T	Japan
<b><math>\beta</math>-Cyclodextrin</b>			
Benexate HCl	Oral	Ulgut, Lonmiel	Japan
Dexamethasone	Dermal	Glymesason	Japan
Iodine	Topical	Mena-Gargle	Japan
Nicotine	Sublingual	Nicorette	Europe
Nimesulide	Oral	Nimedex, Mesulid	Europe
Nitroglycerin	Sublingual	Nitropen	Japan
Omeprazol	Oral	Omebeta	Europe
PGE <sub>2</sub>	Sublingual	Prostarmon E	Japan
Piroxicam	Oral	Brexin	Europe
Tiaprofenic acid	Oral	Surgamyl	Europe
<b>2-Hydroxypropyl-<math>\beta</math>-cyclodextrin</b>			
Cisapride	Rectal	Propulsid	Europe
Hydrocortisone	Buccal	Dexocort	Europe
Indomethacin	Eye drops	Indocid	Europe
Itraconazole	Oral, IV	Sporanox	Europe, USA
Mitomycin	IV	Mitozytrex	USA
<b>Randomly methylated <math>\beta</math>-cyclodextrin</b>			
17 $\beta$ -Estradiol	Nasal spray	Aerodiol	Europe
Chloramphenicol	Eye drops	Clorocil	Europe
<b>Sulfobutylether <math>\beta</math>-cyclodextrin</b>			
Voriconazole	IV	Vfend	Europe, USA
Ziprasidone maleate	IM	Geodon, Zeldox	Europe, USA
<b>2-Hydroxypropyl-<math>\gamma</math>-cyclodextrin</b>			
Diclofenac sodium	Eye drops	Voltaren	Europe

## 1.5. Modelización molecular

La modelización molecular es la ciencia de estudiar la estructura molecular y su función a través de la construcción de modelos y la computación. La construcción de modelos puede ser tan simple como moldes de plástico o varillas de metal, o tan sofisticado e interactivo como, gráficos animados en color y esculturas de fabricación láser de madera. (Schlick, 2010).

Los primeros cálculos en este campo se remontan a 1946, cuando Frank Westheimer calculó el índice de racemización de derivados bifenilo. A principios de 1960, se comienzan a desarrollar campos de fuerza de forma sistemática en varias instituciones. A comienzos de los años setenta del siglo pasado, Rahman y Stillinger publican el primer trabajo en dinámica molecular de una molécula polar, el agua. A finales de esta década se empiezan a desarrollar técnicas para el uso de campos de fuerza de mecánica molecular como método de minimización energética (Schlick, 2010).

El apasionante campo de la modelización de sistemas moleculares por ordenador ha atraído la atención de científicos de diversas disciplinas. En particular, el modelado de grandes polímeros biológicos -proteínas, ácidos nucleicos y lípidos- es verdaderamente multidisciplinar. Los biólogos describen la imagen celular; Los químicos avanzan en los detalles atómicos y moleculares; los físicos extienden su visión a nivel electrónico y las fuerzas subyacentes; los matemáticos se centran en el análisis y formulación de modelos y algoritmos numéricos apropiados; y los ingenieros proporcionan el soporte de puesta en práctica fundamental para el funcionamiento de los programas de ordenador en plataformas de alta velocidad de procesamiento (Schlick, 2010).

Una de las primeras metas de la modelización molecular es la determinación de la estructura molecular óptima asociada a la mínima energía. A partir de esta información es posible obtener la mayoría de propiedades físicas y químicas. Este mínimo de energía (mínimo global) corresponde a la estructura más estable, mientras que los mínimos locales hacen referencia a estados de transición (Schlick, 2010) (Figura 6).

Entre las muchas aplicaciones de la modelización molecular cabe destacar la capacidad de diseñar nuevas moléculas pudiendo predecir su comportamiento y propiedades físicoquímicas, predecir la estructura y plegamiento de proteínas, predecir el efecto de sustituyentes en moléculas ya conocidas, estudio de catálisis enzimática, etc. (Schlick, 2010).



**Figura 6. Mínimos de energía local y global (Schlick, 2010).**

Los programas usados en modelización molecular utilizan modelos matemáticos basados en la mecánica molecular o en la mecánica cuántica para llevar a cabo los cálculos necesarios en el estudio de la estructura molecular. Uno de los métodos más usado tanto por su simplicidad como por su eficacia es el de la mecánica molecular (Schlick, 2010).

La mecánica molecular se desarrolló por primera vez a principios de 1970 por dos grupos de investigadores químicos: el grupo Engler, Andose, y Shleyer, y el grupo Allinger.

La mecánica molecular se basa en la mecánica clásica o newtoniana, asumiendo que los electrones están fijos y calcula la posición de los núcleos interpretando que la molécula es una colección de partículas unidas entre sí por fuerzas elásticas (Comba y cols., 2009). Por tanto, En la mecánica molecular se define un campo de fuerza mecánica que se utiliza para calcular una energía de la molécula en estudio. La energía calculada a menudo se llama energía de deformación o energía estérica de la molécula. El campo de fuerza se compone de varios componentes, como la energía de enlace-estiramiento, energía de ángulo-flexión, y la energía de enlace-torsión (Pavia y cols., 2016).

Para calcular la energía de deformación final para una molécula, el ordenador cambia sistemáticamente cada longitud de enlace, ángulo de enlace y ángulo de torsión en la molécula, recalculando la energía de deformación cada vez, manteniendo cada cambio que minimiza la energía total, y rechazando los cambios que aumentan la energía. En otras palabras, todas las longitudes de enlace y ángulos se cambian hasta que se reduce al mínimo la energía de la molécula (Pavia y cols., 2016).

Por lo tanto, la mecánica molecular asume que la energía estérica de una molécula proviene de unas pocas interacciones específicas de la molécula. Estas interacciones incluyen la compresión y extensión de enlaces más allá de sus distancias y ángulos de equilibrio. Asimismo, se tienen en cuenta los efectos de torsión de enlaces simples, la interacción de Van der Waals entre átomos próximos entre sí y la interacción electrostática entre cargas parciales en una molécula con enlaces polares (Leach, 2001).

Se han desarrollado muchos métodos para acelerar el cálculo de este proceso de minimización. Estos métodos usan información de las derivadas de la función de energía potencial para calcular cambios en las coordenadas de cada etapa. El método de Newton-Raphson (basados en la segunda derivada) es uno de los más conocidos, existiendo otras con mayor complejidad como "Adopted Basis Newton-Raphson" (ABNR) o Newton-Raphson truncado (Jensen, 2007).

Junto a los métodos anteriores, los métodos de gradiente conjugado (basados en la primera derivada), tales como los algoritmos Fletcher-Reeves o Polak-Ribière, se emplean ampliamente en minimización energética (Comba y cols., 2009).

Es obvio que la mecánica molecular se desarrolló para encontrar la conformación de energía más baja de una molécula dada o para comparar las energías de varias conformaciones de la misma molécula. La mecánica molecular calcula una "energía de deformación", no las energías termodinámicas, tales como calor de formación. Se requieren procedimientos basados en la mecánica cuántica y la mecánica estadística para calcular las energías termodinámicas (Pavia y cols., 2016).

La Química Cuántica (aplicación de la Mecánica Cuántica a sistemas atómicos y moleculares) se basa en la resolución de la ecuación de Schrödinger. Debido a la complejidad de esa ecuación solo es posible su resolución para el átomo de hidrógeno, por lo que es necesario recurrir a aproximaciones que permitan obtener las funciones de onda de otros átomos y moléculas, un ejemplo es la aproximación de Born Oppenheimer. Esta consiste en la separación de los movimientos del núcleo

y los electrones y asume que los electrones se mueven en un campo generado por un núcleo fijo debido a la gran diferencia de masa y velocidad entre ambos (Doucet y cols., 1996).

Existen dos categorías de cálculos orbitales basados en Mecánica Cuántica: los métodos *ab initio* y los semiempíricos. *Ab initio* significa “desde el principio”, lo que implica que los cálculos por este método requieren datos de constantes físicas como la velocidad de la luz, la constante de Plank o la masa de partículas elementales. Esta usa las ecuaciones de Hartree-Fock y Roothaan-Hall sin aproximar o integrar ningún término Hamiltoniano. En contraposición, los métodos semiempíricos simplifican estas ecuaciones aproximando o ignorando parámetros, con el ahorro de tiempo de computación que esto conlleva (Schlick, 2010).

## 2. Objetivos

---

Este trabajo se centra en el estudio de las interacciones fármaco-CD con acetazolamida.

La acetazolamida (ACZ) es un inhibidor de la enzima anhidrasa carbónica y está indicada en el tratamiento de edemas asociados a insuficiencia cardíaca congestiva, edemas de origen medicamentoso y otros cuadros de retención hidrosalina. Puede administrarse en asociación con otros diuréticos cuando se necesite actuar a distintos niveles de la nefrona. Además también se indica en el tratamiento adyuvante del glaucoma de ángulo abierto y glaucoma secundario, el tratamiento preoperatorio del glaucoma agudo de ángulo cerrado, y el tratamiento adyuvante de la epilepsia (*petit mal*).

Existe una amplia literatura referente a la interacción de dichas moléculas con CDs, buscando mejorar la solubilidad y velocidad de disolución de la ACZ de forma que se redujese la variabilidad interindividual en la biodisponibilidad (Ammar y cols., 1998; Loftsson y cols., 1994).

En la actualidad, en nuestro departamento se están estudiando diferentes aspectos de la complejación de ACZ con CDs, con objeto de aumentar su solubilidad y permitir la incorporación de una mayor concentración de fármaco en el desarrollo de un medicamento solución oftálmica para tratamiento del glaucoma. En este trabajo, intentaremos profundizar el conocimiento de las interacciones entre ACZ y una serie de CDs, en concreto  $\beta$ -CD e hidroxipropil  $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD) al formar complejos de inclusión a través de modelización molecular (*in silico*), mediante el uso del software de modelización molecular.

### 3. Metodología

---

Los estudios de modelización molecular se han llevado a cabo mediante el empleo de los paquetes de software informáticos Hyperchem® versión 8.0.8 (Hypercube, 2016) y Gaussian 09W versión 9.0 y Gaussview 5.0 por mecánica molecular y cuántica (Gaussian 09 Rev.01, 2009, Gaussview, ver 5, 2009).

La estructura inicial de  $\beta$ -CD se obtuvo de la base de datos Protein Data Bank (Leila y cols., 2011). La construcción de la HP- $\beta$ -CD se llevó a cabo añadiendo sustituyentes 2-hidroxipropilo al esqueleto de  $\beta$ -CD obtenido de la PDB ID: 3CGT. Esta estructura se ensambló siguiendo las indicaciones de la “Cyclodextrin KnowledgeBase” (Hazai y cols., 2010). Por su parte, la estructura molecular de ACZ se construyó en Hyperchem.

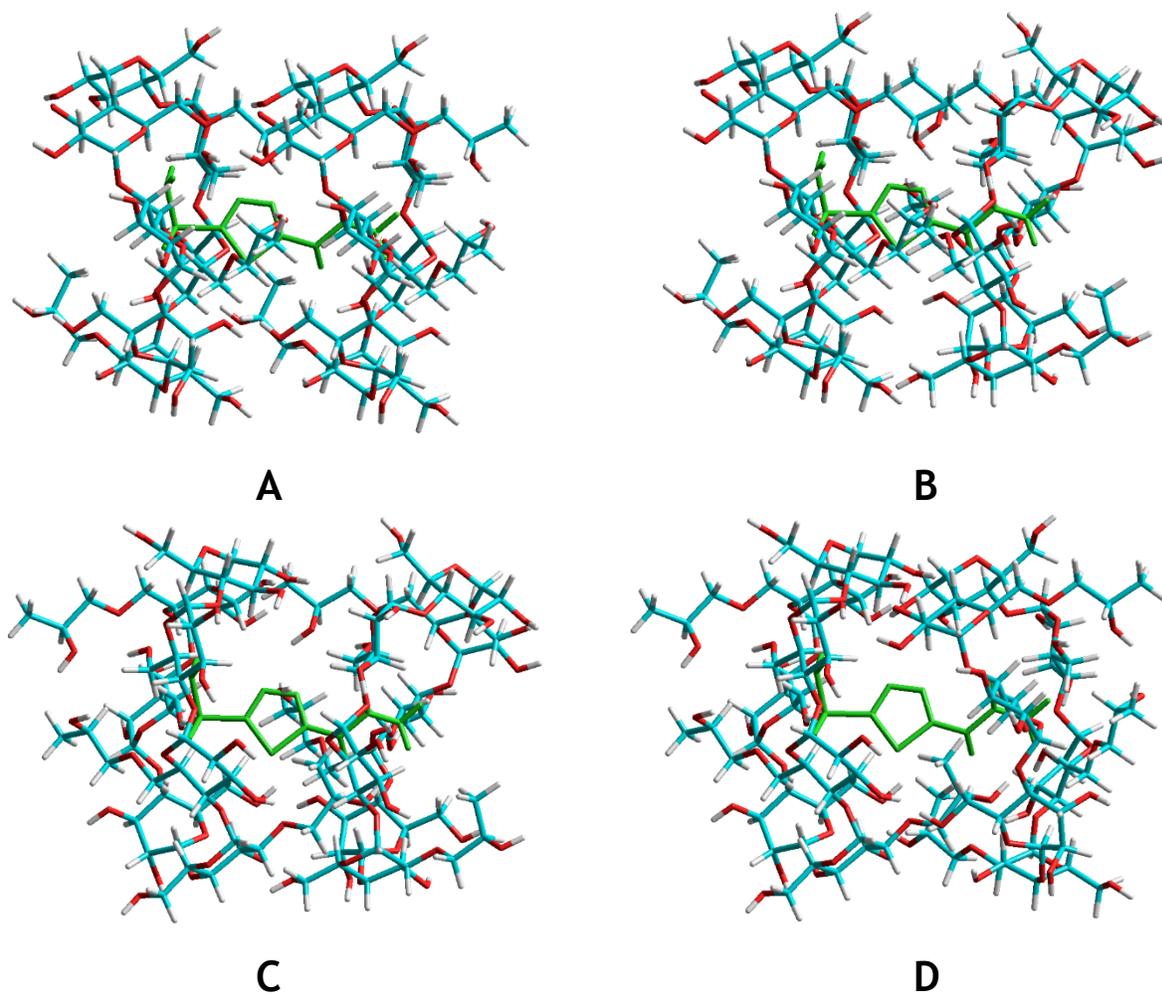
Para obtener la conformación más estable de las estructuras de CDs y la molécula huésped, que sirviesen como punto de partida válido para las simulaciones, se realizó un análisis conformacional utilizando el programa de búsqueda conformacional incluido en Hyperchem. Se establecieron las siguientes condiciones: la variación de la flexibilidad de los ángulos de torsión  $\pm 60^\circ \div \pm 180^\circ$ ; el criterio de energía para la aceptación de la conformación se fijó en 4 Kcal/mol sobre el mínimo; todas las conformaciones con distancias atómicas menores de 0,5 Å y diferencias entre ángulos de torsión menos de  $15^\circ$  no se consideraron, así como conformaciones con diferencias de energía menores de 0,05 Kcal/mol. El máximo número de optimizaciones y cálculos iterativos fue de 1000, hasta un máximo de 100 conformaciones. Los átomos de hidrogeno no se tuvieron en cuenta en el proceso (Pînzaru y cols., 2011).

El tratamiento se llevó a cabo usando el campo de fuerza MM+ presente en Hyperchem, teniendo el algoritmo Polak-Ribière, con un valor de convergencia de rms (media cuadrática) de 0,01 Kcal/ Å mol.

Las estructuras de las CDs y la ACZ obtenidas por MM+ se refinaron posteriormente mediante el empleo del método semiempírico PM3 (*Parametric Model 3*) incluido en Gaussian 09W. Se aplicó una optimización sin restricciones, con un valor de convergencia de 0,01 Kcal/ Å mol.

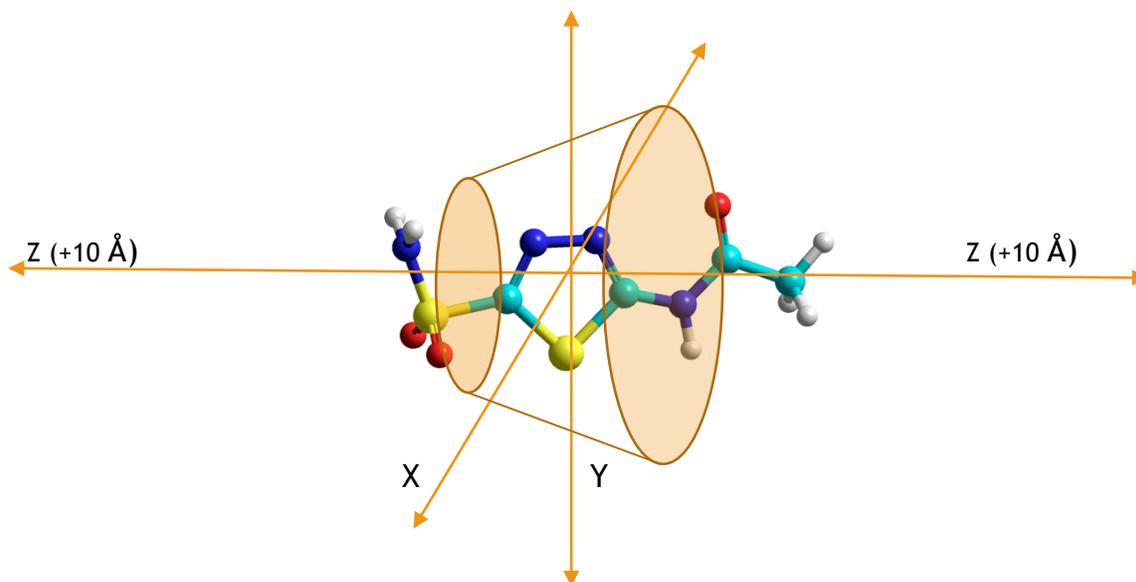
Con el fin de identificar la estructura de los complejos correspondientes a los mínimos globales de la energía potencial superficial de CDs, nuestros estudios se llevaron a cabo según el método descrito previamente en la literatura (Fathallah y cols., 1994). Posicionando la molécula en el origen del sistema de coordenadas la CD se orientó de manera que los átomos de oxígeno glucosídico se situasen en el plano XY.

Los grupos hidroxilos secundarios se orientaron en la dirección del eje Z. A continuación, la molécula huésped se situó a lo largo del eje z (desde -10 Å hasta +10 Å), teniendo en cuenta las diferentes orientaciones de la molécula huésped en el caso de que la CD tuviese varias posibilidades de interacción (hidroxilos secundarios hacia la derecha: orientación A; viceversa orientación B). En el caso de los complejos 1:2 hay cuatro orientaciones posibles (Figura 7).



**Figura 7. Posibles orientaciones del complejo ACZ-HP-β-CD 1:2.**

En un tercer paso, la molécula huésped se introduce y pasa a través de la CD por pasos (Figura 8). En cada paso de 1 Å se realiza una optimización de la geometría en vacío usando el campo de fuerza MM+ (algoritmo Polak-Ribière, con rms de 0,01 Kcal/ Å mol) registrándose la energía tras cada optimización. Dichas energías se representan frente a las coordenadas y se toma el estado de mínima energía para cada complejo fármaco-CD.

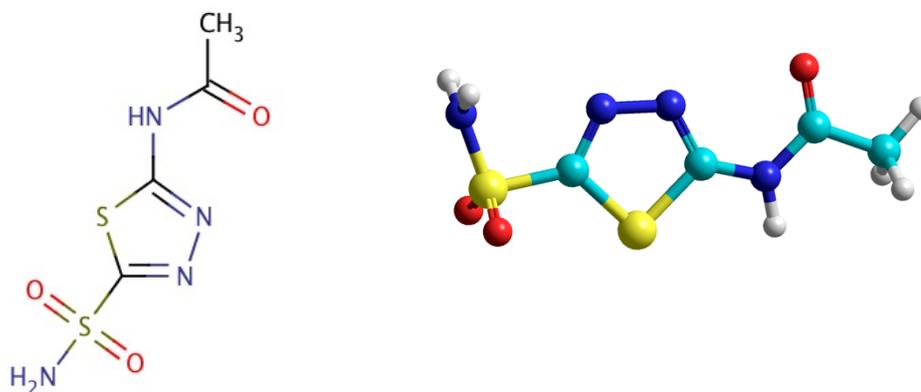


**Figura 8. Orientación tipo A del complejo AZC-CD. El huésped se desplaza por el eje Z en pasos de 1 Å.**

Así, los complejos más estables encontrados por MM+ se re-optimizaron por el método semiempírico PM3 sin restricciones. Para ello, se emplearon Gaussian 09W / Gausview 5 e Hyperchem versión 8.0.8.

## 4. Resultados

En la Figura 9 se representa el resultado del estudio de análisis conformacional correspondiente a la molécula de ACZ. La conformación de mínima energía corresponde a un valor de 43,383 Kcal/mol. Este valor corresponde a la minimización por MM+, siendo posteriormente refinado a PM3.



**Figura 9. Formula estructural y estructura refinada de ACZ.**

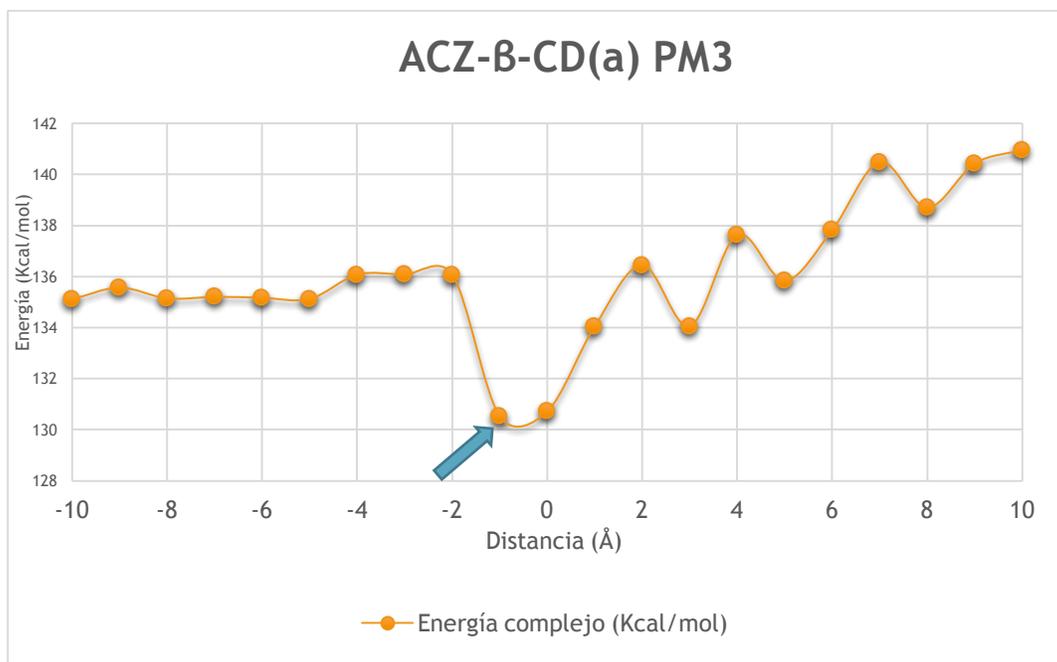
El cálculo de la energía de complejación se realizó tras la búsqueda del mínimo global de energía tal y como se describe en la sección de metodología. Como ejemplos de cálculo de mínimo global, adjuntamos las gráficas correspondientes a los complejos ACZ- $\beta$ -CD (a) PM3 y ACZ-HP- $\beta$ -CD (a) PM3 (Figuras 10 y 11).

Los resultados de minimización energética de los compuestos de inclusión se han presentado como energías de complejación, interacción y deformación (ver ecuaciones 1-3). La energía de complejación se define como la diferencia entre la energía del complejo y la suma de la energía de cada monómero en su respectivo equilibrio geométrico. La energía de interacción se define como la diferencia entre la energía del complejo y la suma de las energías de ambas moléculas en su geometría de complejo. La energía de deformación se determina como la diferencia entre la energía de uno de los miembros del complejo y su energía con la geometría que tendría si estuviese formando el complejo (Barbiric y cols., 2000; Ohashi y cols., 1990; Zhou y cols., 2009).

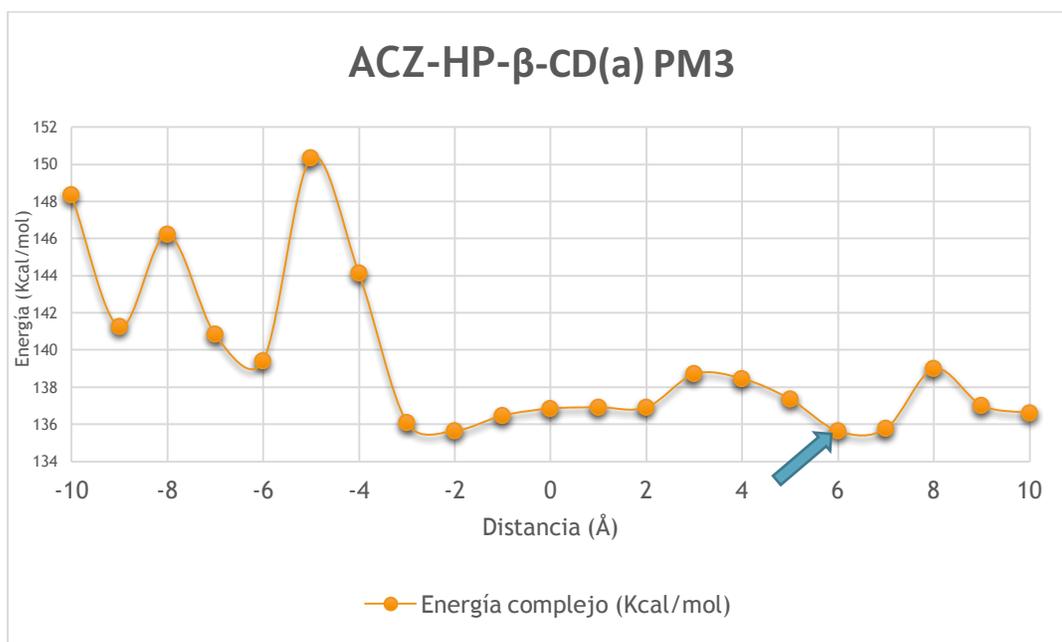
$$\Delta E_{\text{complejación}} = E_{\text{complejo}} - (E_{\text{CD libre}} + E_{\text{huésped libre}}) \quad \text{Eq. 1}$$

$$\Delta E_{\text{interacción}} = E_{\text{complejo}} - (E_{\text{CD en el complejo}} + E_{\text{huésped en el complejo}}) \quad \text{Eq. 2}$$

$$\Delta E_{\text{deformación CD}} = E_{\text{CD en el complejo}} - E_{\text{CD libre}} \quad \text{Eq. 3}$$



**Figura 10.** Evolución de la energías de complejo frente a la distancia para el compuesto de inclusión ACZ- $\beta$ -CD(a) PM3.



**Figura 11.** Evolución de la energías de complejo frente a la distancia para el compuesto de inclusión ACZ-HP- $\beta$ -CD(a) PM3.

A continuación se muestran los resultados de energía potencial superficial (SEP) expresados en kcal/mol de los complejos de inclusión de la CD y para las posibles orientaciones entre la molécula y la CD, tanto en MM+ como su posterior refinamiento por PM3 (Tablas 2 y 3).

**Tabla 2. Energías correspondientes a los complejos ACZ-CDs expresadas en Kcal/mol. A modo de referencia, las moléculas señaladas con asterisco se construyeron y minimizaron por MM+ sin posterior refinamiento por PM3.**

Optimizadas por MM+	$\Delta$ Complejación	$\Delta E$ Interacción	$\Delta E$ Deformación CD
<b>Estequiometría 1:1</b>			
ACZ- $\beta$ -CD(a)*	-5,254386	-22,713746	8,642728
ACZ- $\beta$ -CD(b)*	-11,51788	-24,314354	3,675261
ACZ-HP- $\beta$ -CD(a)*	-11,443691	-20,979915	0,541143
ACZ-HP- $\beta$ -CD(b)*	-10,679689	-20,099401	0,657546
ACZ- $\beta$ -CD(a) (PM3)	9,999005	-25,911415	30,500743
ACZ- $\beta$ -CD(b) (PM3)	10,121654	-25,037664	30,289001
ACZ-HP- $\beta$ -CD(a) (PM3)	-49,715669	-89,59098	34,649018
ACZ-HP- $\beta$ -CD(b) (PM3)	-48,375463	-79,747919	26,186739
<b>Estequiometría 1:2</b>			
ACZ-HP- $\beta$ -CD(a) (PM3)	-74,330115	-129,328138	-7,188137
ACZ-HP- $\beta$ -CD(b) (PM3)	-68,350273	-128,284893	-5,204393
ACZ-HP- $\beta$ -CD(c) (PM3)	5,676806	0,210725	32,102923
ACZ-HP- $\beta$ -CD(d) (PM3)	-0,597747	-5,768677	24,745991

**Tabla 3. Energías de los complejos ACZ-CDs refinados por PM3 expresadas en Kcal/mol.**

	$\Delta E$ Complejación (Kcal/mol)	$\Delta E$ Interacción (Kcal/mol)	EHOMO (eV)	ELUMO (eV)	$\Delta E$ HOMO- LUMO (eV)
<b>Estequiometría 1:1</b>					
ACZ- $\beta$ -CD(a) (PM3)	-87,69	-14,05	-9,89	1,70	-11,59
ACZ- $\beta$ -CD(b) (PM3)	-83,63	-8,11	-9,61	-1,66	-7,95
ACZ-HP- $\beta$ -CD(a) (PM3)	-70,94	-7,86	-9,73	-1,60	-8,13
ACZ-HP- $\beta$ -CD(b) (PM3)	-77,28	-6,00	-9,99	-1,75	-8,24
<b>Estequiometría 1:2</b>					
ACZ-HP- $\beta$ -CD(a) (PM3)	-162,15	-11,02	-9,62	-1,34	-8,28
ACZ-HP- $\beta$ -CD(b) (PM3)	3691,58	3852,26	392,98	393,52	-0,54
ACZ-HP- $\beta$ -CD(c) (PM3)	-162,15	-7,05	-9,99	-1,64	-8,36
ACZ-HP- $\beta$ -CD(d) (PM3)	-163,83	-7,96	274,03	277,59	-3,57

Asimismo, se incluyen las energías de HOMO y LUMO para los complejos refinado por PM3 (Eq. 4).

$$\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}} = E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}} \quad \text{Eq. 4}$$

El salto de energía entre los orbitales moleculares HOMO y LUMO se considera un índice de la estabilidad del complejo formado (Karelson y cols., 1996), por lo cual su cálculo y resultados se han incluido en nuestro estudio. Ello ha sido posible mediante el empleo de PM3, el cual a diferencia de la mecánica molecular tiene en cuenta la configuración de electrones.

## 5. Discusión

---

En este trabajo se han realizado varios centenares de optimizaciones, sin contar con los cálculos de búsqueda conformacional. Para ello fue necesario el uso de series intensivas de cálculo, programando las tareas mediante scripting y recopilación de resultados en archivos de registro (log).

Visto el volumen de cálculos a realizar, se planteó el dilema sobre si recurrir a la opción de usar mecánica cuántica o mecánica molecular. En anteriores trabajos (Rico-Ruiz, 2014), considerando el tiempo de computación necesario, nos decantamos por el uso de mecánica molecular (MM+), teniendo en cuenta la opinión de muchos autores, los cuales consideran que el uso de algoritmos de mecánica molecular es suficiente para explicar la formación de complejos de inclusión con CDs (Dodziuk, 2006; Lipkowitz, 1998). Sin embargo, una de las principales limitaciones de la mecánica molecular es que no tiene en cuenta los electrones en sus cálculos. Por tanto, en este trabajo hemos querido dar un paso adelante, confirmando los resultados mediante minimización energética por métodos semiempíricos. Entre dichos métodos, se puede optar por varias opciones, tales como Extended-Hückel, Austin Model 1 (AM1) o Parametric Model 3 (PM3), siendo los dos últimos ampliamente usados en modelización molecular de complejos con CDs. Al final, tras consultar la literatura existente sobre el tema, decidimos optar por usar PM3, al ser un método que permite simular con mayor precisión los enlace de hidrógeno (Leila y cols., 2011), los cuales podrían a priori constituir una contribución significativa a la interacción ACZ:CD, vista la estructura de la molécula, donde aparecen varios grupos de carácter electronegativo.

Aunque en un principio se abordó la optimización de complejos de estequiometría 1:1 de ACZ con  $\beta$ -CD y derivados, resultados recogidos en nuestro laboratorio indican la formación de complejos 1:2 con HP- $\beta$ -CD. Por tanto, se realizó una nueva serie de optimizaciones energéticas de complejos de estequiometría 1:2.

Uno de los principales problemas que hallamos en nuestro diseño experimental fue el empleo de del paquete de software Gaussian™ para realizar la minimización energética mediante métodos semiempíricos. La elección del dicho software se basó en su amplio uso por parte de múltiples autores. Una vez realizado el cálculo de la estructura de mínima energía de los complejos por MM+ en Hyperchem™, el posterior refinamiento por PM3 a través de Gaussian daba lugar a la aparición de errores durante el proceso de computación, por lo cual tuvo que descartarse su uso y recurrir finalmente al esquema de computación PM3 incluido en el paquete Hyperchem.

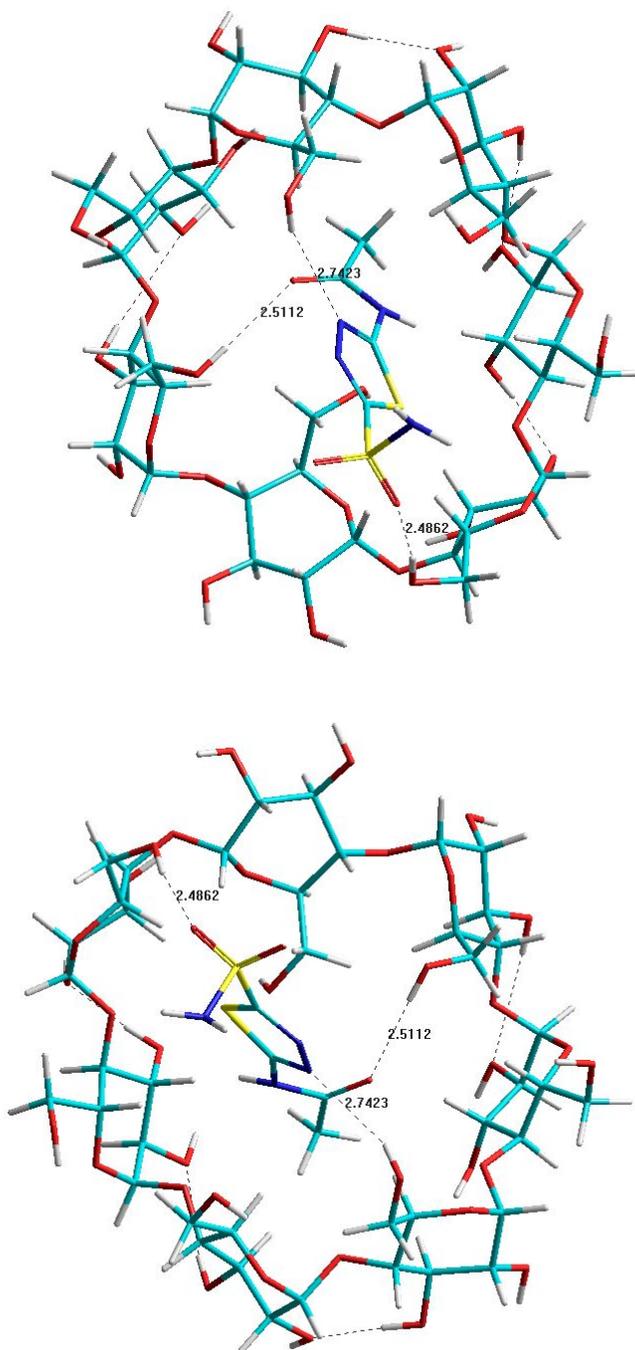
Dentro de las posibles causas, la más probable a nuestro juicio fueron problemas en la interconversión entre los formatos propietarios de las estructuras moleculares entre ambas plataformas (extensión .HIN para Hyperchem y extensiones .GJF o .MOL para Gaussian).

Tal y como indican los datos, las energías de complejación e interacción fueron negativas en la mayoría de los casos, indicando que el proceso se halla favorecido desde el punto de vista termodinámico. En este punto, los cálculos realizados exclusivamente por mecánica molecular, indicaron la formación de complejos estables tanto con  $\beta$ -CD como con HP- $\beta$ -CD en ambas orientaciones. A destacar las bajas energías de deformación registradas para la HP- $\beta$ -CD, lo cual indica un balance energético muy positivo en la interacción con ACZ.

Los complejos 1:1 siguen una correlación de energías tanto en tratamiento MM+ como PM3. Los resultados de diferencial de energía HOMO-LUMO confirman la formación de complejos estables en esta relación estequiometría (orientación A en caso de  $\beta$ -CD y orientación B para la HP- $\beta$ -CD). Sin embargo, el estudio de los complejos de estequiometría 1:2, en sus diferentes orientaciones dio lugar a resultados dispares. Los elevados valores de energía de complejación y energías HOMO y LUMO descartan como complejos viables las orientaciones B y D.

En los complejos, se observó que la interacción tiene lugar prevalentemente a través del anillo tiadiazol. A pesar de tratarse de un grupo polar, la tendencia a interaccionar con la cavidad de la CD se estabiliza por medio de la formación de puentes de hidrógeno, tanto con hidroxilos primarios como secundarios en función de la orientación de partida de la simulación.

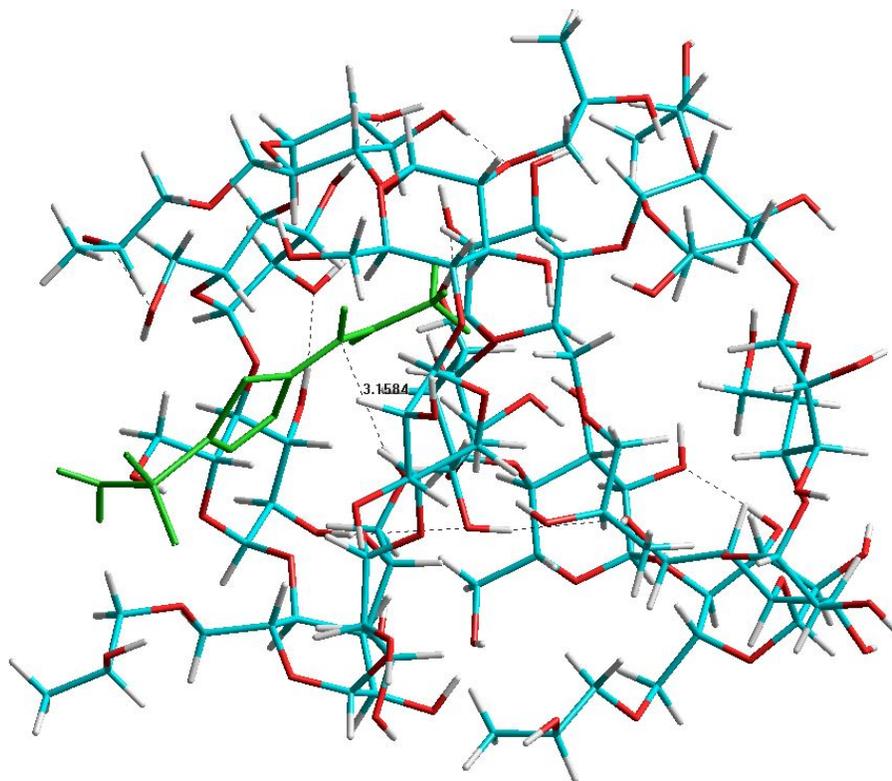
A modo de ejemplo se incluye la imagen del complejo ACZ- $\beta$ -CD(a) (PM3). Obsérvese la formación de puentes e de H entre los hidroxilos primarios de la  $\beta$ -CD con el grupo tiadiazol y los oxígenos sulfonílicos de ACZ (Figura 12).



**Figura 12. Complejo ACZ-β-CD(a) (PM3) desde dos orientaciones diferentes. La longitud de los enlaces de H viene dada en Å.**

En el caso de los complejos 1:2, a pesar de los resultados de nuestro laboratorio que indican una estequiometría 1:2 fármaco:CD, el pequeño tamaño de la ACZ hace improbable la formación de un complejo 1:2 donde dicha molécula interactuara simultáneamente con las cavidades de dos CDs

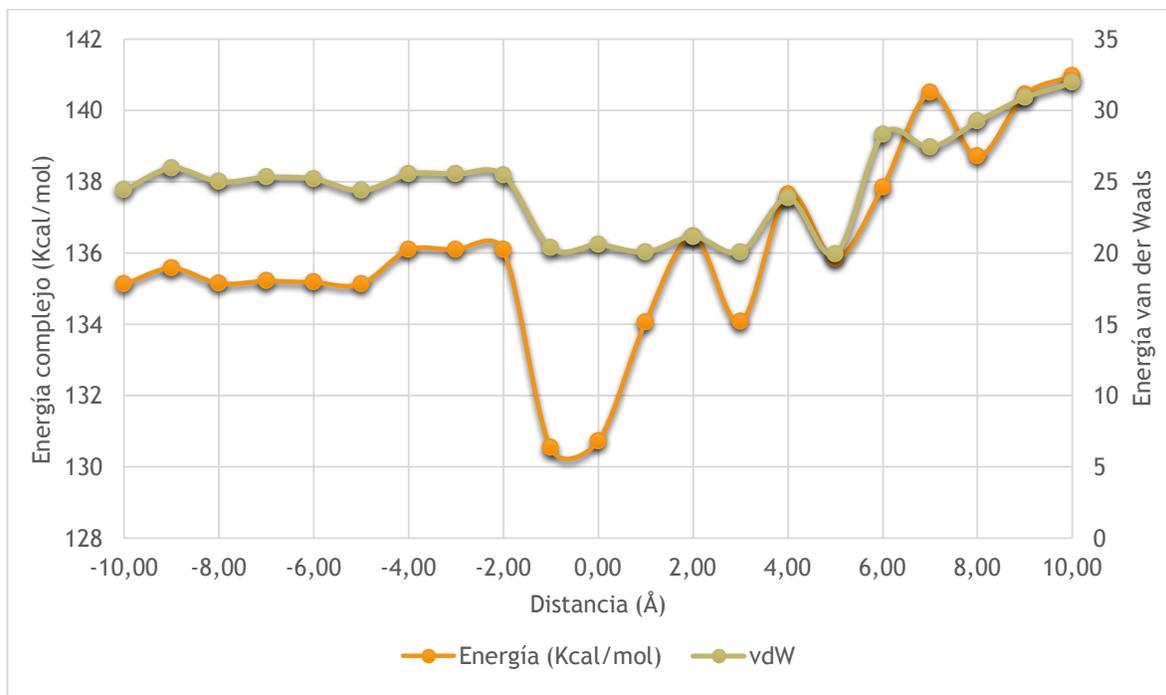
adyacentes. Ello nos hizo sospechar con la presencia de un fenómeno de dimerización entre CDs, los cuales se hallan ampliamente descritos en bibliografía. Una evidencia de dicho fenómeno se muestra en la estructura simulada del complejo 1:2 ACZ-HP- $\beta$ -CD en orientación C, donde la asociación entre CDs aparece estabilizada por la formación de varios puentes de H intermoleculares entra ambos anillos (Figura 13).



**Figura 13. Complejo ACZ-HP- $\beta$ -CD(c) (PM3), donde se observan los enlaces de H que participan en la estabilización de la estructura.**

Como hemos comentado con anterioridad, en un compuesto de inclusión pueden intervenir diferentes fuerzas, tales como interacciones tipo puente de H, interacciones hidrofóbicas e interacciones van der Waals. Una forma de ver si el proceso de complejación se halla influenciado por interacciones de van der Waals es representar la energía de los complejos minimizados a diferentes valores junto a las energías de van der Waals. La presencia de perfiles similares indicaría que las fuerzas de van der Waals influyen en el proceso de complejación (Figura 14). Sin embargo,

en nuestro caso, la contribución de los enlaces de H posee un peso especial en la complejación, tal y como aparece representada en cálculos precedentes.



**Figura 14. Paralelismo en la evolución de las energías de complejación (trazado naranja, eje de ordenadas izquierdo) y energía de van der Waals (trazado verde, eje de ordenadas derecho).**

## 6. Conclusiones

---

1. Se estudió la formación de compuestos de inclusión de ACZ con distintas CDs. Para ello, se acudió al empleo de mecánica molecular, en concreto el campo de fuerza MM+ en el vacío. Asimismo, dichos cálculos se complementaron con la aplicación de métodos semiempíricos de mecánica cuántica, en concreto el Parametric Model 3 (PM3).
2. Las CDs escogidas fueron tanto de origen natural ( $\beta$ -CD) como derivados (HP- $\beta$ -CD). La  $\beta$ -CD se escogió como referencia, mientras que el derivado hidroxipropilado se escogió en función del interés y compatibilidad con la formulación y vía de administración, en nuestro caso vía oftálmica.
3. En la minimización energética se hace fundamental la distinción entre mínimos de energía local y global para la obtención de resultados fiables. Para ello, se optó realizar optimizaciones geométricas a diferentes distancias fármaco-CD, y registrando los valores para cada una de las posiciones y orientaciones.
4. Para la correcta realización de esta técnica y así poder hallar el mínimo global de energía para cada caso, fue necesario partir de estructuras de mínima energía de los monómeros (fármacos y CDs). Ello fue posible mediante el programa de búsqueda conformacional. Una vez disponibles las estructuras de fármaco y CD minimizadas, se procedió a su refinamiento por métodos semiempíricos (PM3).
5. En total, se han realizado un total de 12 combinaciones de complejos, con 21 posiciones de optimización relativas por cada uno de ellos. El número de optimizaciones realizadas en total supera las 250. A tal fin, se realizaron scripts para automatización de tareas, así como registro de las energías en archivos (logs).
6. Una vez aplicadas las optimizaciones mediante mecánica molecular se procedió al posterior refinamiento de las estructuras de menor energía por métodos semiempíricos PM3.
7. Los resultados obtenidos (valores negativos de energía de complejación e interacción) sugieren que la formación de complejos da lugar a estructuras estables y por tanto viables. En general, los valores de diferencial de energía HOMO-LUMO se hallaron en buena correlación con los valores de energía de complejación e interacción. Solo en aquellos casos donde la complejación se halla claramente desfavorecida, los valores de dicho diferencial de energía fueron lógicamente bajos.

8. Por último, nuestros estudios revelaron que la formación de puentes de H juegan un importante papel en la interacción ACZ-CD, pudiendo relegar a un segundo plano las fuerzas de van der Waals.

## 7. Bibliografía

---

Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios. CIMA: Centro de Información Online de Medicamentos de la AEMPS [en línea]. [Consultado en Febrero 2016]. Disponible en: [http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/24408/FT\\_24408.pdf](http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/24408/FT_24408.pdf)

Al Azzam KM, Muhammad E. Host-guest Inclusion Complexes between Mitiglinide and the Naturally Occurring Cyclodextrins  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ : A Theoretical Approach. *Adv Pharm Bull.* 2015; 5(2):289-291.

Ammar HO, El-Nahhas SA, Khalil RM. Cyclodextrins in acetazolamide eye drop formulations. *Pharmazie.* 1998; 53(8):559-62.

Barbiric DJ, Castro EA, de Rossi RH. A molecular mechanics study of 1:1 complexes between azobenzene derivatives and  $\beta$ -cyclodextrin. *J Mol Struct (Theochem).* 2000; 532(1):171-81.

Carrier RL, Miller LA, Ahmed I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *J Control Release.* 2007;123(2):78-99.

Challa R, Ahuja A, Ali J, Khar RK. Cyclodextrins in drug delivery: An updated review. *AAPS PharmSciTech.* 2005; 6 (2):329-57.

Comba P, Hambley TW, Martin B. *Molecular Modeling of Inorganic Compounds.* 3<sup>a</sup> ed. Weinheim: Wiley; 2009.

Cyclolab Cyclodextrin catalog: <http://cyclolab.hu/index.php/webshop-cyclolab> (última consulta: 11 de junio de 2016).

Dodziuk H. *Cyclodextrins and Their Complexes.* Weinheim: Wiley; 2006.

Doucet JP, Weber J. *Computer-Aided Molecular Design: Theory and Applications.* Londres: Academic Press; 1996.

Fathallah M, Fotiadu F, Jaime C. Cyclodextrin Inclusion Complexes. MM2 Calculations Reproducing Bimodal Inclusions. *J Org Chem.* 1994; 59(6):1288-93.

Gaussian 09, Revision E.01, Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR et al. *Gaussian, Inc.*, Wallingford CT, 2009, USA.

GaussView, Version 5, Dennington R, Keith T, Millam J. *Semichem Inc.*, Shawnee Mission, KS, 2009, USA.

Gidwani B, Vyas A. A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs. *BioMed Research International*. 2015;2015:198268.

Hazai E, Hazai I, Demko L, Kovacs S, Malik D, Akli P, Hari P, Szeman J, Fenyvesi E, Benes E, Szente L, Bikadi Z. Cyclodextrin KnowledgeBase a web-based service managing CD-ligand complexation data. *J Comput Aided Mol Des*. 2010; 24(8):713-7.

Higuchi T, Connors KA. Phase-solubility techniques. *Adv Anal Chem Instr*. 1965; 4:212-7.

Hirayama F, Hirashima N, Abe K, Uekama K, Ijitsu T, Ueno M. Utilization of diethyl-beta-cyclodextrin as a sustained-release carrier for isosorbide dinitrate. *J Pharm Sci*. 1988; 77(3):233-6.

HyperChem™ Professional 8.0.8, *Hypercube, Inc.*, 1115 NW 4th Street, Gainesville, FL 32601, USA. Disponible en: <http://www.hyper.com/> (último acceso: 11 de junio de 2016).

Jullian C. Estudio de compuestos de inclusión de ciclodextrinas con flavonoides. Efecto sobre su actividad antioxidante. [Tesis doctoral]. Santiago de Chile; 2007.

Karelson M, Lobanov VS, Katritzky AR. Quantum-Chemical Descriptors in QSAR/QSPR Studies. *Chem Rev*. 1996;96(3):1027-44.

Leach A. *Molecular Modelling: Principles and Applications*. 2ª ed. Harlow: Longman; 2001.

Loftsson T, Frithrikisdóttir H, Stefánsson E, Thórisdóttir S, Guthmundsson O, Sigthórsson T. Topically effective ocular hypotensive acetazolamide and ethoxzolamide formulations in rabbits. *J Pharm Pharmacol*. 1994; 46(6):503-4.

Loftsson T, Järvinen T. Cyclodextrins in ophthalmic drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 1999; 36(1):59-79.

Loftsson T, Jarho P, Måsson M, Järvinen T. Cyclodextrins in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2005; 2(2):335-51.

Loftsson T, Duchêne D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm*. 2007; 329(1-2):1-11.

Loftsson T, Matthíasson K, Másson M. The effects of organic salts on the cyclodextrin solubilization of drugs. *Int J Pharm.* 2003; 262(1-2):101-7.

Loftsson T, Brewster M. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J Pharm Sci.* 1996; 85(10):1017-25.

Loftsson T, Másson M. The effects of water-soluble polymers on cyclodextrins and cyclodextrin solubilization of drugs. *J Drug Deliv Sci Tech.* 2004; 14(1):35-43.

Maestre MV. Elaboración de complejos de inclusión de Ebastina con beta-ciclodextrina [Trabajo fin de master]. Sevilla; 2011.

Martín del Valle EM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem.* 2004; 39(9):1033-46.

Martínez G, Gómez MA. Ciclodextrinas: complejos de inclusión con polímeros. *Revista Iberoamericana de Polímeros.* 2007; 8(4):300-12.

Moyano JR, Ginés JM, Arias MJ, Rabasco AM. Métodos de Elaboración de Compuestos de Inclusión con Ciclodextrinas (I). *Ind Farm.* 1994; 9(6):79-81.

Moyano JR, Ginés JM, Arias MJ, Rabasco AM. Métodos de Elaboración de Compuestos de Inclusión con Ciclodextrinas (II). *Ind Farm.* 1995; 10(1):57-63.

Moyano, JR, Arias, MJ, Ginés JM, Perez-Martinez, JI, Munoz P, Giordano F. (1998). Thermal Characterization of Gliclazide/ $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complexes. *J Therm. Anal.* 51:1001-7.

Mura P, Faucci MT, Parrini, PL. Effects of Grinding with Microcrystalline Cellulose and Cyclodextrins on the Ketoprofen Physicochemical Properties. *Drug Dev Ind Pharm.* 2001; 27(2):119-28.

Ohashi M, Kasatani K, Shinohara H, Sato H. Molecular mechanics studies on inclusion compounds of cyanine dye monomers and dimers in cyclodextrin cavities. *J Am Chem Soc.* 1990; 112(15):5824-30.

Pavia DL, Lampman GM, Kirz GS, Randall EG. *A Small Scale Approach to Organic Laboratory Techniques.* 4ª Ed. Boston: Cengage Learning; 2016.

Pînzaru IA, Hădărugă DI, Hădărugă NG, Peter F. Rutin-saturated fatty acid bioconjugate/cyclodextrin supramolecular systems: molecular modelling. *J Agroalimnt Proc Technol.* 2011; 17(2):123-9.

Rico-Ruiz P. Modelización molecular de complejos de inclusión de ciclodextrinas con distintos principios activos [Trabajo fin de grado]. Sevilla; 2014.

Stella VK, Rajewsky, R. Derivatives of cyclodextrins exhibiting enhanced aqueous solubility and the use thereof. US Patent 5,376,645, 1994.

Szejtli J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. Chem Rev. 1998; 98(5): 1743-54.

Szejtli J. Past, present, and future of cyclodextrin research. Pure Appl Chem. 2004; 76(10):1825-45.

Uekama K, Hirayama F, Irie T. Cyclodextrin Drug Carrier Systems. Chem Rev. 1998; 98(81):2045-76.

Wintgens V, Layre AM, Hourdet D, Amiel C. Cyclodextrin polymer nanoassemblies: strategies for stability improvement. Biomacromolecules. 2012; 13(2):528-34.

Zhou H, Lai WP, Zhang Z, Li WK, Cheung HY. Computational study on the molecular inclusion of andrographolide by cyclodextrin. J Comput Aided Mol Des. 2009; 23(3):153-62.