



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN DEL
FÁRMACO ANTIINFLAMATORIO INDOMETACINA CON CICLODEXTRINAS Y
SU INTERACCIÓN CON Cu(II) Y Zn(II) EN SOLUCIÓN.

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. ADRIÁN RICARDO HIPÓLITO NÁJERA

DRA. MARÍA DEL ROSARIO MOYA HERNÁNDEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

MAYO 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN DEL
FÁRMACO ANTIINFLAMATORIO INDOMETACINA CON
CICLODEXTRINAS Y SU INTERACCIÓN CON Cu(II) Y Zn(II) EN
SOLUCIÓN**

**T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. ADRIÁN RICARDO HIPÓLITO NÁJERA

**DRA. MARÍA DEL ROSARIO MOYA HERNÁNDEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**



Ciudad de México, Mayo del 2020....

Agradecimientos.

Agradezco infinitamente a mi madre María del Carmen Nájera Baños por todo los esfuerzos realizados, el apoyo y la paciencia que me ha brindado para alcanzar estas metas. Aún faltan muchas alegrías y demasiados retos, los cuales no dudo que seguiremos compartiendo. ¡Te amo!

Muchas gracias a mi abuela Alicia Baños Ortiz y a mis primos Irene y Gilberto, ya que su compañía y su manera de ver la vida, me ayudado a darle forma a la mía. No puedo dejar pasar de agradecer especialmente a la pequeña Aranza, que en tan poco tiempo ya ha nos ha traído mucha felicidad.

Gracias a la Dra. María del Rosario Moya Hernández, por todo el soporte, la guía, los conocimientos y herramientas que me brindó para desarrollarme en mi carrera profesional, como en la vida en el día a día. Es una tutora ejemplar.

Agradecimientos al Dr. Rodolfo Gómez Balderas por el apoyo profesional, las guías de escritura y las aventuras académicas en las que hemos compartido bastante.

Agradezco a todos mis amigos que estuvieron presentes en este proceso largo de formación: A Martha E. García, Cecilia Yáñez, Fernanda Velázquez, Brenda Cruz, Janet Suárez y muchos más, que gracias a ustedes la vida es más divertida; a mis amigos derivado de la música, Rogelio Sotelo, Dorian Medrano, Ernesto Reyes, Juan Bautista, Emmanuel Manriquez y muchos más, con los cuales se viven experiencias nuevas ha cada momento.

Muchas Gracias al comité jurado por hacer la revisión de esta tesis al brindarme sus correcciones y comentarios: Dra. Lena Ruiz, Dr. Miguel Costas, Dra. Teresa Ramírez, Dra. Patricia Guadarrama, Dra. Yareli Rojas, en tiempos de contingencia por el COVID-19.

A la **Coordinación del Programa de Maestría y Doctorado En Ciencias Químicas.**

A los profesores que semestre con semestre me compartieron todos sus conocimientos.

A los proyectos PAPIIT IN211881 “Complejos de Cu(II) y Zn(II) con fármacos antiinflamatorios” y al proyecto PIAPI 1846: “Complejos de inclusión de ciclodextrinas con moléculas orgánicas de interés biológico”

Agradecimientos al CONACYT por la beca otorgada para estudios de doctorado con número de becario: 300687.

A la UNAM por brindarme, durante todo este tiempo, todo lo necesario para mi formación como profesional. Al deberle tanto a esta institución, prometo dar todo lo necesario, para lograr ser un digno representante de todo el conocimiento almacenado en la mejor universidad de América Latina.



Este trabajo fue realizado en el laboratorio 10 *Fisicoquímica Analítica* de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Campo 4, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.



Algunas secciones de este trabajo fueron presentadas en los siguientes congresos:

- *Determinación de las constantes de inclusión de complejos M(II)-Indometacina con ciclodextrinas en medio acuoso.* **XXXII Congreso Nacional de Química Analítica en Universidad Autónoma de San Luis Potosí, S.L.P.** Cartel profesional. 10-14 de Junio de 2019.
- *Inclusión de complejos M(II)-Indometacina con ciclodextrinas en medio acuoso.* **5° Congreso de Ciencia, Educación y Tecnología en FES Cuautitlán, UNAM, CDMX.** Presentación Oral. 17-21 de Junio de 2019.
- *Estudio del complejo de inclusión $Cu_2Indo_4(H_2O)_2$ -Ciclodextrina.* **QuimiUNAM 2018 en Facultad de Química, UNAM, CDMX.** Cartel. 7 Agosto de 2018.
- *Estudio de la interacción ciclodextrina con cobre (II) en disolución acuosa.* **XXXI Congreso Nacional de Química Analítica en Universidad Autónoma de Hidalgo, Pachuca, Hidalgo.** Presentación oral. 11-15 de Junio de 2018.
- *Speciation of indomethacin-cyclodextrins inclusion complex in water.* **19th International Cyclodextrin Symposium en Sophia University, Tokio, Japón.** Cartel Estudiante. 27-30 de Abril de 2018.
- *Estudio de la formación de complejos de inclusión de indometacina con β -CD y 2-HP- β -CD por espectroscopía UV-Vis e ITC en solución acuosa.* **XXX Congreso Nacional de Química Analítica en Universidad de Guanajuato, León Guanajuato.** Cartel Estudiante. 11-15 de Junio de 2017.

Los artículos científicos derivados de esta contribución son los siguientes:

- Hipólito-Nájera, A. R., Rojas-Hernández, A., Rodríguez-Laguna Norma, Reyes-García, L. I. Gómez-Vidales, V., Gómez-Balderas, R., Moya-Hernández, M. R., (2020). Thermodynamics of inclusion of M(II)Indomethacin complexes (M(II): Cu(II) o Zn(II) within cyclodextrins in aqueous solution. En revisión.
- Hipólito-Nájera, A. R., Moya-Hernández, M. R., Rojas-Hernández, A., & Gómez-Balderas, R. (2019). Interaction of indomethacin–cyclodextrins in water by UV–Vis and ITC. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 95(1–2), 55–62. <https://doi.org/10.1007/s10847-019-00915-9>

Estos artículos pueden consultarse en la sección **Artículos publicados** (pág. 119).



Contenido

1.- Resumen.	1
2. Introducción.	4
2.1. Los primeros antiinflamatorios.	5
2.2. De la aparición de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) hasta la actualidad.	6
2.3. Indometacina (IMC).	11
2.4. Farmacocinética humana de la indometacina.	13
2.5. Mecanismo de acción de los AINES.	13
2.6. Mecanismo de acción de la indometacina.	16
2.7. AINEs y su complejación con Cu(II) y Zn(II). MAINES.	16
2.8. Complejos metal-indometacina (MIMC; M = Cu(II) ó Zn(II)).	19
2.9. Mecanismo de acción de los complejos MAINES y MIMC.	21
2.10. Historia de las ciclodextrinas.	23
2.10.1. Primera Etapa (1891-1935). Descubrimiento de las ciclodextrinas. Periodo de duda.....	23
2.10.2. Segunda Etapa (1935-1970).....	24
2.10.3. Tercera Etapa. Periodo de aplicación. (1970- a la actualidad).	27
2.11. Características y propiedades de las ciclodextrinas.	30
2.11.1. Nomenclatura.	30
2.11.2. Propiedades físicas y químicas.	31
2.11.3. Ciclodextrinas sustituidas.	35
2.11.4. Usos.	36
2.11.5. Farmacología.	38
3. Hipótesis y Objetivos.	40
3.1. Hipótesis.	41
3.2. Objetivo General.	41
Objetivos particulares.	41
4. Equipos, Reactivos y Metodologías.	43
4.1. Materiales y Equipos.	44
4.2. Reactivos y Soluciones.	44
4.3. Metodologías.	46
4.3.1. Síntesis y caracterización de reactivos utilizados.	46
4.3.2. Estudios de estabilidad de IMC a pH 5 y 7.	47
4.3.3. Determinación del pK_a de la IMC por UV-Vis.	47
4.3.4. Determinación de los parámetros termodinámicos de la interacción IMC con CDs por ultravioleta visible (UV-Vis) y calorimetría de titulación isotérmica (ITC).	48
4.3.5. Determinación de las propiedades termodinámicas de la inclusión IMC con CDs por Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC) a pH 7, a diferente temperatura. Determinación de ΔC_p . Estudio de la compensación entálpica-entrópica.	49
4.3.6. Estudios de la interacción de los complejos $M(IMC)_2(H_2O)_2$ en presencia de CDs.	50



5. Resultados y Discusión.....	53
5.1. Síntesis y caracterización de NaIMC.....	54
5.2. Síntesis y caracterización de los complejos MIMC.....	57
5.3. Estudios de estabilidad de IMC a pH 5 y 7.....	60
5.4. Determinación del pK_a de la IMC por UV-Vis.....	65
5.5. Estudio de la interacción IMC con CDs.....	69
5.5.1. Análisis estructural de la interacción IMC con CDs.....	69
5.5.2. Determinación de las constantes de inclusión IMC con CDs por UV-Vis a pH 5 y 7.....	72
5.5.3. Determinación de las propiedades termodinámicas de la inclusión IMC con CDs por Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC) a pH 7.....	77
5.5.4. Determinación de las propiedades termodinámicas de la inclusión IMC con CDs por Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC) a pH 7, a diferente temperatura.....	85
Determinación de ΔC_p	85
Estudio de la compensación entálpica-entrópica.....	96
5.6. Estudios de la interacción de los complejos $M(IMC)_2(H_2O)_2$ en presencia de CDs.....	101
5.6.1. Diagramas de solubilidad de fases de los complejos $M(IMC)_2$ en presencia de CDs.....	101
5.6.2. Estudios de EPR de especies solubles de $CuIMC_2$ con CDs.....	103
5.6.3. Estudio por calorimetría de titulación isotérmica (ITC) de la interacción $M(IMC)_2$ con CDs.....	104
6. Conclusiones.....	115
Artículos publicados.....	119
Anexos.....	125
A1. Técnica de espectrofotometría Ultravioleta-visible (UV-Vis).....	157
A2. Técnica de espectrofotometría de Infrarojo (IR).....	158
A3. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC).....	161
A4. Técnica de resonancia paramagnética electrónica (EPR).....	164
A5. Programas computacionales utilizados.....	167
A6. Método de relaciones molares (RM).....	171
A7. Gráficos de absorbancia corregida a 229 nm contra el pCD, de la interacción IMC con CDs por UV-Vis a pH 5 y 7.....	173
A8. Información obtenida por cada técnica.....	178
Referencias.....	179



Índice de siglas y abreviaturas.

ΔC_p : capacidad calorífica a presión constante.

A_{\parallel} : Acoplamiento paralelo

AINEs: Antiinflamatorios no esteroideos.

Arg: Arginina

B. macerans: *Bacillus macerans*

BCS: Biopharmaceutical Classification System

CCP: Cromatografía en capa fina.

CD: Ciclodextrina.

CG: cromatografía de gases.

CGT: ciclodextrin glucanotransferasa.

CLAR: Cromatografía líquida de alta resolución

COX: ciclooxigenasa

Cu(IMC)₂: Complejo mononuclear de indometacina, $Cu(IMC)_2(H_2O)_2$, en solución acuosa.

Cu(IMC)₂(H₂O)₂: Especie mononuclear del complejo de indometacina con Cu(II) en relación 1:2 con dos moléculas de agua en su esfera de coordinación.

Cu(IMC)₂CD: Complejo de inclusión con **una** molécula de ciclodextrina, del complejo mononuclear de indometacina, $Cu(IMC)_2(H_2O)_2$.

Cu(IMC)₂CD₂: Complejo de inclusión con **dos** moléculas de ciclodextrina complejo mononuclear de indometacina, $Cu(IMC)_2(H_2O)_2$.

CuAINE: Complejo de un fármaco antiinflamatorio no esteroideo con Cu(I) ó Cu(II)

CuIMC: Complejo sólido de indometacina con el ión Cu(II) en relación 1:2.

DMA: Dimetilacetamida

DMF: Dimetilformamida

DTGS: TGS deuterado

ECZ: Electroforesis capilar de zona.

EPR: Resonancia paramagnética Nuclear.

FDA: Food and Drug Administration

FIR: Infrarojo lejano

g_{\parallel} : valor g paralelo.

g_{\perp} : valor g perpendicular

GI: Gastrointestinal.

GRAS: Generally Recognized As Safe

HCl: ácido clorhídrico

HIMC: Indometacina protonada

HP: 2-hidroxipropil-

IFN: Interferón

IL: interleucinas

IMC: Especie generalizada de las especies indometacina desprotonada e indometacina protonada.

IMC⁻: Indometacina desprotonada

IMCCD: Complejo de inclusión de indometacina con ciclodextrina.

IR: Infrarojo

ITC: Calorimetría de titulación isotérmica.

M(IMC)₂: Metalocomplejo mononuclear de indometacina $MIMC_2(H_2O)_2$, donde M puede ser Cu(II) ó Zn(II), en solución acuosa.

M(IMC)₂(H₂O)₂: Especie mononuclear del complejo de indometacina, donde M es Cu(II) ó Zn(II) en relación 1:2 con dos moléculas de agua en su esfera de coordinación.

M(IMC)₂CD: Complejo de inclusión, con **una** molécula de ciclodextrina, del complejo mononuclear de indometacina, $M(IMC)_2(H_2O)_2$, donde M puede ser Cu(II) ó Zn(II), en solución acuosa.

M(IMC)₂CD₂: Complejo de inclusión, con **dos** moléculas de ciclodextrina, del complejo mononuclear de indometacina $M(IMC)_2(H_2O)_2$, donde M puede ser Cu(II) ó Zn(II), en solución acuosa.

MAINE: Complejo de un fármaco antiinflamatorio no esteroideo con Cu(I), Cu(II) ó Zn(II).

MEDUSA: Representación de diagramas de equilibrio usando algoritmos sofisticados (por sus siglas en inglés, *Making Equilibrium Diagrams Using Sophisticated Algorithms*)

MIMC: Complejo sólido de indometacina en relación estequiométrica 1:2, donde M puede ser Cu(II) ó Zn(II).

MIR: Infrarojo medio

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

NaIMC: Sal trihidratada de IMC ($NaIMC \cdot 3H_2O$)

NaOH: Hidróxido de sodio.

NIR: Infrarojo cercano

NMP: N-metil-2-pirrolidona

NO: Óxido nítrico

NSAIDs: *non-steroidal anti-inflammatory drugs*.

PGES: Prostaglandina endoperóxido sintasa

PGs: Prostaglandinas

PMNL: Leucocitos polimorfo nucleares

RM: Relación molar o relaciones molares.

RMN: Resonancia Magnética Nuclear.

rpm: revoluciones por minuto



Ser: Serina
SOD: superóxido dismutasa
SQUAD: Coeficientes de estabilidad de datos de absorbancias (por su siglas en inglés *Stability Quotients from Absorbance Data*).
TGS: Sulfato de triglicina
TNF: Factor de necrosis tumoral
TSP: ácido 3-(trimetilsilil)propanoico
Tyr: tirosina
U: suma de cuadrados de los residuales para SQUAD.
UV-Vis: Ultravioleta visible
Val: Valina
 V_D : volumen de distribución.
XRD: Difracción de rayos X.
XRPD: Difractograma o difracción de rayos X de polvos.

Zn(IMC)₂: Complejo mononuclear de indometacina, $Zn(IMC)_2(H_2O)_2$, en solución acuosa.
Zn(IMC)₂(H₂O)₂: Especie mononuclear del complejo de indometacina con Zn(II), en relación 1:2, con dos moléculas de agua en su esfera de coordinación.
Zn(IMC)₂CD: Complejo de inclusión, con **una** molécula de ciclodextrina, del complejo mononuclear de indometacina, $Zn(IMC)_2(H_2O)_2$.
Zn(IMC)₂CD₂: Complejo de inclusión, con **dos** moléculas de ciclodextrina, del complejo mononuclear de indometacina $Zn(IMC)_2(H_2O)_2$.
ZnAINE: Complejo de un fármaco antiinflamatorio no esteroideo con Zn(II)
ZnIMC: Complejo sólido de indometacina con el ión Cu(II) en relación 1:2.



1.- Resumen.

From ancient times, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) studies, to avoid their adverse effects, enhance their effects, and understand their modes of action, do not stop and continue to this day. To improve its effectiveness and avoid adverse effects of NSAIDs (including indomethacin (IMC)), various approaches have been used. One of these approaches, used with IMC, is the formation of complexes with metal ions, MIMC, being M: Cu (II) or Zn (II). However, the low water solubility of the MIMC complexes makes their study, preparation and administration for human use difficult. In this work, it is proposed to increase the solubility of IMC metal complexes ((M(IMC)₂(H₂O)₂) with the use of cyclodextrins (CDs). CDs are molecules capable of conferring solubility, due to their polar exterior, by allowing other nonpolar molecules to be included in their nonpolar cavity. In this work, it is hypothesized that it will be possible to understand the thermodynamic profile of the formation of inclusion complexes, between IMC and its metallic complexes with Cu (II) and Zn (II) with CDs, through its study by different techniques, for a future development of more effective and less toxic drugs.

This contribution experimentally describes studies of IMC, from its basic properties such as stability with pH and acidity constant, to the ability to convert it into its corresponding salt. Subsequently, the synthesis and solid characterization of the MIMC metal complexes (where M: is Cu (II) or Zn (II)) are described, to determine if the complex is mononuclear or dinuclear, in addition to its corresponding structure in order to figure out his study in aqueous solution. Understanding that the structure and solubility of the complexes in solid, MIMC, depends largely on the IMCs attached to the metal center, the thermodynamics of the interaction of the inclusion complexes of BMI with CDs (IMCCDs) was studied, using 5 different CDs (α -, β -, γ -, HP- β - y HP- γ -CD).

In addition, the development of the methodologies to study the inclusion complexes of MIMC in CDs is shown. The thermodynamics of the inclusion of MIMC complexes with CDs is now known. The solubility of the MIMC complexes was raised with CDs, to propose for the first time the existence of the mononuclear species Cu(IMC)₂CD, Cu(IMC)₂CD₂, Zn(IMC)₂CD y Zn(IMC)₂CD₂ in aqueous solution.



Desde la antigüedad, los estudios sobre los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), para evitar sus efectos adversos, potenciar sus efectos, y entender sus modos de acción, no se detienen, por lo que continúan hasta nuestros días. Para mejorar su efectividad y evitar efectos adversos de los AINES (entre ellos la indometacina (IMC)), se han usado diversos enfoques. Uno de estos enfoques, usado con IMC, es la formación de complejos con iones metálicos, MIMC, siendo M: Cu(II) ó Zn(II). Sin embargo, la baja solubilidad en agua, de los complejos MIMC, hace que su estudio, preparación y su administración para uso humano, se dificulte. En este trabajo, se propone aumentar la solubilidad de los metalocomplejos de IMC ($M(IMC)_2(H_2O)_2$) con el uso de ciclodextrinas (CDs). Las CDs son moléculas capaces de conferir solubilidad gracias a su exterior polar, al permitir incluir otras moléculas no polares en su cavidad no polar. En este trabajo, se plantea la hipótesis de que será posible entender el perfil termodinámico de la formación de los complejos de inclusión entre IMC y sus complejos metálicos con Cu(II) y Zn(II) con CDs, a través de su estudio por diferentes técnicas, para un futuro desarrollo de fármacos más efectivos y menos tóxicos.

Esta contribución describe experimentalmente los estudios de la IMC, desde sus propiedades básicas como estabilidad a diferente pH y constante de acidez, hasta la capacidad de convertirla en su sal correspondiente. Posteriormente, se describe la síntesis y caracterización en sólido de los complejos metálicos MIMC (donde M: es Cu(II) ó Zn(II)), para determinar si el complejo es mononuclear o dinuclear, además de su correspondiente estructura para poder abordar mejor su estudio en solución acuosa. Al entender que la estructura y solubilidad de los complejos en sólido, MIMC, depende en gran manera de las IMCs unidas al centro metálico, se estudió la termodinámica de la interacción de los complejos de inclusión de la IMC con CDs (IMCCDs), usando 5 diferentes CDs (α -, β -, γ -, HP- β - y HP- γ -CD). Con lo anterior se demostraron las mejores condiciones y por primera vez las propiedades termodinámicas para la formación de los complejos IMCCDs.

Además, se muestra el desarrollo de las metodologías para estudiar los complejos de inclusión de MIMC en CDs. La termodinámica de la inclusión de los complejos MIMC con CDs es ahora conocida. La solubilidad de los complejos MIMC se elevó con CDs, para proponer por primera vez, la existencia de las especies mononucleares $Cu(IMC)_2CD$, $Cu(IMC)_2CD_2$, $Zn(IMC)_2CD$ y $Zn(IMC)_2CD_2$ en solución acuosa.



2. Introducción.



2.1. Los primeros antiinflamatorios.

El hallazgo de ciertas plantas y sus extractos se dio por serendipia desde la antigüedad y su aplicación contra el dolor, fiebre e inflamación, sigue hasta nuestros días. Los beneficios de la cinchona (*Cinchona officinalis*) y del sauce blanco (*Salix Alba*) son conocidos desde el comienzo de las civilizaciones en todo el mundo [Rainsford, 2007]. No fue hasta el año 1633 que comenzó el estudio formal de los analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios derivados de plantas, cuando un monje agustino en Perú, divulgó que el polvo de cinchona curaba la fiebre y cuando Edward Stone en 1763, reportó que la corteza del sauce blanco tenía éxito contra la fiebre de la malaria [Grosser, 2012].

En el siglo XIX, la **quinina** (Fig. 2.1) se aisló de la cinchona, pero su escases y alto costo llevó a la búsqueda de nuevos compuestos con mejores efectos [Lucas, 2016]. En el año de 1828, el alemán Johann Andreas Buchner extrajo el principio activo del sauce blanco, llamándole **salicina** (Fig. 2.2), nombre derivado del latín *Salix* que significa sauce [Fischer, 2010]. La salicina se usaba como agente antipirético, sin embargo, es poco palatable por su sabor amargo, por lo que se buscaron alternativas. En 1839, Raffaele Michele Rocco Piria obtuvo el **ácido salicílico** (Fig. 2.3), Hermann Kolbe en 1859, facilita su producción a escala industrial [Mahmud, 2019], por lo cual pudo ser introducido como antirreumático analgésico en Berlín. Es hasta 1876, que Thomas Maclagan encuentra que la salicina y el ácido salicílico eran igualmente eficaces. A pesar de sus beneficios, el ácido salicílico o su sal de sodio, tiene varios efectos secundarios en dosis altas, como la irritación gástrica. En 1897, Arthur Eichengrün y Felix Hoffmann descubrieron el **ácido acetilsalicílico** (Fig. 2.4), el cual era tan efectivo como el ácido salicílico, pero mejor tolerado [Jeffreys, 2004]. En 1899, Bayer lo comercializó como **aspirina**, el nombre aspirina no tiene un origen claro, se dice que la “a” viene de acetil y “spirina” viene de *Spiraea*, la familia de plantas usadas como materia prima [Mahmud, 2019]. En 1919, después de que Alemania perdiera la primera guerra mundial, Bayer fue forzada a renunciar a la marca, como parte del tratado de Versalles [Mann, 1991]. La aspirina es usada y conocida mundialmente hasta nuestros días [Fischer, 2010].

Otro analgésico exitoso para esta época es la **fenazona** (Fig. 2.5), descubierta por Emil Fischer en 1883, siendo más efectiva y económica que la quinina, con la desventaja de causar



agranulocitosis, dejando a los pacientes vulnerables a infecciones [Mahmud, 2019]. La **acetanilida** (Fig. 2.6), el primer derivado de la anilina con actividad antipirética, descubierta por accidente, fue sintetizada en 1886 por Adolf Kussmaul en la universidad de Strassburg. Se comercializó con el nombre de Antifebrin, sin embargo, en las formulaciones que se utilizaba producía daños al hígado y al riñón. Fue reemplazada por la **fenacetina** (Fig. 2.7), sintetizada en 1887, con las ventajas de la fenazona y de la acetanilida y sin ninguna desventaja aparente (hasta 1960 hay evidencia de causar falla renal) [Mahmud, 2019]. Debe notarse que en esta época las regulaciones farmacéuticas y farmacológicas no tenían un rol importante, un ejemplo es el hecho de que se basaban en modelos de aletas de pescado para comparar el daño en la mucosa intestinal producido por fármacos [Brune, 2004].

Más adelante, Bayer siguió trabajando con la tolerabilidad de Fenacetin, desarrollando **acetaminofen** (paracetamol) (Fig. 2.8), pero se creyó que debido a sus impurezas podría causar metahemoglobinemia (condición en la que la hemoglobina anormal presenta iones Fe(III) [Mansouri, 1993]). Sin embargo, Sterling en el Reino Unido, encontró que el acetaminofen no inducía tal enfermedad y comercializó el producto como Panadol (ahora propiedad de GlaxoSmithKline) [Brune, 2004]. Hoechst, adicionando más grupos amino a la estructura de la fenazona, logró sintetizar **aminofenazona** (Fig. 2.9), **melubrin** (Fig. 2.10) y **dipirona** (Fig. 2.11), ésta última fue útil como inyectable. Por otro lado, Hoffman substituyó un grupo isopropilo del grupo amino de la 4-amino-dietil fenazona, resultando en **propifenazona** (Fig. 2.12). Después de la segunda guerra mundial, tratando de disminuir los efectos adversos de la aminofenazona, H. Stenzl sintetizó la **fenilbutazona** (Fig. 2.13), la cual fue muy activa en dolor reumático. A pesar del arduo trabajo de los científicos y empresas de esos tiempos para sintetizar nuevos fármacos más potentes y menos dañinos, muchas otras empresas lo único que realizaban eran mezclas aspirina, paracetamol, cafeína y una variedad de ingredientes extras que a pesar de que satisfacían al consumidor, no tenían beneficio médico y sólo llevaban a abusos y diversas toxicidades [Dubach, 1983].

2.2. De la aparición de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) hasta la actualidad.

Para 1941, Hans Selye dio la primera descripción científica de un corticoesteroide. En 1949, se presenta por primera vez un tratamiento con corticoesteroides para el tratamiento de artritis



reumatoide y el primer fármaco antirreumático con propiedades *modificadoras de la enfermedad* [Buer, 2014]. Estos fármacos parecían muy prometedores, durante la década de 1950, muchos fármacos derivados de los esteroides fueron introducidos, y sus descubridores fueron galardonados con el premio nobel. Sin embargo, sus efectos secundarios, severos e irreversibles hicieron que los tratamientos con corticoesteroides fueran rechazados por completo por la comunidad especializada en reumatología [Rainsford, 2007; Buer, 2014].

Por lo anterior, en esta década también comenzaron a llevarse a cabo medidas regulatorias para conocer el efecto de los antiinflamatorios existentes hasta entonces. Al tratar de distinguir entre salicilatos, nuevos antiinflamatorios y los esteroides; una nueva categorización nació por la necesidad de señalar cuales *no* eran esteroides para no asociarlos con sus efectos adversos [Buer, 2014]. Por lo anterior, probablemente la primera vez que el término *non-steroid anti-inflammatory* (antiinflamatorio no esteroideo) apareció en un artículo fue en 1960 [Whitehouse, 1960], y por primera vez en un título de un artículo en 1963. Durante esta década los fármacos fueron llamados *non-steroidal anti-inflammatory drugs* (fármacos anti-inflamatorios no esteroideos). Después de 10 años las siglas NSAIDs (AINEs, por sus siglas en español, donde la sigla F de fármaco no suele incluirse) comenzaron a utilizarse con mayor frecuencia [Buer, 2014].

En esta misma década, además de varios análogos de la fenilbutazona, se desarrollaron nuevos fármacos, ahora ya categorizados como antiinflamatorios no esteroideos o AINEs, desarrollados a partir de modelos de inflamación usados para definir su actividad. De estos modelos Merck, Sharp and Dohme identificaron agentes antiinflamatorios indólicos, de entre 350 compuestos, reportaron que el más exitoso era la **indometacina (IMC)** (Tabla 2.1) [Shen, 1963].

A su vez la compañía Boots, comercializó **ibuprofeno** (Fig. 2.14) en 1969 y **flurbiprofeno** (Fig. 2.15) en 1977, que son derivados del ácido propiónico. Más adelante, el **ácido flufenámico** (Fig. 2.16), fue el primero de los derivados del ácido fenámico, aunque por su toxicidad en el sistema nervioso central, estos compuestos fueron abandonados.

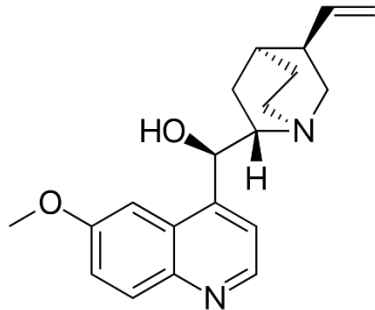


Fig. 2.1. Quinina

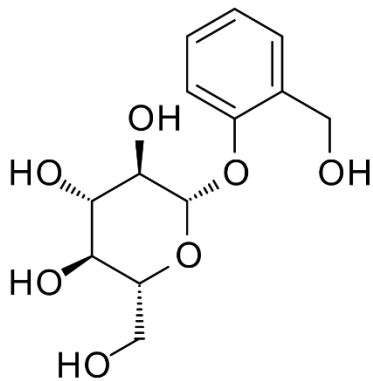


Fig. 2.2. Salicina.

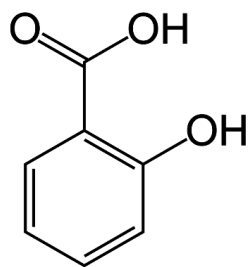


Fig. 2.3. Ácido Salicílico.

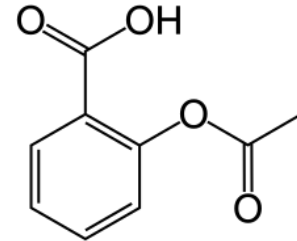


Fig. 2.4. Ácido acetilsalicílico

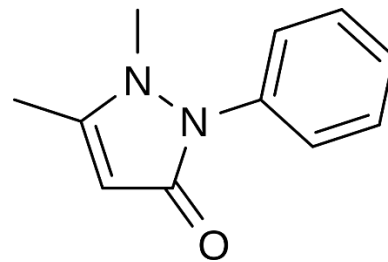


Fig. 2.5. Fenazona.

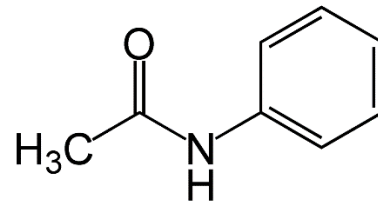


Fig. 2.6. Acetanilida.

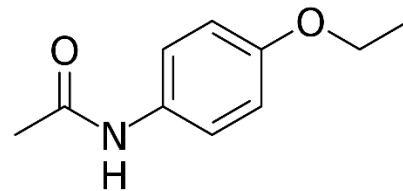


Fig. 2.7. Fenacetina.

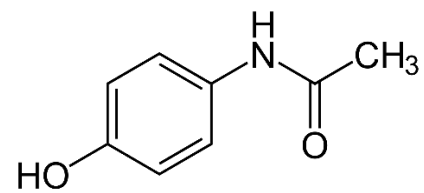


Fig. 2.8. Acetaminofen (paracetamol).



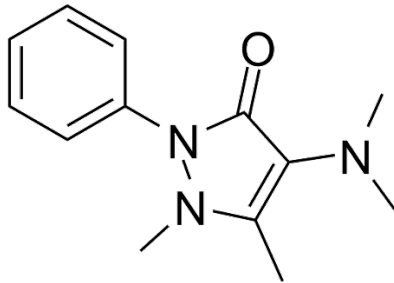


Fig. 2.9. Aminofenazona.

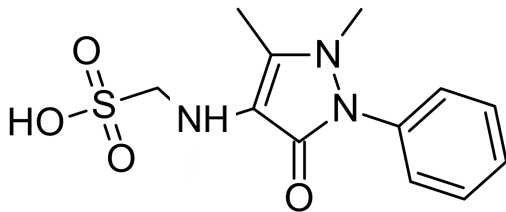


Fig. 2.10. Melubrin

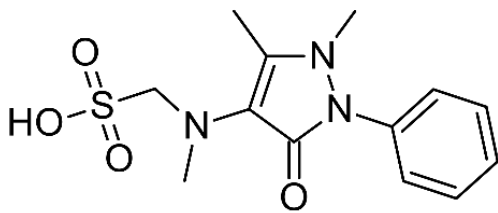


Fig. 2.11. Dipirona.

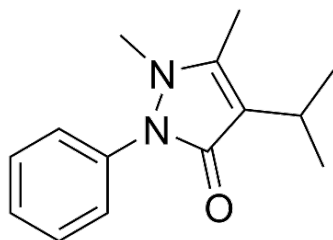


Fig. 2.12. Propifenazona.

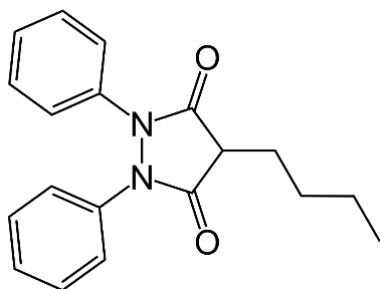


Fig. 2.13. Fenilbutazona.

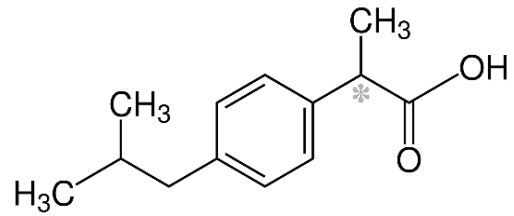


Fig. 2.14. Ibuprofeno.

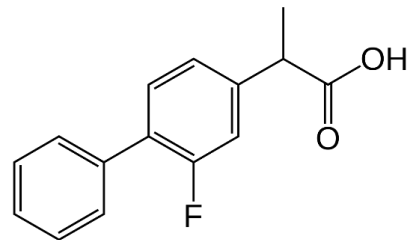


Fig. 2.15. Flurbiprofeno.

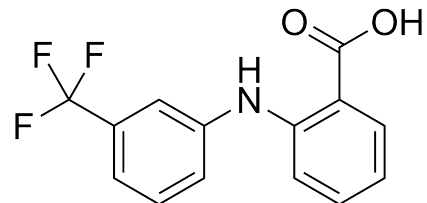


Fig. 2.16. Ácido flufenámico.

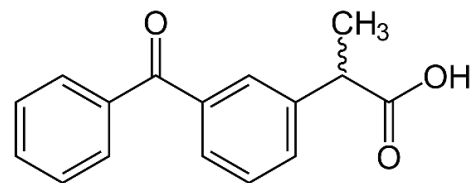


Fig. 2.17. Ketoprofeno.

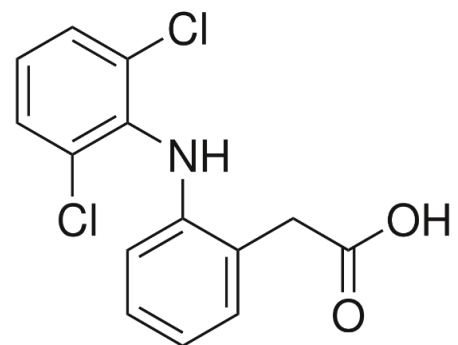


Fig. 2.18. Diclofenaco



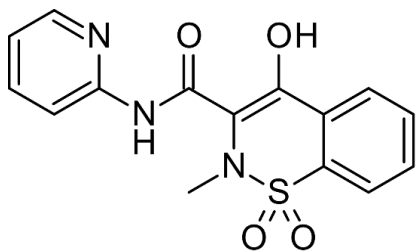


Fig. 2.19. Piroxicam.

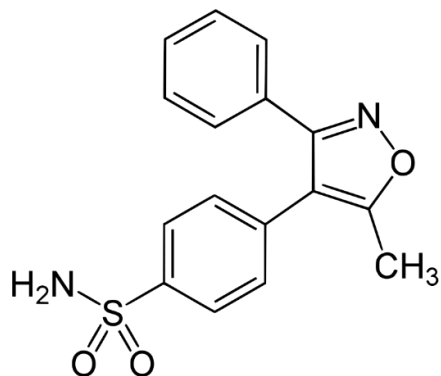


Fig. 2.23. Valdecoxib.

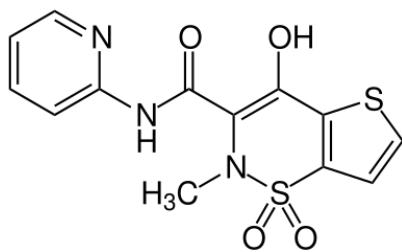


Fig. 2.20. Tenoxicam.

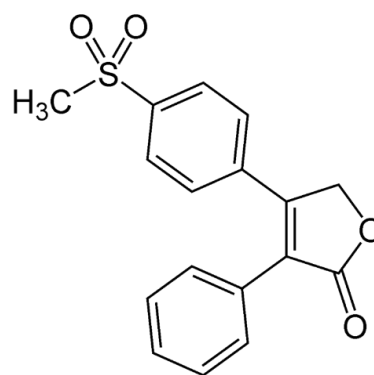


Fig. 2.24. Rofecoxib.

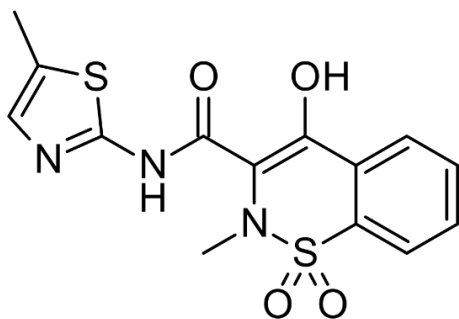


Fig. 2.21. Meloxicam.

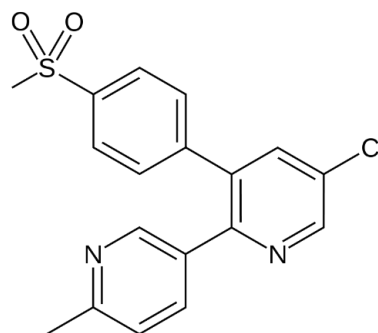


Fig. 2.25. Etoricoxib.

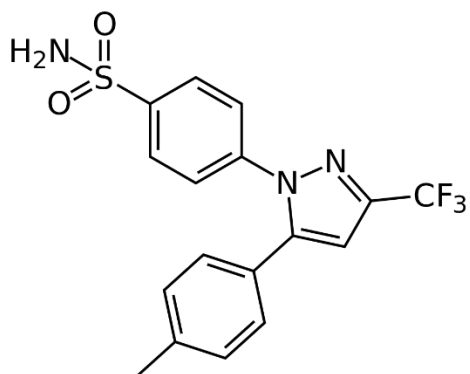


Fig. 2.22. Celecoxib.



Por el contrario, los derivados del ácido acético tuvieron éxito, por ejemplo, se pueden nombrar al **ketoprofeno** (Fig. 2.17), comercializado en 1973 y al **diclofenaco** (Fig. 2.18), comercializado en Japón en 1974. Pfizer desarrolló **piroxicam** (Fig. 2.19), más tarde el **tenoxicam** (Fig. 2.20) apareció gracias a Hoffmann-La Roche y **meloxicam** (Fig. 2.21) por Boehringer Ingelheim, todos estos ejemplos de ácidos cetoenólicos [Brune, 2004].

Gracias al descubrimiento de las ciclooxigenasas (COXs), y a la elucidación del mecanismo de acción, es posible conocer que la mayoría de AINEs actúan sobre COX-1 y COX-2. Lo anterior abrió una nueva dimensión de selectividad, ya que permitió entender el porqué los fármacos tendrían que inhibir principalmente a la COX-2 para evitar los efectos adversos que provoca inhibir la COX-1. Se encontró que el diclofenaco era muy selectivo a COX-2 por lo cual se volvió muy exitoso, sin embargo, aún inhibía a la COX-1. En épocas recientes una nueva gama de fármacos altamente selectivos a COX-2 se han venido desarrollando, ejemplos de estos fármacos derivados de sulfonamidas se encuentran **celecoxib** (Fig. 2.22) y **valdecoxib** (Fig. 2.23), y derivados de metilsulfonas son **rofecoxib** (Fig. 2.24) y **etoricoxib** (Fig. 2.25). Aunque pareciera que estos nuevos fármacos son resultados de nuevos modelos de inflamación o una revolución química, son compuestos muy parecidos a compuestos ya conocidos como la fenazona. Además, debido que inhiben a la COX-2, no dejan de tener efectos secundarios, por lo que pueden llegar a impactar a los riñones, afectar la presión arterial y presentar efectos cardiovasculares adversos [Brune, 2004].

Desde la antigüedad, y a casi más de 130 años del descubrimiento de la aspirina y de un desarrollo más metodológico, los esfuerzos para desarrollar fármacos antiinflamatorios con mayores ventajas no se detienen y siguen hasta nuestros días.

2.3. *Indometacina (IMC).*

El AINE llamado ácido [1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-1H-indol-3-il]-acético con nombre común indometacina (IMC) (Tabla. 2.1), es un antiinflamatorio analgésico y antipirético, descubierto en 1963 por Merck & Co, Rahway, NJ, USA, y aprobado en 1965 por la FDA (Food and Drug Administration por sus siglas en inglés) [Shen, 1963; Andrade 2015; Rainsford, 2007]. Se clasifica como un AINE del grupo de los índol-acéticos. Sintetizado como antagonista de la serotonina (Ser)[Fini, 2001]. Es de los AINES más fuertes.

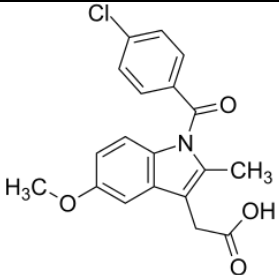


Su potencial farmacocinético y sus diferencias biomecánicas con otros AINEs, lo hacen de gran interés clínico y de investigación.

La especie protonada de la IMC (HIMC), en solución, actúa principalmente como ácido de Lewis (debido a sus grupos –OH), con el fin de establecer puentes de hidrógeno con grupos funcionales aceptores de protones que tienen los disolventes (átomos de oxígeno en grupos –OH y –O–), aunque también puede actuar como compuesto aceptor de protón por medio de sus grupos carboxilo, metoxilo e hidroxilo. [Cantillo, 2013]. Es muy poco soluble en agua alcanzando una concentración de 5.16×10^{-5} M. Tiene un pK_a de 4.5 (Tabla 2.1). A pesar de su baja solubilidad en agua, la IMC se clasifica como un fármaco de clase II en el BCS (Biopharmaceutical Classification System, por sus siglas en inglés) debido a su alta permeabilidad a través de la membrana intestinal [Karmwar, 2012; Andrade, 2015]. Es electroactiva [Sataraddi, 2014], y se ha reportado que puede reducirse y descomponerse en el electrodo de gota de mercurio [Fini, 2001].

Se receta para: artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante, artritis gotosa aguda, bursitis, tendónitis, cierre persistente de ductos arteriosos, edema macular cistoide, quemadura de sol, dismenorrea, profilaxis de la migraña, cefalea histamínica y polihidramnios [Valentovic (2007)].

Tabla 2.1. Indometacina y sus propiedades.

Indometacina (IMC)	Especie protonada: HIMC. Especie desprotonada: IMC ⁻
Estructura Química (HIMC)	
Clasificación Química como AINE	Ácidos carboxílicos. Indol/indeno acetato ^a
Clasificación BCS	Clase II ^b
Fórmula Química	C ₁₉ H ₁₆ ClNO ₄
Peso Molecular (g/mol)	357.79
Solubilidad	Soluble en etanol, éter, acetona y aceite de castor. Prácticamente insoluble en agua (0.937 µg/ml a 298.15K) ^c 5.16×10^{-5} Mol/l ^d . Estable en medios neutros y ácidos; se descompone por medios fuertemente alcalinos.
Constante de ionización (pK _a)	4.5 ^e
Propiedades físicas	Cristales blancos, exhibe polimorfismo (4 formas polimórficas diferentes, γ ó I (Triclínica, pf: 157.9°C), α ó II (monoclínica, pf: 151°C), β ó III y δ ó IV (pf: 130.6°C) ^f

a. Rainsford (2007); b. Andrade (2015); c. Yalkowsky, (1992); d. Ruidiaz (2010); e. Budavari, (1989); f. Dubbini (2014).

La IMC se prescribe por cápsulas, formulaciones de liberación controlada, supositorios rectales y suspensiones para uso oral, así como en múltiples formas genéricas [Nalamachu, 2014]. Se han propuesto aplicaciones tópicas de la IMC para disminuir los efectos adversos, al disminuir la concentración de fármaco en circulación sanguínea, ya que estudios demuestran que esta formulación demostró eficacia similar a IMC oral. Hasta ahora, el diclofenaco es de los únicos fármacos en usarse tópicamente [Nalamachu, 2014].

2.4. Farmacocinética humana de la indometacina.

El comienzo de la acción de la IMC, después de administración oral continua, es de aproximadamente 30 minutos, para un efecto analgésico, y 7 días para la actividad antiinflamatoria completa. Por ejemplo, el pico de acción en el tratamiento de gota es de 24-36 horas con disminución gradual del hinchamiento de 3 a 5 días. La duración de acción de la IMC es aproximadamente de 4 a 6 horas para efecto analgésico y de 1 a 2 semanas como un agente antiinflamatorio. Para el tratamiento de artritis, la dosis diaria máxima es de 150-200 mg, mientras que, para bursitis y tendinitis se trata con 75-150 mg/día. Para el alivio del dolor de artritis gotosa aguda se utiliza una dosis de 50 mg/Kg. Se metaboliza en el hígado y se excreta en la orina y las heces. Aproximadamente 90% de indometacina se une a la proteína del plasma. Presenta un reciclado enterohepático significativo. [Valentovic, 2007].

2.5. Mecanismo de acción de los AINES.

En 1971, se demostró que los fármacos AINES actúan mediante la inhibición de la biosíntesis de las prostaglandinas (PGs) a partir del ácido araquidónico (Fig. 2.26) [Vane, 1971; Ferreira, 1971; Vane 1998]. En esta ruta, los AINES actúan principalmente sobre la enzima PG endoperóxido sintasa (PGES) o también llamada ciclooxigenasa (COX) [Piper, 1969; Fitzpatrick, 2004]. Hay dos isoformas identificadas de la COX: la COX-1 que está universalmente presente en la mayoría del tejido humano y está involucrada en la síntesis de prostanglandinas y tromboxano A₂, además de ser responsable de algunas funciones del cuerpo, como agregación plaquetaria, protección gástrica y función renal; y la COX-2 la cual se expresa en respuesta a lesión, inflamación (tal como endotoxinas, factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interferón (IFN)- γ , interleucinas (IL-1 α , IL-1 β), y factores de crecimiento) y mutágenos en algunas células, incluyendo macrófagos y células sinoviales [Lucas, 2016;



Dillon, 2004]. La COX-1 fue estudiada y purificada en la década de 1970 y la COX-2 fue descubierta hasta 1991 [Marnett, 1999a; Marnett, 1999b].

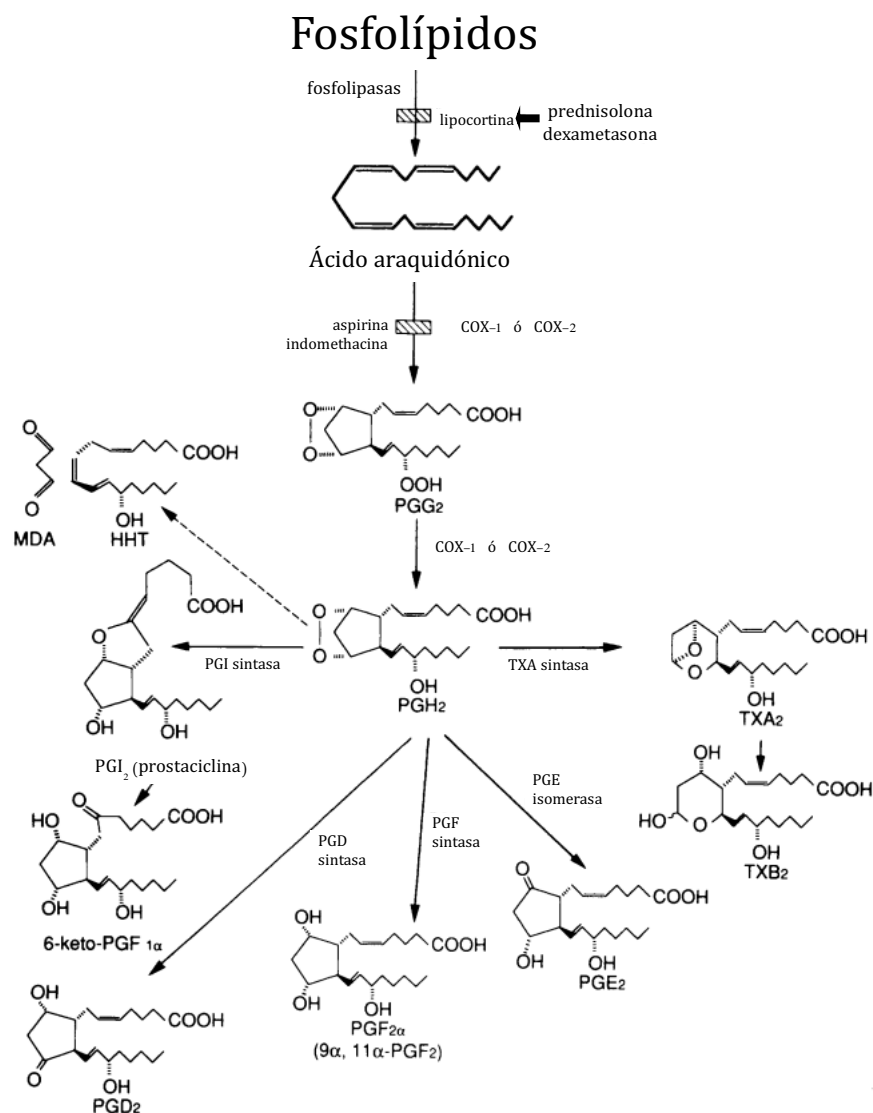


Fig. 2.26. Cascada del ácido araquidónico. Imagen tomada de Vane, J.R. de 1996.

Las COXs presentan 2 sitios activos (Fig. 2.27), el primer sitio transforma al ácido araquidónico, ciclándolo y agregándole un grupo 15-hidroxiperóxido (Fig. 2.26) para formar un endoperóxido llamado PGG₂. El segundo sitio reduce el grupo hidroxiperóxido de la PGG₂ y lo transforma en un grupo hidroxilo de la PGH₂, otro endoperóxido [Vane 1997], el PGH₂ es transformado, a su vez, por isomerasas específicas en PGs, prostaciclina (PGI₂) y tromboxano A₂. Las estructuras en tercera dimensión de las COX-1 y -2 han sido elucidadas



y han permitido tener evidencia suficiente para proponer un mecanismo de inhibición del proceso de síntesis de PGs [Hart, 1963; Vane, 1997; Wong, 1997]. Los sitios activos están conformados por un canal hidrofóbico, en el cual la tirosina (Tyr) 385 y la serina (Ser) 530 (Fig. 2.27) se sitúan en la parte más externa del sitio activo, la Tyr 385 forma un radical tirosilo, extrayendo un hidrógeno del carbono 13 del ácido araquidónico, creando un radical activado araquidonilo que experimenta la reacción de ciclación/oxigenación, la cual resulta en la formación de los endoperóxidos PGG₂ y PGH₂ [Botting, 2010].

Los AINES generalmente actúan en competencia con el ácido araquidónico por el sitio activo de la COX. Una de las teorías de inhibición, para los fármacos parecidos a la Aspirina, es la promoción de acetilación del grupo hidroxilo de la serina en la posición 530 (Ser 530, Fig. 2.27) en la COX-1 y en la posición análoga de la Ser 516 en la COX-2, dejando intacta su actividad como peroxidasa, ya que se impide el acceso al ácido araquidónico por impedimento estérico [Vane, 1997; Nijkamp, 2005].

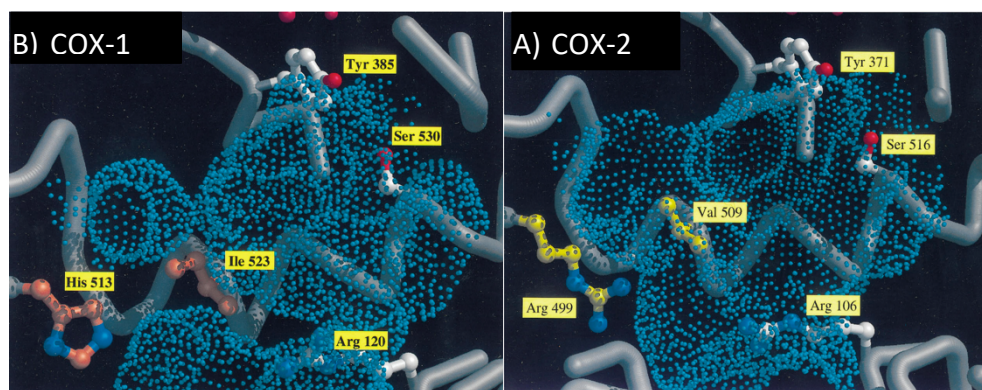


Fig. 2.27. Los sitios activos de la a) COX-1 y COX-2 están representados con los residuos importantes delineados. El residuo de tirosina (Tyr 385) en ambas isoformas está localizado debajo del grupo heme de la enzima y en la parte más externa del sitio activo, y el residuo Arg 120 está presente en la “boca” del canal en el cual el ácido araquidónico entra (varias regiones de la enzima han sido removidas por claridad). Los puntos azules representan las regiones de solvente accesibles dentro de los dos sitios activos. Ile 523 de la COX-1 actúa como residuo clave para comprimir un área del sitio activo de la COX-1, mientras que la Val 509 y Arg 499 de la COX-2 resulta en una superficie más grande y accesible, sugiriendo un sitio activo más grande y mayor sitio de inhibición.

Otra teoría de inhibición, postula que el residuo salicilato de la aspirina o ácido salicílico se une débilmente a un segundo espacio por debajo de la Ser 530 (COX-1), el ácido carboxílico de la aspirina se une inicialmente a la Arg 120 (COX-1), que se sitúa cerca de la apertura del sitio catalítico, seguido por un enlace covalente del grupo acetilo a la Ser 530 [Botting, 2010].

Aunque los sitios de acción de la COX-1 y de la COX-2 son muy parecidos, hay diferencias en la posición 523, la COX-1 tiene a la isoleucina (Ile 523) y la COX-2 a la valina (Val 509). Esta posición permite que COX-2 tenga una proximidad con la Arg 499 y tenga más probabilidad de que se produzcan puentes de hidrógeno cuando se acerque un inhibidor, formando una cavidad lateral, por lo tanto el sitio activo incrementa su tamaño por la creación de un espacio extra. Los sitios importantes Tyr 385 y Arg 120 se mantienen igual en ambas COXs [Vane, 1997; Nijkamp, 2005, Botting, 2010].

2.6. Mecanismo de acción de la indometacina.

La IMC permite el incremento de la producción de interleucina-1 (IL-1 o factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), este efecto ha sido considerado importante para el desarrollo de úlceras gastrointestinales (GI) y asma [Rainsford (2007)]. La IMC ha demostrado también la inhibición de la liberación de histamina [König W, 1987] y la potenciación de la ruta de lipooxigenasa, en contraste con otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos (su efecto con respecto a la vasoconstricción cerebral sigue en debate) [Docherty, 1987; Mosca, 1997].

La acción terapéutica y adversa de la IMC depende de la disminución en la producción de PGs. Actúa como inhibidor potente no selectivo de la biosíntesis de prostanoideos (e.g., PGE₂, PG₁₂) mediada por COX, a partir del ácido araquidónico, en los sitios de inflamación con actividad antiinflamatoria (Sección 2.5) [Hart, 1963]. La IMC, a diferencia de la aspirina que, por ejemplo, inhibe a las COXs por competencia con el ácido araquidónico por el sitio activo (Vane, 1996). La IMC no actúa de la misma manera con la COX-1 que con la COX-2, ya que se ha demostrado inhibir de manera irreversible a la COX-1 y de manera reversible a la COX-2 [Valentovic, 2007]. Se ha demostrado que la IMC y otros AINEs son capaces de inhibir algunas respuestas quimiotácticas de neutrófilos, por ejemplo, quimiotaxis y liberación de enzimas lisosomales [Shen, 1982].

2.7. AINEs y su complejación con Cu(II) y Zn(II). MAINES.

Es bien conocido que durante la inflamación de tejidos, se encuentran concentraciones altas de iones zinc y cobre [Fini, 2001]. A partir de esto, se creó un gran interés sobre el rol antiinflamatorio de estos iones metálicos, así como su acción sinérgica cuando se complejan



con AINEs comunes. Esta asociación con iones metálicos (especialmente Cu(II)), ha demostrado ser más activa que el fármaco, aún en su forma farmacológicamente inactiva [Fini, 2001]. Esto podría indicar que el agente activo no es el fármaco sólo, más bien se está llevando a cabo un efecto sinérgico que lleva a la inhibición de la actividad de alguna metalenzima involucrada en la inflamación [Fini, 2001]. La necesidad de desarrollar fármacos más potentes y menos dañinos, de los que ya son usados en humanos y en veterinaria, ha llevado a la preparación, caracterización y estudio de los complejos metal-AINEs (MAINEs).

La relación mononuclear/dinuclear de los complejos MAINE parece tener un efecto en su actividad biológica [Dillon, 2004]. En particular, para complejos MAINE, donde el metal es Cu(II) ó Zn(II) y los AINES son carboxilados. Se ha encontrado evidencia de complejos carboxilato monodentados y bidentados monoméricos, aunque también existen las formas dinucleares de puente carboxilato. Los factores que propician que una especie predomine por encima de otra, no son totalmente conocidos, se cree que la existencia de alguna especie en particular no depende sólo del ligante principal, parece ser que la naturaleza del disolvente, el cual puede actuar también como ligante, también es un factor determinante [Dillon, 2004]. Las diferencias en la química de coordinación de Cu(II) y Zn(II) se debe entender en término de sus propiedades electrónicas. Los complejos Cu(II) d^9 , en el caso de complejos dinucleares, donan un electrón para formar un enlace Cu(II)-Cu(II) significativo, lo cual mantiene los dos iones a una misma distancia ($\sim 2.6 \text{ \AA}$). Los complejos CuAINE de ácidos carboxílicos, existen como especies mononucleares o dinucleares, pero hay una preferencia hacia la forma dinuclear en forma de *rueda de paletas* parecida a la estructura del Cu(II)-acetato ($\text{Cu}_2(\text{AcO})_4$) [Dillon, 2004] en estado sólido. Por otro lado, Zn(II) tiene una subcapa electrónica d llena y la falta de fuerza metal-metal requiere que la estructura dinuclear se estabilice, lo que resulta en distancias variables Zn(II)···Zn(II) generalmente $\geq 2.9 \text{ \AA}$, para evitar las fuerzas repulsivas Zn(II)···Zn(II). Además de que hay un incremento en los ángulos Zn(II)-O-C, (O: oxígeno y C: es el carbono del carboxilato puente) comparados a los complejos de Cu(II), para acomodar la separación tan grande [Dillon, 2004; Zhou, 2000].

La mayoría de las especies mononucleares, unidas a carboxilato, existen en una configuración *trans* con el enlace unidentado bis(carboxilato), el número de coordinación va de 4 a 6 alrededor del átomo de Cu(II). La coordinación dependerá del disolvente utilizado,



formando en ocasiones pseudo-octahedros o cuadrados planos. Se ha reportado que para favorecer la formación de complejos mononucleares sobre los dinucleares de Cu(II) se debe incrementar la fuerza ácida de los grupos carboxilato, por ejemplo, halogenación del grupo alquilo e incrementando basicidad, por ejemplo piridina e imidazol de otros ligandos coordinados [Weder, 2002].

Las especies dinucleares CuAINE, como se mencionó antes, presentan una estructura de *rueda de paletas*, con el disolvente de síntesis unido en la posición *trans* al enlace Cu(II)–Cu(II). La distancia Cu(II)–Cu(II) en estas especies generalmente se incrementa con la acidez del ligante, y al mismo tiempo hay movimiento del átomo de carbono fuera del plano basal de su poliedro de pirámide cuadrada. Un ejemplo es la diferencia en distancia del enlace Cu(II)–Cu(II) y el Cu basal en los siguientes complejos: Para $[\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ 2.616(1) y 0.32 Å ($\text{pK}_a = 4.756$); para $[\text{Cu}_2\text{Dic}_4]$ 2.6265(8) y 0.203 Å ($\text{pK}_a = 3.94$), y para $[\text{Cu}_2(\text{CF}_3\text{COO})_4(\text{quinoline})_2]$ 2.886(2) y 0.19 Å. ($\text{pK}_a = 0.52$) [Dillon C. T, 2004]. Es claro que con la quinolina ($\text{pK}_a = 0.52$) la distancia es mayor. De acuerdo a estos valores, para la IMC ($\text{pK}_a = 4.5$), pueden esperarse separaciones Cu(II)–Cu(II) mayores de 2.6 Å.

A diferencia de los complejos CuAINE, los complejos ZnAINE tienden a ser dominados por especies mononucleares, aunque hay evidencia de que los complejos dinucleares, se pueden presentar. Dentro de las especies dinucleares, se ha reportado que dentro una estructura de puentes tetracarboxilato, las distancias Zn(II)⋯Zn(II) pueden llegar a ser de hasta 3.452 Å [Zhou, 2000]. Existen muchos ejemplos con diversas y variadas estructuras en donde es posible observar la especie *cis*- $[\text{Zn}(\text{IMC})_2(\text{L})_2]$ en donde el AINE actúa como un quelato, también pueden existir estructuras hexa o penta coordinadas mononucleares en donde el AINE puede actuar como quelato o ligando monodentado y complejos tetrahédricos con ligando carboxilato monodentados. La diversidad de las estructuras observadas para los complejos de Zn(II) son un reflejo de la configuración electrónica $3d^{10}$ en donde los factores electrónicos ya no son importantes en direccionar tipos estructurales, en contraste a Cu(II) [Dillon, 2004; Zhou, 2000].



2.8. Complejos metal-indometacina (MIMC; $M = \text{Cu(II)}$ ó Zn(II)).

La necesidad de encontrar nuevos fármacos antiinflamatorios menos dañinos y más efectivos para su uso en humanos como en animales ha llevado a la preparación de sales de iones metálicos tanto de Cu(II) como Zn(II) con IMC [Morgan, 2001]. Estos complejos han demostrado ser un poco más potentes que la IMC libre y mucho menos dañina [Dillon, 2003]. Las constantes de formación y de solubilidad obtenidas por Fini en 2001 son: Cu(II) con IMC tiene un valor de $[K_f = 7.0 (\pm 1.0) \times 10^9]$ y $[K_{ps} = 3.0 (\pm 0.3) \times 10^{-10}]$, en el caso del Zn(II) $[K_f = 3 (\pm 1) \times 10^3]$ y $[K_{ps} = 1.8 (\pm 0.1) \times 10^{-11}]$ [Fini, 2001] En ambos caso los complejos tiene una baja solubilidad como IMC. Se ha demostrado que los complejos Cu(II) con IMC (CuIMC) se absorben bien en intestinos de ratas [Weder, 2002]. A pesar de que los complejos dinucleares CuIMC tienen baja solubilidad, se observan niveles en sangre comparables a IMC y penetración rápida de CuIMC a través de la membrana celular intestinal, esto es una pista de una posible diferencia en la manera de absorberse, comparada con IMC, no debida a la complejación en sí, más bien debido a coeficientes de partición que favorecen al complejo al atravesar la célula intestinal [Weder, 2002]. Mientras que el porcentaje de CuIMC absorbida, a través del lumen intestinal, es incierto, se sabe aún menos sobre la disposición sistémica [Weder, 2002].

Las observaciones al administrar, en perros, el complejo dimérico $[\text{Cu}_2(\text{IMC})_4(\text{DMF})_2]$ dónde la IMC libre sería fatal, muestran que el complejo es estable en el estómago y tal vez absorbido por el plasma. Estudios *in vitro* no han demostrado lo observado *in vivo* [Weder, 2002]. La potencia que han demostrado los complejos CuIMC en comparación con la HIMC libre, son muy parecidos en ensayos de edema inducidos por caragenina [Weder, 2002]. El método de administración del complejo es crucial para su eficacia y toxicidad [Dillon, 2003], además de la importancia de las especies mononucleares o dinucleares formadas.

Se ha demostrado que el Zn(II) incrementa la velocidad de curación de las úlceras gástricas, y los complejos Zn(II) con IMC (ZnIMC) también se han identificado como fármacos antiinflamatorios [Singla, 1995], debido a efectos, en algunos casos, hasta 3 veces mayores a la IMC libre, muy probablemente a que hay mejor solubilidad y velocidad de disolución. [Singla, 1995; Abou-Mohamed, 1995]. Hasta el momento, los reportes estructurales de las



especies de ZnIMC [Zhou, 2000] han demostrado que para los complejos sólidos de ZnIMC con DMA (Dimetilacetamida), Piridina y NMP (N-metil-2-pirrolidona), los complejos son principalmente especies dinucleares, con la IMC arreglada en forma de *rueda de paletas* (Fig. 2.28) sobre el eje Zn(II)⋯Zn(II). Cada catión Zn(II) tiene una geometría de pirámide cuadrada, con una molécula de solvente en la punta de la pirámide. La separación Zn(II)⋯Zn(II) es de 2.9686, 2.969, 2.934 Å para [Zn₂(IMC)₄(DMA)₂], [Zn₂(IMC)₄(Piridina)₂] y [Zn₂(IMC)₄(NMP)₂], respectivamente; lo cual indica que son menores al máximo que se puede encontrar para los complejos de este tipo, pero mayores que los complejos dinucleares de [Cu₂(IMC)₄(DMF)₂] de distancia Cu(II)–Cu(II) 2.630 Å [Weder, 1999].

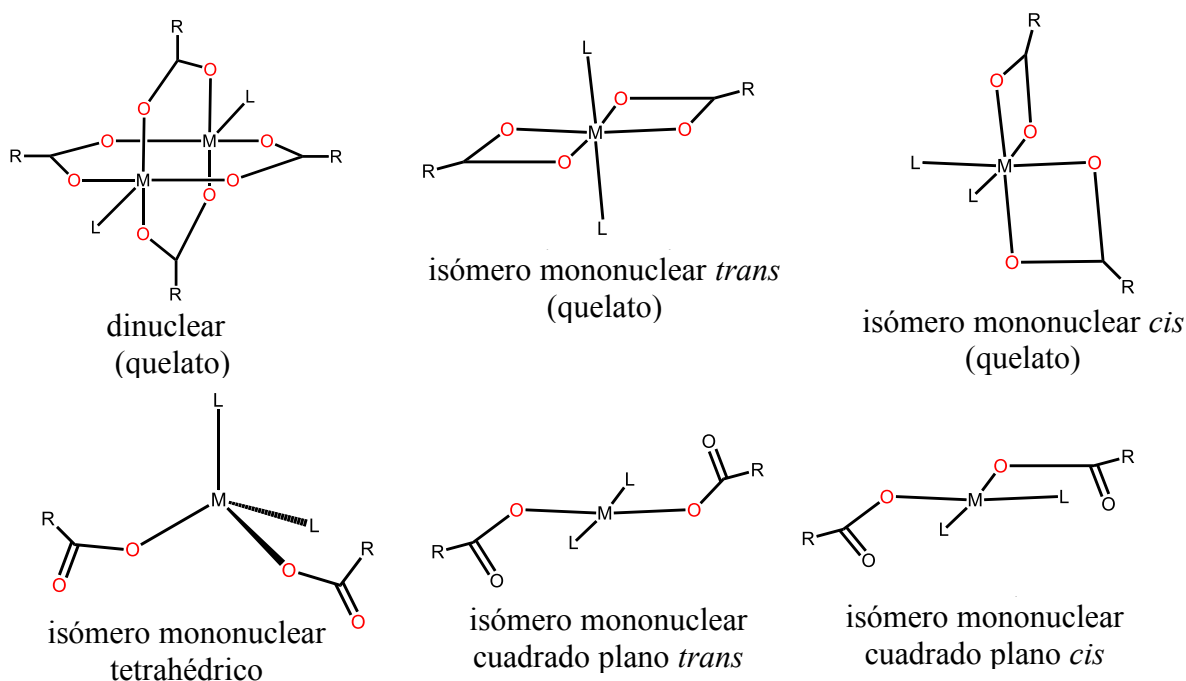


Fig. 2.28. Posibles estructuras de los complejos MIMC, siendo M: Cu(II) ó Zn(II); R: IMC.

En el estudio de Zhou del 2000, se describe estructuralmente a los complejos de ZnIMC con etanol, metanol y agua, describiéndolos principalmente como mononucleares. Una de las diferencias que las especies mononucleares presentan con los dinucleares es en la disminución del ángulo O–C–O, siendo de $\sim 119^\circ$ para los mononucleares y de $\sim 126^\circ$ para los dinucleares, siendo estos ángulos muy parecidos a los ya observados para otros mononucleares y dinucleares de los dihidratos Zinc-acetato [Ishioka, 1997] y de



[Cu₂(IMC)₄(DMF)₂]. Es probable que los ligantes que sean bases de Lewis, relativamente débiles, como el etanol, metanol o agua; no soporten un centro metálico con un número de coordinación menor de 6 en los complejos ZnIMC, por lo que esta puede ser una razón determinante para la estabilidad de las especies dinucleares [Zhou, 2000].

No hay duda de que los complejos dinucleares son preferibles para complejos de CuIMC en comparación con ZnIMC. Además de que las pruebas realizadas de los complejos de [Cu₂(IMC)₄(DMF)₂] han demostrado tener una menor toxicidad en el estómago y en el intestino delgado, mientras que [Zn₂(IMC)₄(DMA)₂] es poco tóxico en el intestino delgado pero tóxico en el estómago [Zhou, 2000], por lo que, la toxicidad de los diversos complejos dependerá de la estabilidad relativa de los complejos dinucleares.

Pocos fármacos MIMC están presentes en el mercado, por ejemplo; el fármaco CuAlgesic es distribuido principalmente en Australia, para el tratamiento en perros y caballos en enfermedades inflamatorias [Dillon, 2003]. Esta presentación comercial ha demostrado tener menos efectos secundarios GI y del sistema nervioso central en comparación a la HIMC libre [Dillon, 2003].

2.9. Mecanismo de acción de los complejos MAINES y MIMC.

Entre los modos de acción que se han propuesto, para los complejos de CuAINE, además del mismo mecanismo para los AINES (Sección 2.5), se encuentran: la regulación baja y estabilización de leucocitos polimorfo nucleares (PMNL, por sus siglas en inglés), que son parte del sistema inmunológico y ejercen actividad fagocítica (incluyendo inhibición de O₂^{-•} sintetizado por PMNLs); baja regulación de fosfolipasas A₂ (las cuales activan/liberan el enlace de membrana del ácido araquidónico antes de su conversión a COXs y lipooxigenasas, para su posterior transformación a prostanglandinas y leucotrienos, respectivamente); inhibición de peroxidación lipídica y oxidación microsomal *nicotinamida adenina dinucleótido fosfato* (NADPH, por sus siglas en inglés) y modulación de actividad del óxido nítrico sintetasa [Weder, 2002].

Cualquiera que sea el mecanismo de acción de los complejos CuAINE, exhiben una actividad mimética-SOD (superóxido dismutasa) marcada y esto se propone comúnmente para su



actividad antiinflamatoria. La SOD compite con el óxido nítrico (NO) por la expulsión de O_2^- . NO es reconocido como un mediador crítico de la mucosa GI [Weder, 2002] por el cual puede tomarse en cuenta para el efecto de preservación GI del complejo CuAINE ya que al parecer NO ayuda a que se forme la asociación COX hierro heme en el estado Fe(III), que lleva a la formación de PG protectoras [Weder, 2002].

Los complejos de CuIMC han sido considerados como complejos de cobre análogos a SOD y usados como ejemplos de SOD apróticos [Weser, 1980]. Por lo tanto, el modo de acción de los complejos MIMC es impactado por la actividad de la SOD, ya que los complejos no son transportados intactos al sitio de la inflamación, ya que los complejos MIMC al parecer pueden formarse *in vivo* y reducir la inflamación, no importando la manera de administración, HIMC, CuIMC ó ZnIMC [Dillon, 2003]. Se ha documentado que la SOD existe en la mucosa del tracto GI, y se cree que es una enzima clave en el mecanismo protector de la mucosa gástrica y duodenal contra especies dañinas. El incremento de toxicidad de los complejos MIMC sugiere ser por la hidrólisis ácida, que puede darse en el estómago, y por lo tanto liberar HIMC. Pero debido a su naturaleza lipofílica, los complejos MIMC tienen la tendencia a mantenerse en micelas y mantenerse intactos hasta su absorción [Dillon, 2003]. Se ha demostrado que los complejos MIMC presentan toxicidad GI más bajas que la IMC libre [Dillon, 2003].

Se piensa que el modo de acción de los complejos MIMC es igual a la IMC libre, la cual a su vez sigue el mecanismo general de los AINES. Los complejos son es muy grandes para acomodarse en los espacios que se generan en las COX. Por lo tanto, los residuos IMC entrarán en contacto con las COXs, así que tampoco funcionan como inhibidores selectivos a COX-2 [Dillon, 2003].

Debido a la baja solubilidad de los complejos MIMC sólidos, su estudio se vuelve difícil tanto *in vitro* como *in vivo*, por lo que su estudio en solución acuosa es poco explorado (Rodríguez-Laguna, 2016). El conocer las especies, ya sean nucleares o dinucleares de los complejos MIMC en solución, sería de gran ayuda, para entender de mejor manera, el modo de acción en los sitios activos de las enzimas encargadas en las diversas afecciones



inflamatorias. Además de facilitar la preparación de formulaciones menos tóxicas y más efectivas.

2.10. Historia de las ciclodextrinas.

2.10.1. Primera Etapa (1891-1935). Descubrimiento de las ciclodextrinas. Periodo de duda.

El inicio de la era de las *celulosinas* comenzó con una observación fortuita por Antoine Villiers, un investigador curioso francés en la última parte del siglo XIX, exactamente en el año de 1891 [Szejtli, 1998]. Villiers se encontró con cristales en desechos de alcohol, dejados por la producción de productos de degradación de almidón con un cultivo bacteriano de *Bacillus amylobacter* (*Clostridium butyricum*) e impurezas posibles de *Bacillus macerans* [Szejtli, 1998]. A estos cristales les llamo *celulosinas*, por la resistencia de la hidrólisis ácida y su falta de azúcares reductores, que son propiedades parecidas a las de la celulosa. En ese tiempo Villiers observó que se formaban dos *celulosinas* cristalinas distintas, las representó como múltiplos de la fórmula $[(C_6H_{10}O_5)_2 + 3H_2O]$ [Szejtli, 1998].

Franz Schradinger en 1904, aisló un nuevo microorganismo al cual llamó *Rottebazillus I*, varios meses después, decidió cambiarlo al nombre en latín: *Bacillus macerans*. Los rendimientos obtenidos de *celulosinas* por Schardinger usando sólo *Bacillus macerans* fueron 10 veces mayores a los de Villiers [Szejtli, 1998; Crini, 2014]. A Schardinger se le conoce como el precursor o iniciador de la química de las *celulosinas* [Kurkov, 2013; Crini, 2014]. Entre 1905 y 1911, Schardinger dio los primeros detalles de la preparación, separación y purificación de las primeras *celulosinas*; por lo anterior, en este periodo a las *celulosinas* se les llamó *dextrinas de Schardinger*. En 1911, Hans Pringsheim y su equipo de trabajo fueron los líderes en la investigación de las *dextrinas de Schardinger*, se les reconoce como los descubridores de que las *dextrinas de Schardinger* cristalinas y sus acetatos, tengan la tendencia de formar complejos con varios compuestos orgánicos, además de clasificarlas como poliamilosas [Szejtli, 1998]. En este periodo se determina la estructura del almidón [Crini, 2014]. En este mismo periodo, Max Ulmann observa que el huésped, en un complejo de inclusión, puede formar diferentes estructuras cristalinas con las mismas *dextrinas de Schardinger*. Mientras, Zacherov, J. P., describía las características del *Bacillus macerans*.



Una de las principales confusiones durante este periodo inicial, fue la toxicidad de las *dextrinas de Schardinger* [Freudenberg, 1935]. Otras confusiones surgieron de la variedad de terminologías de los compuestos y la falta de certeza en la estructura de las *dextrinas*.

2.10.2. Segunda Etapa (1935-1970).

De 1935 a 1950 fue el *periodo de madurez* de las *dextrinas de Schardinger*, gracias a dos grupos de trabajo, el de Karl Johann Freudenberg y el de Dexter French. Estos grupos aceleraron el desarrollo científico de las *dextrinas de Schardinger* [Crini, 2014]. En 1935, Freudenberg describió un método para las síntesis de *dextrinas de Schardinger* de alta pureza. Usando un método crioscópico, para la determinación del peso molecular, reportó (erróneamente) el número de unidades de glucosa que las *dextrinas de Schardinger* contenían: cinco para α -*dextrina de Schardinger* y seis para β -*dextrina de Schardinger* [Crini, 2014; Freudenberg, 1935]. En el año de 1936, postula la estructura cíclica de estas *dextrinas de Schardinger* [Freudenberg, 1936a; Freudenberg, 1936b; Freudenberg, 1943; Freudenberg, 1948; Crini, 2014; Szejtli, 1998] junto a sus colaboradores, llega a la conclusión de que las *dextrinas de Schardinger* se forman de unidades de maltosa y contienen sólo enlaces α -(1→4)-glicosídicos.

Al final de la década de 1930, Freudenberg sugirió por primera vez la hidrofobicidad de la superficie interna de las *dextrinas de Schardinger*. Notó como tenían la habilidad de incluir moléculas en su cavidad, y años más tarde fue también el primero en mostrar la participación de las fuerzas hidrofóbicas en la formación de complejos. En 1939, Freudenberg propone el primer mecanismo en el que las *dextrinas de Schardinger* son preformadas, dentro de las macromoléculas de almidón [Freudenberg, 1938; Freudenberg, 1939]. Él mismo, rechaza este mecanismo, así que propone un segundo mecanismo basándose en el trabajo de Charles Samuel Hanes de la Escuela de Botánica de Cambridge y su modelo helicoidal de la estructura del almidón y la naturaleza α -D de las unidades de glucosa, años más tarde el mecanismo lo confirma French, usando cromatografía, y también Takeo y Kuge, usando cristalografía [French, 1954; Takeo, 1969; Takeo, 1972; Kainuma, 1984]. Para 1942, French y Rundle usando difracción de rayos X (XRD), y medidas de densidad cristalina, determinaron los pesos moleculares de la α - y β -*dextrinas de Schardinger* descubriendo



también el número exacto de unidades de glucosa por dextrina, siendo seis y siete, respectivamente. A las *dextrinas de Schardinger*, French les llamó *cicloamilosas* [Crini, 2014]. En este mismo año Tilden y Hudson aíslan, del *Bacillus macerans*, la enzima responsable de la conversión de almidón a *cicloamilosas*, a la cual se le llamó cicloamilosa glucanotransferasa [Tilden, 1939, 1942a, 1942b; Crini, 2014]. En 1948, se confirma la estructura cíclica de las *cicloamilosas* por rayos X. Además, en el periodo de 1948 a 1950 Freudenberg y su equipo de trabajo descubrieron la γ -*cicloamilosa*, elucidando su estructura [Freudenberg, 1948; Freudenberg, 1950]. Freudenberg también propuso las posibles existencias de *cicloamilosas* con 9 o 10 unidades de glucosa [Crini, 2014; Szejtli, 1998]. French en 1949 describe los protocolos para preparar las tres cicloamilosas nativas. [French, 1949a; French, 1949b; Crini, 2014].

A finales del *periodo de madurez*, los resultados presentaban varias contradicciones, debido a la confusión en nomenclatura, pureza de las *cicloamilosas* y las diferencias en los protocolos de purificación. Eran aún muy costosas y disponibles en pequeñas cantidades [Crini, 2014].

Periodo de exploración (1950-1970).

A finales de la década de 1940, los grupos de trabajo que encabezaban las investigaciones de *cicloamilosas* eran los de French y Friedrich Cramer, comenzando a trabajar en su producción enzimática, fraccionándolas a componentes puros y caracterizando sus propiedades químicas y físicas verdaderas. Cramer se enfocaba también en las propiedades de los complejos de inclusión de las *cicloamilosas* ó *ciclodextrinas* (CDs) como él les llamó [French, 1957; Robyt, 1998; Szejtli, 1998]. En 1951, Hale y Rawlins publican la purificación de la enzima CGT [Hale, 1951].

Freudenberg, Cramer y Plieninger obtuvieron una patente en 1953 [Freudenberg, 1953], demostrando la protección de sustancias fácilmente oxidables contra oxidación atmosférica, la reducción de pérdidas de sustancias altamente volátiles, etc., al complejarse con CDs [Szejtli, 1998]. Además, Cramer daba las bases para la catálisis supramolecular que involucraba a las CDs. En este mismo año Broser y Lautsch usaron ensayos espectrofotométricos para determinar que las CDs y moléculas de colorantes se combinan en



una relación 1:1 [Broser, 1953; Crini, 2014]. Para 1956, Cramer introduce la noción de complejo de inclusión [Cramer, 1956; Cramer, 1957]. Un término similar alemán es: *einschlussverbindungen* (literalmente, complejo de inclusión) que fue creado por W. Schlenk en 1950 [Schlenk, 1950; Schlenk, 1952]. En 1957, French descubrió CDs más grandes (δ y ϵ aunque no tenía claro si verdaderamente eran anillos con número de glucosas de 9, 10 unidades, ó CDs glucosil-, maltosil- o diglucosil-ramificadas). A finales de 1950, French y colaboradores habían establecido, el peso molecular, la estructura química exacta, las dimensiones y los tipos de enlaces de la α -, β - y γ -CD [Pulley, 1961]. En 1959, estudios de XRD mostraron que las moléculas pequeñas, tales como el yodo, eran capaces de interactuar con la cavidad de las CDs, confirmando los estudios de Freudenberg y Cramer [James, 1959].

A finales de 1960, ya se conocían los métodos de preparación a escala de laboratorio, sus estructuras, sus propiedades químicas y físicas, así como sus propiedades de formación de complejos de inclusión [Szejtli, 1998]. Después de que se publicaron estudios de toxicología adecuados, en dónde se demostró que no había una toxicidad inherente de las CDs, las publicaciones sobre CDs incrementaron significativamente [Szejtli, 1998]. En 1961, Pulley y French indicaban la existencia de CDs que tenían más de 8 unidades de glucosa, confirmando lo supuesto por Freudenberg y su alumno Cramer en 1948 [Pulley, 1961; Crini, 2014]. Para 1965, French reportaba la estructura y las dimensiones, no sólo de la δ - y ϵ -dextrina, si no de la ζ -CD y η -CD, aunque el descubrimiento, de estas dos últimas CDs, se le atribuye a Thoma y Stewart [Crini, 2014]. En 1965, Hybl y colaboradores fueron los primeros en determinar la estructura de los complejos entre α -CD y acetato de potasio, usando datos de XRD en tres dimensiones, resultados que demostraron que las cavidades de las CDs tenían una forma ligeramente de V [Hybl, 1965; Crini, 2014]. A mediados de esta década, varios estudios demostraron que las impurezas atrapadas pueden hacer a las CDs tóxicas [Crini, 2014]. En 1967, Cramer es capaz de detallar el mecanismo de formación de un complejo de inclusión, dando la primera explicación científica [Cramer, 1967; Crini 2014]. En este periodo se reconoce a Cramer por su trabajo con los complejos de inclusión, en solución y en estado sólido. [Crini, 2014].



Llegando al final del *periodo de exploración*, las estructuras, las propiedades fisicoquímicas y su preparación habían sido bien definidas y explicadas, además se perfeccionó el mecanismo de acción del *B. macerans*, así como los protocolos de purificación [Crini, 2014].

2.10.3. Tercera Etapa. Periodo de aplicación. (1970- a la actualidad).

En la década de 1970, la no toxicidad de los CDs se va aceptando más y varios fabricantes comienzan a producirlas y comercializarlas [Crini, 2014]. En 1970, se proponen modelos moleculares Corey-Pauling-Koltun para explicar las características de las CDs [Crini, 2014]. Y en este año Breslow, en la universidad de Columbia en 1970, sintetiza una enzima artificial (una CD modificada con una coenzima) que imita la reacción bioquímica catalizada por transaminasas de origen natural [Breslow, 1980-a; Breslow, 1980-b; Breslow, 1982]. Un año después, este mismo laboratorio, logra catalizar una cicloadición de Diels–Alder, la cual ni una enzima natural ni un catalizador común podía hacerlo, usando una CD modificada [Crini, 2014]. Thakkar y Demarco, en 1971, fueron los primeros en demostrar la formación de complejos de inclusión entre varias sustancias orgánicas y β -CD, usando RMN en D₂O [Thakkar, 1971; Crini, 2014]. En 1972, Manor y Saenger demostraron que la fórmula [(C₆H₁₀O₅)₆ – H₂O] era el hexahidrato- α -CD, la misma fórmula que se propuso para describir una *celulosina* de Villiers en 1891 [Manor, 1972; Szejtli, 1998].

A mediados de esta década, comenzaron a aparecer las aplicaciones farmacéuticas, ganando terreno rápidamente, principalmente en el aumento de solubilidad de fármacos evitando el uso de sustancias como solventes orgánicos y surfactantes no iónicos, que causan irritación [Crini, 2014]. Ono Pharmaceutical Co., una empresa japonesa, produce el primer fármaco basado en CD. Un fármaco basado en un complejo de prostanglandina E2 con CD, llamado Prostarmonen, en 1976, año en el cual Japón también autoriza el uso de α - y β -CD como aditivo alimenticio (mientras que en Hungría se autoriza en 1983 y en Alemania en 2000) [Crini, 2014].

En 1977; Saenger, usando ¹H RMN y simulación por computadora, mostró (i) que las seis unidades glucosa tenían conformaciones idénticas, (ii) que las moléculas α -CD tenían simetría hexagonal, y (iii) la presencia de puentes de hidrógeno intramoleculares en CDs,



[Wood, 1977; Crini, 2014] confirmando las conclusiones previas de Hybl, y Cramer [Casu, 1966; Hennrich, 1965].

Para 1979, la producción industrial de CDs comenzó, gracias a los avances de ingeniería genética y la confección de CGTasas para incrementar actividad, selectividad y especificidad hacia diferentes CDs, que condujeron a productos de alta pureza, adecuados para usos farmacéuticos y alimentarios [Crini, 2014]. Entre 1978 y 1982, Lindner y Saenger mostraron, con estudios cristalográficos, que la β -CD se asocia con 12 moléculas de agua (dodecahidrato) [Lindner, 1982; Lindner, 1978].

En la década de 1980, una serie de CDs más grandes fueron aisladas y estudiadas, por ejemplo la δ -CD de 9 miembros que presenta mayor solubilidad en agua que la β -CD, pero menor que la α y γ -CD [Miyazawa, 1995; Endo, 1997; Larsen, 1997; Szejtli, 1998; Taira, 2006; Crini, 2014]. En esta década, también comienzan las primeras aplicaciones cromatográficas, espectrofotométricas y colorimétricas, comenzando un desarrollo espectacular [Crini, 2014]. En 1981, Szejtli organizó el primer simposio internacional sobre las ciclodextrinas, en Budapest y un año después, escribió el primer libro sobre las CDs. En este año, se desarrolló un nuevo derivado de CD llamado HP- β -CD, un potente solubilizador comercializado como Encapsin o Cavitron por Josef Pitha [Szejtli, 1981; Szejtli, 1982; Crini, 2014]. En 1982, Szejtli explicó la ganancia en entalpía por la llegada espontánea del huésped, desplazando moléculas de agua activas retenidas en la cavidad no polar de la CD en solución acuosa (Budapest, 1982. Szejtli, 1988; Crini, 2014). En 1983, se autoriza el uso de la α - y β -CD en la industria farmacéutica en Japón (Crini, 2014). En este mismo año, Fujiwara y colaboradores demuestran la existencia de un nuevo solvato, para el cual 11 moléculas de agua se asocian a cada molécula de β -CD (Fujiwara, 1990; Pande, 1995; Crini, 2014). En 1984, las CDs bajan de precio considerablemente, y se comercializan las columnas cromatográficas a base de CDs con el nombre CYCLOBOND, usadas para separaciones quirales [Crini, 2014]. En 1987, en Francia se autoriza el uso de CD en alimentos como vehículo para saborizantes [Crini, 2014]. Buvari y Barcza, en 1988, demostraron que la deslocalización de la carga de resonancia incrementa la densidad electrónica y la polarizabilidad del sustrato, incrementando las fuerzas de London y por lo tanto la estabilidad del complejo, siendo esta la razón por la cual el *p*-nitrofenolato de sodio forma un complejo



más estable con β -CD que el *p*-nitrofenol [Buvari, 1988; Crini, 2014]. En el mismo año, Palepu y Reinsborough reportaron que la conductividad de las soluciones de surfactantes iónicos esta fuertemente afectada por la formación de los complejos de inclusión con CDs, adjudicándole este resultado a la anfifilicidad del huésped, la cual lleva a especies fuertemente asociadas [Palepu, 1988; Crini, 2014]. Además, en este mismo año, Europa tiene su primer fármaco desarrollado por la compañía Italiana Chiesi Farmaceutici, un fármaco de piroxicam y β -CD, llamado Brexin [Crini, 2014].

En la década de 1990, Japón se vuelve el principal consumidor de CD en el mundo, para su uso en la industria de: alimentos (~60%), cosméticos (~10%), farmacéutico (~5%) y agricultura (~5%, pesticidas) [Crini, 2014]. A principios de esta década, Valentino J. Stella de la universidad de Kansas, KS, registra dos patentes de la síntesis de la sulfobutiléter-ciclodextrina (SBE-CD) por el proceso llamado Captisol (CYDEX Co., USA) [Stella, 1996; Stella, 1999; Crini, 2014]. En 1991, Nishijo y colaboradores mostraron que la fluorescencia también provee datos interesantes, para caracterizar la formación del complejo de inclusión de 6-*p*-toluidinilnaftaleno-2-sulfonato y β -CD, usando la geometría del sustrato y las diversas interacciones [Nishijo, 1991; Nishijo, 1992; Crini, 2014]. Para 1992, Susuki mostró que las interacciones dipolo-dipolo pueden llevar a la formación de complejos inesperados, por ejemplo, en colorantes azo, que a pesar de su gran masa, la parte sulfonada se inserta en la cavidad, destacando la importancia de fuerzas de van der Waals para producir esto [Suzuki, 1992; Crini, 2014]. Durante esta década, las CDs se propusieron para la síntesis de nuevas moléculas supramoleculares y materiales tales como catenanos o rotoxanos [Harada, 2004; Harada, 2009; Crini, 2014]. El primer caso de un catenano basado en CD, fue reportado por Stoddart (Universidad de California) en 1993 [Nepogodiev, 1998; Crini, 2014]. El precio de 1 kg de β -CD para 1970, rondaba los \$2000 US, y estaba disponible solo como un químico fino poco común. Después de 25 años, varias compañías estaban produciendo CDs y el precio del producto clave, β -CD, era de varios dólares por kilogramo, dependiendo de la calidad y cantidad. Las α -CD y γ -CD, así como varios derivados de las CD, ya se producían industrialmente [Szejtli, 1998].

Hasta 1997, aproximadamente, 100 derivados de diferentes CDs estaban comercialmente disponibles como químicos finos, principalmente para el uso en cromatografía, en



diagnósticos y como intermediarios de síntesis adicionales [Szejtli, 1998]. En este año, Hamai y Satoh reportaron la preponderancia de las interacciones dipolo-dipolo electrostáticas durante la complejación de los sustratos con fuertes momentos dipolares (por ejemplo fenoles) [Hamai, 1997; Crini, 2014]. Además de que en este año, se aprueba y se lanza al mercado, en E. U., la primer formulación en solución oral de HP- β -CD-itraconazol [Crini, 2014]. En esta década (1990), existía un acuerdo general, en el cual, durante la formación de un complejo de inclusión, un set completo de interacciones intermoleculares están involucradas (puentes de hidrógeno, fuerzas de vander Waals, interacciones hidrofóbicas, interacciones estéricas, etc.) y cada una tiene su propio rol en el proceso general [Crini, 2014]. La primer evidencia de agregados de complejos de inclusión con huéspedes lipofílicos fue en 1998 [Mele, 1998; Kurkov, 2013].

El estatus regulatorio y normativo de las CDs, para su uso en alimentos y medicamentos, a evolucionado desde 1970 hasta nuestros días (Kurkov, 2013). En la década del 2000, se demuestra finalmente la reacción de transglicosilación catalizada por la CGTasa [Crini, 2014]. Para 2004, Szejtli estimó que existían más de 15000 derivados de CD, los cuales han sido estudiados y pueden mencionarse en la literatura [Crini, 2014].

Las CDs, hoy en día, son moléculas de interés en cosméticos, biotecnología y están probando ser atractivas en nuevos campos, tales como el medio ambiente (tratamiento de contaminantes). Los estudios también se están dirigiendo hacia la síntesis de materiales innovadores para el sector biomédico (prótesis, agentes terapéuticos, etc.) y para textiles (materiales *inteligentes*, cosmetotextiles) (Szejtli, 1998, Kurkov, 2013; Crini, 2014).

2.11. Características y propiedades de las ciclodextrinas.

2.11.1. Nomenclatura.

Una de las nomenclaturas más completa y unánimes, es la propuesta por Lichtenthaler e Immel, recomendada para las CD menores o cualquier oligosacárido cíclico, ésta sugiere que una CD de 5 unidades glucopiranososa sea llamada ciclo- α (1 \rightarrow 4)-glucopentósido [Szejtli, 1998]. Sin embargo, el uso de esta nomenclatura no ha sido ampliamente usada y otras nomenclaturas aún son utilizadas [Crini, 2014]. En este trabajo, por practicidad, se utilizará



el término ciclodextrina (CD), que se ha usado desde finales de la década de 1940 en esta área, llamándoles, por lo tanto, a las CDs más sencillas o nativas: α -, β -, y γ -CDs (Fig. 2.29).

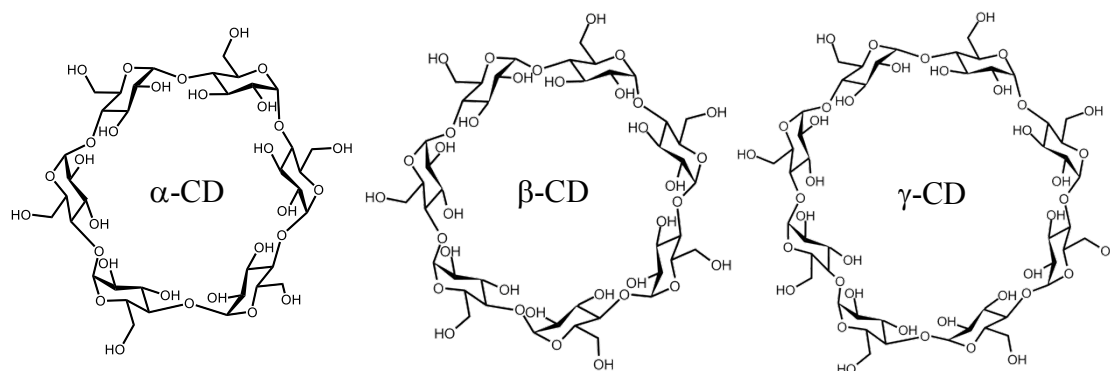


Fig. 2.29. Estructuras de las CDs nativas.

2.11.2. Propiedades físicas y químicas.

La degradación enzimática del almidón, generalmente resulta en la producción de glucosa, maltosa, maltotriosa, etc.; en otras palabras, una serie de malto-oligómeros de cadenas lineales o ramificadas, llamadas dextrinas. Las dextrinas son sustancias heterogéneas, amorfas e higroscópicas producidas en grandes cantidades para la industria alimentaria, textil, papelera, entre otras. Son consumidas sin aislamiento previo, en productos como cerveza y pan. Este tipo de degradación del almidón, es un proceso hidrolítico, ya que el producto primario del rompimiento de la unión glicosídica reacciona con agua [Szejtli, 1988].

Pero, si el almidón es degradado por la enzima *ciclodextrin glucanotransferasa* (CGT), el producto primario del rompimiento de la cadena, sufre una reacción intramolecular sin la participación de moléculas de agua. Los productos cíclicos de unidades α -D-glucopiranososa con uniones α -(1 \rightarrow 4) resultantes (Fig. 2.30) (también conocida como conformación 4C_1), son llamadas ciclodextrinas (CDs) (Fig. 2.29) [Loftsson, 1996; Kurkov, 2013]. Las tres CDs consideradas nativas son la α -CD, que es un ciclo que cuenta con 6 monosacáridos; la β -CD que cuenta con 7 monosacáridos y la γ -CD que tiene 8 (Fig. 2.29); el monosacárido para todas es la D-glucosa. Existen reportes de CDs más grandes como la δ -, ϵ -, ζ - y la η -CD [French, 1957-b; Pulley, 1961], las CDs con menos de 6 miembros de glucosa no son estables por efectos estéricos, confirmados por mapas de energía de conformación [Sundararajan,



1970]. Se ha comprobado que los residuos de CD están en la conformación de silla 4C_1 y que la cavidad adquiere una forma de V , lo que le da una estructura toroidal a todas las CDs.

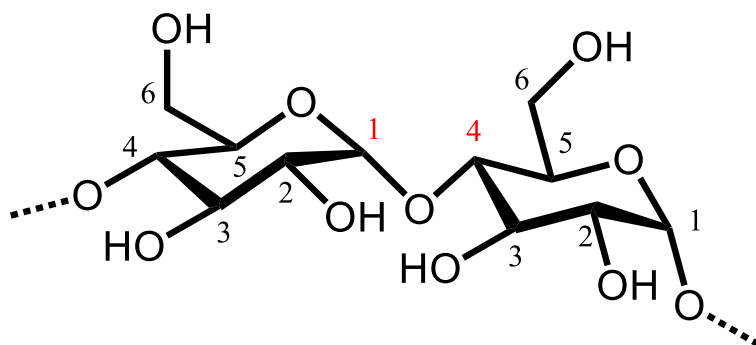


Fig. 2.30. Diagrama esquemático de dos unidades glucopiranosas de una molécula de ciclodextrina ilustrando los detalles de la unión α -(1 \rightarrow 4) y la numeración usada para describir los anillos de glucopiranosas (Bender, 1978).

La estructura de las CDs requiere acomodos especiales de grupos funcionales, que resultan en una variedad de características importantes: (i) como consecuencia de la conformación 4C_1 de las unidades glucopiranosas, todos los grupos hidroxilos secundarios se localizan en el lado del toroide más abierto, al estar en la cadena relativamente más rígida no pueden girar. Mientras que todos los grupos hidroxilo primarios se localizan en el lado opuesto (la parte más cerrada), estos hidroxilos pueden rotar de tal manera que pueden llegar a bloquear la entrada a la cavidad; (ii) el interior del toroide consiste sólo de un anillo de grupos C–H, un anillo de oxígenos glucosídicos y otro anillo de grupos C–H y (iii) el interior de la cavidad es relativamente apolar, comparada con agua, esta característica estructural es responsable del uso de CDs como solubilizantes de moléculas poco solubles en agua [Hybl, 1965; Crini, 2014; Kurkov, 2013]. Los grupos hidroxilo, de los C-2 y el C-3, de las unidades glucopiranosas forman enlaces de hidrógeno, los cuales estabilizan la forma de las moléculas y al mismo tiempo influyen significativamente su solubilidad en agua [Bender, 1978; Szejtli, 1998; Crini, 2014]. Los pares de electrones de no enlace, de los puentes de oxígeno glucosídico, están dirigidos hacia el interior de la cavidad, produciendo una densidad electrónica alta en esta zona y brindándole características de base de Lewis [Szejtli, 1998]. El grupo C-2-OH, de una unidad glucopiranosida, puede formar un puente de hidrógeno con el grupo C-3-OH, de la unidad de glucopiranosas adyacente, por lo que, en la molécula de CD se forma un cinturón secundario, debido a estos puentes de hidrógeno. La formación de estos puentes de hidrógeno produce una estructura rígida en la β -CD y probablemente son también



la explicación del porqué, la β -CD, tiene una solubilidad más baja en agua que todas las CDs [Szejtli, 1998]. Los puentes de hidrógeno son incompletos en la α -CD, debido a que una unidad glucopiranososa está en una posición distorsionada y sólo 4 puentes de hidrógeno se forman completamente, la γ -CD es una estructura no coplanar y más flexible, por lo tanto es la más soluble de las tres CDs [Szejtli, 1998]. Los puentes de hidrógeno de la β -CD son tan fuertes como los de la α -CD, pero con la temperatura se debilitan [Crini, 2014].

Las solubilidad en agua de las CDs son: α -CD 14.5 g/100 mL (145 g/L), β -CD 1.8 g/100 mL (18 g/L) y γ -CD 23.2 g/100 mL (232 g/L) [French, 1950; Crini, 2014]. Esta solubilidad aumenta con la temperatura. Tienen un máximo de solubilidad en soluciones etanólicas al 20-30%, no son fermentables, resisten el ácido y pueden ser convertidas en éteres bajo la acción de cloruros. [Villiers, 1891a; Villiers, 1891b; Crini, 2014]. Además de ser cristalinas, homogéneas y no higroscópicas [Crini, 2014; Szejtli, 1998].

Las CDs nativas no son iónicas, pero las interacciones electrostáticas con los huéspedes, son posibles debido a que las CDs tienen un momento dipolar. Sin embargo, a pesar de los numerosos resultados publicados, mostrando que un set completo de interacciones están involucrados, sigue habiendo un debate sobre la medida en que cada fuerza puede contribuir a la formación de los complejos [Crini, 2014].

Dependiendo de las condiciones, las CDs tienen diferentes formas cristalinas: la α -CD tiene tres formas diferentes: α -CD·6H₂O, forma I; α -CD·6H₂O, forma II, y α -CD·7.57 H₂O, forma III. La β -CD tiene 2 formas cristalinas en su forma hidratada: β -CD·12 H₂O y β -CD·11 H₂O, las diferencias estructurales dependen de la distribución o desorden de las moléculas de agua en la cavidad de la β -CD. En la β -CD·11 H₂O, las 11 moléculas de agua están distribuidas sobre 16 posiciones, ocho en la cavidad (6.12 moléculas de agua) y ocho en los intersticios (4.88 moléculas de agua) [Szejtli, 1988; Fujiwara, 1990; Pande, 1995; Crini, 2014]. En la β -CD·12 H₂O, la cavidad está ocupada por 6.5 moléculas de agua, distribuidas sobre ocho posiciones y las otras 5.5 moléculas están localizadas en los intersticios. Las moléculas de la cavidad muestran movimiento térmico intenso [Saenger, 1982; Szejtli, 1988; Crini, 2014]. La γ -CD sólo tiene una estructura cristalina: la γ -CD·13.3 H₂O que incluye 5.3 moléculas de agua, las cuales ocupan los 13 sitios disponibles [Szejtli, 1988].



Las CDs no tienen puntos de fusión definidos, pero se descomponen alrededor de 200 °C. Las propiedades termoanalíticas dependen del contenido de agua, la estructura cristalina, y velocidad de calentamiento [Szejtli, 1988].

En solución acuosa, las CDs no pueden considerarse como espacios vacíos. El volumen de la cavidad de 1 g de α -CD es de cerca de 0.1 mL. La energía requerida para mantener esta cavidad vacía es de cerca de 271 kJ/mol, el valor es tan grande que no puede concebirse como vacía. Con otras CDs, que tienen diámetros más grandes, esta energía es aún más grande. Si la cavidad estuviera vacía, entonces los volúmenes parciales específicos de las CDs deberían ser más grandes que la glucosa o maltosa: cosa que no se ha observado [Szejtli, 1988]. El efecto de la hidratación, sobre el diámetro del anillo y su forma, no es conocida todavía, aunque experimentos realizados, han mostrado que la distorsión del anillo en solución no es significativo [Szejtli, 1988]. La viscosidad de una solución, 9.5×10^{-4} M de α -CD es de 8.99 mP y de una solución de β -CD 9.98×10^{-3} M 9.436 mP. La del agua pura es de 8.93 mP.

Al ser productos de degradación del almidón, poseen muchas de las características químicas y biológicas similares a las dextrinas lineales solubles en agua. Aunque las reacciones de hidrólisis ácida y las reacciones de oxidación de peryodato, para romper las unidades de glucosa de las CDs, no producen ni ácido fórmico ni formaldehído, permitiendo demostrar una estructura cíclica [French, 1942; French, 1950]. Por lo tanto, la estructura cíclica de las CDs les proporciona de 3 a 5 veces más resistencia a la hidrólisis no enzimática, comparada con dextrinas lineales [Kurkov, 2013]. La degradación no enzimática de las CDs en solución acuosa, sigue una hidrólisis específica catalizada por ácidos de los enlaces α -(1 \rightarrow 4) para formar glucosa, maltosa y oligosacáridos no cíclicos, que contienen tantas unidades de glucosa como las CDs originales [Kurkov, 2013]. En solución acuosa, la vida media ($t_{1/2}$) para la apertura del anillo de β -CD es de aproximadamente 15 h a 70°C y pH de 1.1 [Kurkov, 2013].

En estado sólido, las CD son tan estables como la sucrosa o el almidón, y pueden ser guardadas por varios años a temperatura ambiente sin degradación detectable [Kurkov, 2013]. Las CDs son resistentes a la β -amilasa, que hidroliza el almidón de su extremo no reductor, pero son lentamente hidrolizadas por la α -amilasa, que al almidón lo hidroliza desde el



interior de la cadena del carbohidrato. La velocidad hidrolítica depende del tamaño del anillo y la fracción libre de CD. El mecanismo por el cual la CD resiste la hidrólisis, se debe a que todos los puentes de oxígeno se ocultan dentro de la cavidad central [Kurkov, 2013]. Por lo tanto, las CD libres se hidrolizan más rápido que aquellas CD ligadas en un complejo de inclusión y con un aumento en la velocidad de hidrólisis cuando se incrementa el tamaño de la cavidad. Por ejemplo, la α -CD y la β -CD son esencialmente estables frente a la α -amilasa en la saliva, mientras que la γ -CD, es rápidamente digerida por amilasa pancreática o salival [Kurkov, 2013]. La reacción de yoduro sirve para identificar al menos 2 CDs, con α -CD, el yoduro da un color amarillo-verdoso y la reacción yoduro con β -CD, da un color café-rojizo [Pringsheim, 1924-a; Pringsheim, 1924-b; Szejtli, 1998]. La α -CD es aproximadamente 1.5 veces más estable y la γ -CD es aproximadamente 1.5 veces menos estable que la β -CD. Sin embargo, la formación de complejos de inclusión aumenta significativamente la estabilidad química de la CDs. En comparación, su velocidad de hidrólisis se incrementa en el orden de α CD < β CD < γ CD [Szejtli, 1998].

Se ha observado que las CDs pueden formar agregados entre sí, a concentraciones muy por debajo de su solubilidad intrínseca, debido a puentes de hidrógeno. Estos agregados pueden tener diferentes formas: esféricas, partículas alargadas, así como fibras o tubos anormalmente unidos y extensas hojas a microescala [Kurkov, 2013].

Las CDs tienen poco efecto en disminuir la biodisponibilidad de fármacos de Clase I (clasificación BCS). Frecuentemente, aumentan la biodisponibilidad de los fármacos de Clase II y clase IV, sin embargo tienen un efecto despreciable frente a los fármacos de Clase III [Kurkov, 2013].

2.11.3. *Ciclodextrinas sustituidas.*

La β -CD al igual que la α -CD y la γ -CD, pueden modificarse químicamente a través de los grupos hidroxilo en las posiciones C-2, C-3 y C-6 (Fig. 2.30) [Crini, 2014]. La diferencia de reactividad entre los hidroxilos primarios y secundarios es relativamente pequeña (con las funciones primarias ligeramente más reactivas), por lo que la sustitución selectiva no es sencilla. Los derivados disponibles comercialmente, son de hecho mezclas de sustancias. El sistema se puede complicar si el radical insertado tiene su propia función reactiva. Debido a



la alta reactividad de los hidroxilos, varias reacciones se han estudiado: alquilación, hidroxialquilación, adición de sulfatos, acetilación, aminación, esterificación, eterificación etc.

Las tres CDs nativas tienen 18 (α -CD), 21 (β -CD) y 24 (γ -CD) grupos hidroxilo que podrían ser sustituibles, el posible número de derivados es prácticamente ilimitado. La mayoría de estos derivados nunca encontrarán aplicaciones, especialmente por razones de costos de producción, síntesis larga y difícil, a excepción de la hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) y la sulfobutiléter- β -ciclodextrina (SBE- β -CD) [Crini, 2014]. Estos dos últimos derivados de CDs, abrieron la posibilidad de nuevas aplicaciones, particularmente en la formulación de fármacos y en la producción de separadores quirales (electroforesis capilar). Actualmente, estos derivados sirven como excipientes solubilizadores en productos medicinales [Crini, 2014]. El incremento de solubilidad, puede mejorar la estabilidad, biodisponibilidad y propiedades farmacocinéticas, por lo tanto incrementar la eficiencia del fármaco [Crini, 2014].

El área de modificación química y enzimática de las CD es intensiva. Los derivados se pueden clasificar según su propósito: transportadores (solubilizadores, estabilizadores) para sustancias biológicamente activas; enzimas modelo; agentes separadores (para cromatografía o procesos por lotes); además de catalisis y aditivos (como detergentes, modificadores de la viscosidad, etc.) [Szejtli, 1998].

2.11.4. Usos.

Las CDs son moléculas altamente versátiles, que se prestan a ser modificadas y usadas tanto en forma disuelta como sólida. Esto significa, que las diferentes formas físicas o químicas que pueden tomar se pueden incluir en partículas (agregados, microsferas), polímeros solubles e insolubles, polímeros con CDs injertadas, geles e hidrogeles, materiales basados en CD (sílica modificada o resinas orgánicas, etc.) o membranas, superestructuras moleculares (polirotaxanos, etc.), o nanopartículas. Estas formas solubles e insolubles, son muy útiles cuando se consideran aplicaciones farmacéuticas o biomédicas [Crini, 2014]. Las diversas aplicaciones, se deben principalmente a las posibles consecuencias de la encapsulación de los huéspedes dentro de las CDs. Se pueden asumir 5 puntos: (i) la modificación de



propiedades fisicoquímicas de los huéspedes; aumento de solubilidad en sustancias poco solubles; eliminación de sabores, alteración de colores de ciertas sustancias que puede cambiar las propiedades espectrales, etc.; (ii) la modificación de la actividad química del huésped; (iii) estabilización de sustancias sensibles a la luz y el oxígeno; (iv) la absorción de sustancias volátiles, almacenamiento y manejo de ciertas sustancias tóxicas, ahorro de sustancias requeridas debido a evaporación reducida, etc.; y (v) la complejación, extracción y transporte de contaminantes [Crini, 2014].

Las tres principales CDs u oligosacáridos cíclicos menores o nativos, α -, β - y γ -CD, son las que se producen en mayor cantidad a nivel industrial [Szejtli, 1998; Crini, 2014]. Tienen diversas aplicaciones en la industria farmacéutica (antiinflamatorios, antibióticos, antifúngicos y en vasodilatadores, para la producción del complejo de Piroxicam/ β -CD, conocido como Brexin, el cual es comercializado en muchos países en el mundo, es necesario de 40-50 toneladas/año de β -CD [Szejtli, 1998]), alimentaria; (se usan muchas toneladas de β -CD para la producción de la mantequilla baja en colesterol, donde la β -CD se usa para remover específicamente el colesterol de la grasa de la leche [Szejtli, 1998]), cosmética y artículos de tocador (como en reductores de irritación ocular de champús, para estabilizar los sabores y el color de la pasta dental, para proteger cremas contra fotodegradación, para atrapar olores, o para incrementar la duración de los perfumes, en estos días es el mercado más grande para las CDs) [Kurkov, 2013; Crini, 2014], catálisis, agricultura, textil (en fragancias de tejidos para su uso sólo en lavanderías donde la cantidad necesaria de β -CD es de cientos de toneladas [Szejtli, 1998], análisis químicos, biotecnología (antídoto o anestésico a base de γ -CD modificada, que forman complejos inactivos en el plasma y eliminados en la orina), química supramolecular, química computacional y se espera que se comiencen a utilizar en protección ambiental [Szejtli, 1998; Crini, 2014]. La investigación sobre las CD es muy activa en campos como la formulación de detergentes, pegamentos y adhesivos, el sector de los plásticos y en la industria de fibras y papel además de la arquitectura supramolecular, Química “Clic” [Crini, 2014].

El uso analítico de la β -CD, se da principalmente en cromatografía de gases (CG), cromatografía líquida de alta resolución (CLAR o HPLC por sus siglas en inglés), en electroforesis capilar de zona (ECZ), cromatografía de capa fina (CCF), para la mejora de la



absorción UV-vis, luminiscencia/fosforescencia por CDs y para incrementar la sensibilidad de los métodos analíticos relacionados [Szejtli, 1998].

2.11.5. Farmacología.

Un aspecto importante, que recae en la naturaleza de sacárido de las CD, es su toxicidad nula hacia humanos. Aunque no todas las CDs, o derivados de CDs, pueden ser administradas a humanos, parcialmente debido a aquellas CDs que tienen afinidad hacia los componentes lipídicos de las membranas celulares del organismo, que dependiendo de las concentraciones, puede resultar en hemólisis [Szejtli, 1998]. A pesar de esto, las CD son atractivas por su versatilidad, siendo adecuadas para administración oral, parenteral, rectal, cutánea o sublingual [Crini, 2014].

La digestión de dextrinas lineales, así como del almidón, después de administración oral se da por una serie de hidrólisis enzimáticas produciendo glucosa. La enzima α -amilasa de la saliva hidroliza rápidamente a las dextrinas (productos de degradación del almidón), pero administradas oralmente, las dextrinas pasan inmediatamente al estómago donde la enzima se inactiva. Algunas hidrólisis ácidas específicas, no enzimáticas, de las dextrinas, se llevan a cabo en el estómago, pero la formación de complejos de lípidos con alimentos, puede retardar la hidrólisis. Después del estómago, las dextrinas siguen a un ambiente neutral en el intestino delgado, donde se libera fluido pancreático que contiene α -amilasa, continuando así, la hidrólisis de la dextrina. El sustrato de dextrina no digerido por la α -amilasa, sufre digestión bacteriana en las secciones más bajas del sistema digestivo. Las dextrinas lineales y otros polímeros solubles en agua, se usan comúnmente en soluciones parenterales [Kurkov, 2013]. Todas las CD naturales son susceptibles a digestión bacteriana. Después de administración oral, la γ -CD se digiere casi completamente en el tracto GI, mientras que la α -CD y β -CD, son predominantemente digeridas por las bacterias en el colon. La α -CD se digiere más lentamente que la β -CD [Kurkov, 2013]. Cualquier residuo o remanente de CD se elimina por otras rutas, como metabolismo del hígado ó excreción biliar vía tracto GI.

La farmacocinética de las tres CDs son muy similares entre sí y entre las dextrinas lineales de pesos moleculares comparables. El intervalo de $t_{1/2}$ de la fase de eliminación es de aproximadamente 1.4 a 2 h, y el V_D (volumen de distribución) es de aproximadamente 0.2



L/Kg para las tres CDs nativas. Los estudios farmacocinéticos muestran que alrededor del 90% de CD administrada parenteralmente, se eliminan del cuerpo dentro de 6 h, el 99.9% dentro de las 24 h por vía orina por filtración glomerular. Por lo tanto, no se verá CD acumulada en individuos con función normal del riñón, inclusive a altas dosis. En los pacientes con insuficiencia renal severa, se observará acumulación de CD [Kurkov, 2013].

Las CDs y derivados de CDs que se encuentran en más de 35 productos farmacéuticos comercializados, son en general oligosacáridos hidrofílicos con peso molecular entre 973 y 2163 Da. con muy bajos coeficientes de partición octanol-agua ($\log K_{O/W}$ aproximadamente de -8 y -12) y numerosos puentes de hidrógeno donadores y aceptores, todas las anteriores, son características de moléculas que no son fácilmente permeables en membranas por la vía de difusión pasiva [Kurkov, 2013]. No hay reportes, hasta 2013, de permeación mediada por transportador de CD a través de membranas biológicas, y en general, la biodisponibilidad de la CD es más bien baja, del orden del 4%. Solo algunas CD metiladas aleatoriamente, tienen gran biodisponibilidad oral (hasta 12%) en ratas. La administración parenteral de la α -CD, β -CD ó β -CDs metiladas pueden resultar en toxicidad renal [Kurkov, 2013]. En los Estados Unidos, la α -, β - y γ -CD han sido Reconocidas Generalmente Como Seguras (*Generally Recognized As Safe*, GRAS por su siglas en inglés) por la Administración de Fármacos y Alimentos (*Food and Drug Administration*, FDA por su siglas en inglés) [Kurkov, 2013].

En resumen, las CD son una herramienta importante en formulación farmacéutica, lo que se ha observado en los más de 40 productos que se encuentran en el mercado. La principales ventajas que tienen las CDs, frente a fármacos poco solubles en agua, es el aumento de solubilidad aparente, velocidad de disolución y estabilidad química. Presentando un metabolismo y farmacocinética muy parecido a sus contrapartes lineales [Kurkov, 2013].



3. Hipótesis y Objetivos.



3.1. Hipótesis.

Será posible entender el perfil termodinámico de la formación de los complejos de inclusión entre indometacina, y sus complejos metálicos (de Cu(II) y Zn(II)), con ciclodextrinas. A través, de su estudio por diversas técnicas, para la identificación de las especies de los complejos metálicos existentes en solución acuosa que permita, en un futuro, entender su química en agua, entender su rol biológico, así como desarrollar formulaciones más efectivas y menos tóxicas, de las que existen actualmente.

3.2. Objetivo General.

Estudiar la indometacina (IMC), y sus complejos de Cu(II) y Zn(II) (MIMC), para su inclusión en ciclodextrinas; con el fin de facilitar su estudio en medio acuoso, obtener los perfiles termodinámicos de las inclusiones, incrementar la solubilidad de los complejos insolubles y la identificación de las especies solubles resultantes, en solución acuosa.

Objetivos particulares.

- Sintetizar y caracterizar la sal de IMC, así como los complejos $\text{CuIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ y $\text{ZnIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2$
- Determinar la estabilidad de IMC a pH 5 y 7.
- Calcular el valor de pK_a de la IMC.
- Determinar las propiedades termodinámicas de inclusión por espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis) y calorimetría de titulación isotérmica (ITC) de los complejos IMC con CDs, siendo CD: α -, β -, γ -, HP- β - y HP- γ -CD a pH de 5 y 7 a 25°C.
- Determinar las propiedades termodinámicas por calorimetría de titulación isotérmica de los complejos de inclusión IMC con CD, siendo CD: α -, β -, γ -, HP- β - y HP- γ -CD a diferente temperatura (20, 25, 30 y 35 °C) a pH de 7.
- Determinar la capacidad calorífica (ΔC_p) de la formación de los complejos IMC con CDs.
- Entender por medio del análisis entálpico-entrópico las interacciones de la formación de los complejos IMC con CDs.



-
-
- Aumentar la solubilidad de los complejos $\text{Cu}(\text{IMC})_2(\text{H}_2\text{O})_2$ y $\text{Zn}(\text{IMC})_2(\text{H}_2\text{O})_2$ con ciclodextrinas en agua.
 - Determinar las propiedades termodinámicas, por calorimetría de titulación isotérmica (ITC), de los complejos $\text{Cu}(\text{IMC})_2(\text{H}_2\text{O})_2$ y $\text{Zn}(\text{IMC})_2(\text{H}_2\text{O})_2$ con ciclodextrinas en agua.
 - Establecer el modelo de inclusión $\text{Cu}(\text{IMC})_2(\text{H}_2\text{O})_2$ y $\text{Zn}(\text{IMC})_2(\text{H}_2\text{O})_2$ con ciclodextrinas.
 - Caracterizar los complejos de inclusión, presentes en solución, de los complejos $\text{Cu}(\text{IMC})_2(\text{H}_2\text{O})_2$ con ciclodextrinas en agua.



4. Equipos, Reactivos y Metodologías.



4.1. *Materiales y Equipos.*

Parrilla de agitación StableTemp. Cole-Parmer.

Balanza Analítica. Pioneer Ohaus ± 0.0002 g.

Electrodo de pH. Sension 5014T. HACH.

Material de vidrio: vasos de precipitados desde 5-250 mL, matraces aforados de 5-250 mL Pyrex, embudos.

Micropipetas Finpippete de 1-10 μ L, 10-100 μ L, 100-1000 μ L y de 500-5000 μ L, con errores de volúmenes no mayores al 3.5%.

Espectrofotómetro de UV-Vis. Lambda 35. Perkin Elmer. ± 0.003 en valor de absorbancia.

Calorímetro para Titulación Isotérmica. VP-ITC. General Electric. < 0.005 μ cal/s

Espectrofotómetro de Infrarojo (IR). Frontier FT-IR. Perkin Elmer.

Espectrómetro de Resonancia Paramagnética Nuclear (EPR, por sus siglas en inglés) JES-TE300, Jeol.

Difractómetro de rayos-X de polvos D5000, Siemens.

Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), AVANCE DMX500, Bruker.

4.2. *Reactivos y Soluciones.*

Hidróxido de Sodio (perlas) $\geq 98.6\%$ PM 40.4 g/mol. Mallinckrodt AR.

Fosfato de sodio dibásico $\geq 99.7\%$ PM 141.96 g/mol. Fermont.

ZnCl₂ (granular USP) 99% J.T. Baker.

CuCl₂·2H₂O 99% J.T. Baker.

Alcohol etílico absoluto 99.1% J.T. Baker.

Metanol anhidro 99.99% Merck.

Indometacina (HIMC) ≥ 0.99 (TLC) PM 357.79 g/mol. Sigma-Aldrich.

α -CD $\geq 98\%$ (HPLC) PM 972.86. Fluka.

β -CD $\geq 97\%$ PM 1134.98 g/mol. Sigma-Aldrich.

γ -CD PM 1297.1 g/mol. Sigma-Aldrich.

2-HP- β -CD MS 0.6 PM 1541.54 g/mol. Sigma-Aldrich.



2-HP- γ -CD MS 0.6 PM 1761.8 g/mol. Sigma-Aldrich.

Agua Desionizada 18 M Ω .

Soluciones.

NaOH 0.1 M.

Se pesan 0.04 g de NaOH, se disuelve con agua desionizada y se lleva a un aforo a 10 mL con agua desionizada.

Soluciones amortiguadoras de fosfatos 0.1 M.

Se pesan 3.56 g de fosfato de sodio dibásico, se disuelve en agua desionizada, se ajusta el pH (4.5, 5, 7 y 11) con HCl concentrado (debido a que no se utilizó su par conjugado ácido fosfórico) o hidróxido de sodio, según sea el caso y se lleva a un aforo de 250 mL con agua desionizada.

Solución de IMC 5.5×10^{-4} M.

Se pesan 0.010 g de HIMC en un vaso de precipitados y se adicionan 600 μ L de solución de NaOH 0.1 M (1.2×10^{-3} M en 50 mL, cantidad suficiente de NaOH para lograr desprotonar de inmediato a la HIMC por una relación estequiométrica mayor que la HIMC, y se solubilice), se agita hasta tener una solución homogénea. Se adiciona, lo más rápido posible, solución amortiguadora de fosfatos al pH deseado, hasta el aforo de 50 mL.

Solución de IMC 5.5×10^{-5} M.

De la solución de IMC 5.5×10^{-4} M se toman 1 mL y se aforan con buffer deseado a 10 mL. Esta solución fue utilizada para los estudios de estabilidad y los estudios de interacción IMC con CDs por UV-Vis. Una solución de 5.5×10^{-5} M de IMC, se eligió por tener absorbancias cercanas a 1 y los cambios de las absorbancias se observen con claridad.

Solución de NaIMC 5.5×10^{-4} M.

Se pesan 0.012 g de NaIMC en un vaso de precipitados, se disuelve y se lleva al aforo de 50 mL con solución amortiguadora de fosfatos 0.1M a pH 7.

Solución de CDs 1.7×10^{-2} M.

Para el estudio de la interacción IMC con CDs por UV-Vis. Se pesa la cantidad necesaria de la CD deseada, se adicionan 30 μ L de solución de NaOH 0.1 M y se disuelve con solución amortiguadora de fosfatos al pH deseado hasta el aforo de 25 mL. La adición de NaOH, es para tener lo más parecido el ambiente de la solución de CD al de la solución de IMC con la que se estudiará la interacción IMC con CDs por UV-Vis.

Para el estudio de la interacción IMC con CDs por calorimetría de titulación isotérmica (ITC). Se pesa la cantidad necesaria de CD deseada, se adicionan 300 μ L de solución de NaOH 0.1



M y se disuelve con solución amortiguadora de fosfatos a pH 7 hasta el aforo de 25 mL. La adición de NaOH, es para tener una solución de CD parecida a la solución de IMC con la que se estudiará la interacción IMC con CDs por ITC.

Para la determinación de ΔC_p y equilibrio entálpico-entrópico. Se pesa la cantidad necesaria de la CD deseada (no se adiciona NaOH 0.1 M) y se disuelve con solución amortiguadora de fosfatos a pH 7 hasta el aforo de 25 mL.

4.3. Metodologías.

4.3.1. Síntesis y caracterización de reactivos utilizados.

Síntesis y caracterización de NaIMC.

Para la síntesis de la sal de IMC trihidratada ($\text{NaIMC}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ó NaIMC) se realiza lo siguiente. Se pesa la cantidad de 3.04 g de HIMC (0.008 moles), se disuelve en 50 ml de metanol calentando hasta 50°C. Una vez a esta temperatura, se adicionan 8.6 mL de H_2O desionizada con 0.7002 g de NaHCO_3 (0.008 moles) disueltos. Se deja en reflujo por 2h. El metanol es evaporado a presión reducida, y un precipitado amarillo pardoso en forma de hojuelas comienza a aparecer. El precipitado es lavado con dietil éter. El precipitado obtenido, fue analizado por potenciometria para cuantificar el contenido de NaIMC, usando ácido clorhídrico 0.1 M estandarizado de acuerdo a Kulkarni, 2011.

El precipitado obtenido es caracterizado por Infrarojo (IR, obteniendo un espectro en un intervalo de $4000\text{-}400\text{cm}^{-1}$), Rayos X de polvos (XRPD, los difractogramas fueron obtenidos a 35 kV y 20 mA, con longitud de onda de 1.544 \AA las muestras fueron escaneadas desde 4° hasta 50° para 2θ a temperatura ambiente)) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en agua deuterada con TSP como referencia.

Síntesis y caracterización de complejos MIMC.

Los complejos en sólido $\text{CuIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ y $\text{ZnIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2$, fueron sintetizados de acuerdo a Weder, 1999. Con la diferencia del uso de NaIMC, evitando el uso de NaOH para disolver a la HIMC, además de que sólo se utilizó agua para sintetizar estos complejos.

$\text{CuIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2$: Se pesa la cantidad correspondiente a 0.04 mol de NaIMC y se disuelve en agua y se calienta hasta 50°C. Una vez a esta temperatura, se adiciona un volumen de CuCl_2 (0.02 mol) disuelto en agua. Al momento de adicionar, un precipitado verde oscuro comienza a aparecer. La mezcla se filtra y el polvo verde se lava exhaustivamente con agua y etanol.

$\text{ZnIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2$: Se pesa la cantidad correspondiente a 0.04 mol de NaIMC y se disuelve en agua y se calienta hasta 50°C. Una vez a esta temperatura se adiciona un volumen de ZnCl_2 (0.02 mol) disuelto en agua. Al momento de adicionar, un precipitado blanco comienza a aparecer. La mezcla se filtra y el polvo blanco se lava exhaustivamente con agua y etanol.



Los precipitados obtenidos se caracterizaron por IR (obteniendo un espectro en un intervalo de $4000-400\text{cm}^{-1}$), XRPD (los difractogramas de XRPD fueron obtenidos a 35 kV y 20 mA, con longitud de onda de 1.544 \AA las muestras fueron escaneadas desde 4° hasta 50° para 2θ a temperatura ambiente) y Resonancia Paramagnética Nuclear (EPR, por sus siglas en inglés. Las medidas de EPR fueron realizadas en un tubo de cuarzo a temperatura de 25°C con un espectrómetro JEOL JES-TE300 operando en banda X con una frecuencia de 100KHz de modulación de campo (cerca de 9.4 GHz), con una cavidad cilíndrica (modo TE011). La medición externa del campo magnético externo se realizó con un gaussmetro JEOL ES-FC5).

4.3.2. Estudios de estabilidad de IMC a pH 5 y 7.

El estudio contemplaba estudiar la estabilidad a pH ácido, neutro y básico, sin embargo, a pH por debajo de 4.5, a la concentración elegida, la IMC precipita. Por lo que se determina su estabilidad a lo más ácido posible en solución. Por lo anterior, se sigue la siguiente metodología

Se preparan 10 mL de una solución de $5.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ de IMC a pH 4.5, se toman 3 muestras de máximo 3 mL, para realizar el estudio por triplicado. Se realizan mediciones a las 0, 2, 4, 6, 24 y 168 h por UV-Vis (ANEXO A1).

Se preparan 10 mL de una solución de $5.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ de IMC a pH 7, se toman 3 muestras de máximo 3 mL, para realizar el estudio por triplicado. Se realizan mediciones a las 0, 2, 4, 6, 24 y 168 h por UV-Vis.

Se preparan 10mL de una solución de $5.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ de IMC a pH 11, se toman 3 muestras de máximo 3 mL, para realizar el estudio por triplicado. Se realizan mediciones a las 0, 2, 4, 6, 24 y 168 h por UV-Vis.

Se grafican los máximos del espectro de IMC en función del tiempo.

4.3.3. Determinación del pK_a de la IMC por UV-Vis.

Se pesan 0.01 g de HIMC en un vaso de precipitados y se adicionan 600 μL de solución de NaOH 0.1 M, (cantidad suficiente para disolver de inmediato a la HIMC), se agita hasta tener una solución homogénea, se adiciona inmediatamente agua desionizada y se afora a 50 mL. De esta solución se toma 1 mL y se lleva a un aforo de 10 mL con agua desionizada para tener una concentración aproximada de IMC $5.5 \times 10^{-5} \text{ M}$, conservando un pH cercano a 10.

A esta misma alícuota, con una micropipeta, se comienzan a adicionar volúmenes de 50 μL de HCl de concentración $1 \times 10^{-3} \text{ M}$, midiendo en cada adición el pH y el espectro de UV-Vis, correspondiente.

Los espectros obtenidos se analizan por SQUAD [Leggett, 1985] (ANEXO A5) para refinar el valor de pK_a .



El valor de pK_a obtenido se utiliza para alimentar MEDUSA (ANEXO A5) y obtener el diagrama de distribución de especies.

4.3.4. Determinación de los parámetros termodinámicos de la interacción IMC con CDs por ultravioleta visible (UV-Vis) y calorimetría de titulación isotérmica (ITC).

Metodologías para el estudio de la interacción IMC con CDs.

Gaussian 16.

Se utilizó gaussian 16 para calcular las medidas de enlace y separación de los átomos de la IMC.

Determinación de las constantes de inclusión IMC con CDs por UV-Vis a pH 5 y 7.

Se toma una alícuota de 5 mL de solución de 5.5×10^{-5} M de IMC (IMC disuelta con NaOH 0.1 M en buffer fosfatos 0.1 M pH 5 ó 7), se toma el espectro inicial y posteriormente, se van adicionando volúmenes de solución de 1.7×10^{-2} M de CD (con NaOH 0.1 M en buffer de fosfatos 0.1 M pH 5 ó 7), para llevar a cabo el método de relaciones molares (CD/IMC) (ANEXO A6). Las relaciones molares se llevan desde la 0 hasta la 200, aproximadamente (debido a que se está estudiando un equilibrio con un $\log\beta$ ó $\log K_{1:1}$ menor de 3, ANEXO, A6. y A7). En cada adición de CD, se toma el espectro UV-Vis. Los espectros obtenidos se analizaron (usando los espectros de las relación molar 0-30) con el programa SQUAD [Leggett, 1985] ajustando a un modelo de estequiometría 1:1.

Esta metodología se realiza para cada CD .

Determinación de las propiedades termodinámicas de la inclusión IMC con CDs por Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC) a pH 7.

Para el funcionamiento de la Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC) se recomienda ver el ANEXO A3.

Experimento de Titulación. De la solución de IMC 5.5×10^{-4} M (IMC disuelta con NaOH 0.1 M en buffer fosfatos 0.1 M pH 7) se vierten 1.4 mL en la celda de reacción. La solución de CD 1.7×10^{-2} M (con NaOH 0.1 M en buffer de fosfatos 0.1 M pH 7) se coloca en la jeringa de aproximadamente 280 μ L. El experimento de titulación se realiza programando 70 adiciones de la solución de CD a 25 °C. Se hacen adiciones de 4 μ L por 8 s con un tiempo de equilibrio entre adición de 450 s, con velocidad de agitación de 305 rpm. A lo largo del experimento, el equipo de ITC mide la potencia necesaria en todo momento, para mantener la celda de reacción a temperatura constante. La celda de referencia se llena sólo con agua desionizada.

Experimento de Dilución. El experimento de dilución es idéntico al experimento de titulación, pero sin tener uno de los analitos a interaccionar en la celda de reacción. Por lo



tanto, para tener la misma solución que en el experimento de titulación sin IMC, se prepara la siguiente solución. Se toman 30 μL de la solución de NaOH 0.1 M y se llevan a un aforo de 25 mL con el buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7. De esta solución se vierten 1.4 mL en la celda de reacción. La solución de CD 1.7×10^{-2} M (con NaOH 0.1 M en el mismo buffer de fosfatos 0.1 M pH 7 que la solución de la celda de reacción) se coloca en la jeringa de aproximadamente 280 μL . El experimento de dilución se realiza programando 70 adiciones de la solución de CD a 25 °C. Se hacen adiciones de 4 μL por 8 s, con un tiempo de equilibrio entre adición de 450 s, con velocidad de agitación de 305 rpm. A lo largo del experimento, el equipo de ITC mide la potencia necesaria en todo momento, para mantener la celda de reacción a temperatura constante. La celda de referencia se llena sólo con agua desionizada.

La potencia obtenida en función del tiempo, se integra, para obtener un gráfico del calor por inyección en función de la relación molar CD/IMC. La respuesta de dilución debe restarse de la respuesta de titulación, para descartar el efecto provocado por la dilución de la CD en la solución de IMC. Manteniendo sólo el efecto provocado por la interacción IMCCD. La respuesta de titulación (ahora sin el efecto de dilución) se ajusta a un modelo 1:1 para la determinación de los parámetros termodinámicos, esto se realiza con la ayuda del programa Affinimeter (Ver ANEXO A5).

Los experimentos de titulación y dilución se repiten cambiando la solución de CD, por la CD respectiva.

*4.3.5. Determinación de las propiedades termodinámicas de la inclusión IMC con CDs por Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC) a pH 7, a diferente temperatura.
Determinación de ΔC_p . Estudio de la compensación entálpica-entrópica.*

Metodología por ITC.

Experimento de Titulación. De la solución de NaIMC 5.5×10^{-4} M, en buffer de fosfatos 0.1 M pH 7, se vierten 1.4 mL en la celda de reacción. La solución de CD 1.7×10^{-2} M en buffer pH 7 se coloca en la jeringa de aproximadamente 280 μL . El experimento de titulación se realiza programando 35 adiciones de la solución de CD a la temperatura indicada. Se hacen adiciones de 8 μL por 16 s con un tiempo de equilibrio entre adición de 360 s, con velocidad de agitación de 351 rpm. A lo largo del experimento, el equipo de ITC mide la potencia necesaria en todo momento, para mantener la celda de reacción a temperatura constante. La celda de referencia se llena sólo de agua desionizada.

Experimento de Dilución. El experimento de dilución es idéntico al experimento de titulación, pero sin tener uno de los analitos a interaccionar en la celda de reacción. Por lo que, de una solución de buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7 se vierten 1.4 mL en la celda de reacción. La solución de CD 1.7×10^{-2} M se coloca en la jeringa de aproximadamente 280 μL . El experimento de dilución se realiza programando 35 adiciones de la solución de CD a la temperatura indicada. Se hacen adiciones de 8 μL por 16 s, con un tiempo de equilibrio



entre adición de 360 s, con velocidad de agitación de 351 rpm. A lo largo del experimento, el equipo de ITC mide la potencia necesaria en todo momento para mantener las celdas a temperatura constante. La celda de referencia se llena sólo de agua desionizada.

La potencia obtenida en función del tiempo, se integra, para obtener un gráfico del calor por inyección en función de la relación molar CD/IMC. La respuesta de dilución debe restarse de la respuesta de titulación, para descartar el efecto provocado por la dilución de la CD en la solución de IMC. Manteniendo sólo el efecto provocado por la interacción IMCCD. La respuesta de titulación (ahora sin el efecto de dilución) se ajusta a un modelo 1:1 para la determinación de los parámetros termodinámicos, esto se realiza con la ayuda del programa Affinimeter (Ver ANEXO A5).

Los experimentos de titulación y dilución se repiten a 20, 25, 30 y 35 °C.

Esta metodología se realiza para cada CD.

Una vez que se obtienen los valores termodinámicos se estudia la relación de ΔH con la temperatura y la relación de ΔH con $-T\Delta S$.

4.3.6. Estudios de la interacción de los complejos $M(IMC)_2(H_2O)_2$ en presencia de CDs.

Diagramas de solubilidad de fase de los complejos $M(IMC)_2$ en presencia de CDs.

Se prepara un conjunto de soluciones acuosas, que contienen una misma cantidad insoluble de muestra de complejo $M(IMC)_2(H_2O)_2$ (M: Cu(II) ó Zn(II)), a pH = 6-7, en los cuales se les adiciona diferente cantidad de CD (0-0.08 M). Estas soluciones se dejan en agitación por 3 días, para lograr que el equilibrio de inclusión se establezca. Después de éste tiempo, las muestras se filtran, y al filtrado obtenido se le cuantifica la cantidad de Cu(II) por una metodología, seguida por espectrofotometría UV-Vis, de EDTA en buffer NH_3/NH_4^+ 1.0 M (pH = 8.5, estas condiciones se eligen para aumentar la cuantitatividad de la reacción entre Cu(II) y EDTA, y todo el Cu(II) presente en solución se forme como complejo, (Yessica, 2011)) y el contenido de Zn(II) por una metodología, seguida por espectrofotometría UV-Vis, de PAR en buffer de fosfatos 0.1 M (pH = 7) que se ha demostrado ser efectiva para cuantificar al Zn (II) (Aguirre, 2016), respectivamente.

El contenido de ion metálico cuantificado e incluido en la CD, se relaciona con la cantidad de $M(IMC)_2$ soluble. Los diagramas de solubilidad de fase se construyen relacionando la cantidad de $M(IMC)_2$ que se logró disolver en función de la CD adicionada.

Estudios de EPR de los complejos solubles de $Cu(IMC)_2$ con CDs.

Un conjunto de viales, que contienen muestra de $Cu(IMC)_2(H_2O)_2$ insoluble en agua (pH=6-7) con CD ($-\log[\beta\text{-CD}] = 1.77$, para las demás CD $-\log[CD] = 1.10$), se mantuvieron en agitación por 3 días, para lograr que el equilibrio de inclusión se establezca. Después de este



tiempo, las muestras fueron filtradas y el filtrado obtenido se utilizó para realizar mediciones por la técnica de EPR.

El espectrofotómetro EPR fue operado en la banda X, a una modulación de frecuencia de 100 kHz, con una cavidad cilíndrica (modo TE011). Las muestras fueron colocadas en una celda de cuarzo (cuarzo sintético, Wilmad Glass Company) con un paso de 0.2 mm. La calibración externa del campo magnético se realizó usando un gaussmetro JEOL ES-FC5. Las mediciones fueron realizadas a una temperatura de 77 K.

Estudio por calorimetría de titulación Isotérmica (ITC) de la interacción M(IMC)₂ con CDs.

Una muestra sobresaturada en agua de complejo de Cu(IMC)₂(H₂O)₂ ó Zn(IMC)₂(H₂O)₂ insoluble, se deja en agitación por 3 días. Después de este tiempo, la muestra se filtra, un parte se utiliza para los experimentos de ITC y otra parte se usó para cuantificar la cantidad de Cu(II) por una metodología, seguida por espectrofotometría UV-Vis, de EDTA en buffer NH₃/NH₄⁺ 1.0 M (pH = 8.5, estas condiciones se eligen para aumentar la cuantitatividad de la reacción entre Cu(II) y EDTA, y todo el Cu(II) presente en solución se forme como complejo, (Yessica, 2011)) y el contenido de Zn(II) por una metodología, seguida por espectrofotometría UV-Vis, de PAR en buffer de fosfatos 0.1 M (pH = 7) que se ha demostrado ser efectiva para cuantificar al Zn (II) (Aguirre, 2016), respectivamente. La cantidad de metal cuantificado se relaciona con la cantidad de complejo en solución M(IMC)₂.

Experimento de Titulación. De la parte de la solución acuosa filtrada, con M(IMC)₂ soluble, ya sea Cu(IMC)₂ (concentración promedio 2.28×10^{-5} M) ó Zn(IMC)₂ (concentración promedio 4.25×10^{-5} M), se vierten 1.4 mL en la celda de reacción. Se coloca una solución de CD 1.7×10^{-2} M disuelta en agua desionizada en la jeringa de aproximadamente 280 µL. El experimento de titulación se realiza programando 28 adiciones de la solución de CD a 25 °C. Se hacen adiciones de 10 µL por 20 s con un tiempo de equilibrio entre adición de 360 s, con velocidad de agitación de 351 rpm. A lo largo del experimento, el equipo de ITC mide la potencia necesaria en todo momento para mantener la celda de reacción a temperatura constante (ANEXO A3). La celda de referencia se llena sólo de agua desionizada.

Experimento de Dilución. El experimento de dilución es idéntico al experimento de titulación, pero sin tener uno de los analitos a reaccionar en la celda de reacción. Por lo que, se vierten 1.4 mL de agua desionizada en la celda de reacción. La solución de CD 1.7×10^{-2} M se coloca en la jeringa de aproximadamente 280 µL. El experimento de dilución se realiza programando 28 adiciones de la solución de CD a 25 °C. Se hacen adiciones de 10 µL por 20 s, con un tiempo de equilibrio entre adición de 360 s, con velocidad de agitación de 351 rpm. A lo largo del experimento, el equipo de ITC mide la potencia necesaria en todo



momento, para mantener las celdas a temperatura constante. La celda de referencia se llena con agua desionizada.

Los datos experimentales fueron ajustados a un modelo de sitios sucesivos independientes e iguales, usando el software Affinimeter [<https://www.affinimeter.com/site/>]. Con las constantes obtenidas del modelo propuesto se construyó un diagrama de distribución de especies usando MEDUSA [Puigdomenech, 2004].



5. Resultados y Discusión.



5.1. Síntesis y caracterización de NaIMC.

Después de seguir la metodología descrita para la obtención de la sal de indometacina trihidratada $\text{NaIMC}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (NaIMC) [Kulkarni, 2011] y obtener un precipitado en hojuelas amarillo pardoso, se prosiguió con su identificación por diferentes técnicas; infrarojo (IR) (ANEXO A1), rayos X de polvos (XRPD, por sus siglas en inglés), resonancia magnética nuclear (RMN) y por último titulación por potenciometría.

En la Fig. 5.1 se muestran los espectros de IR de la a) HIMC y b) NaIMC. Como se puede observar, la HIMC (reactivo de partida) muestra señales características a 1717 y 1692 cm^{-1} , siendo la primera absorción asignada a la vibración del dímero del ácido carboxílico, característico de la HIMC en su isoforma γ .

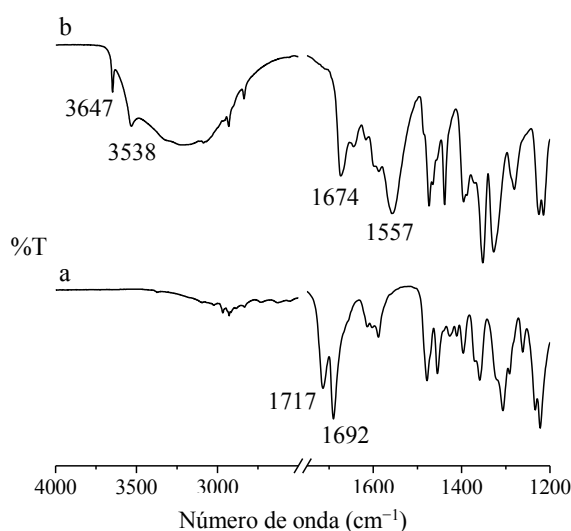


Fig. 5.1. Espectros de IR de la a)HIMC y de b) NaIMC.

La absorción a 1692 cm^{-1} se asigna a la banda de vibración del carbonilo de la amida (ν_{amida}). Las bandas que se observan en el gráfico de la NaIMC son: 1557 cm^{-1} , la cual se asigna a la señal del estiramiento asimétrico del carboxilato (ν_{asim}). Debido a un nuevo ambiente químico, la banda de absorción de la amida se desplaza hacia 1674 cm^{-1} . Otras bandas características se encuentran a 3647 y 3538 cm^{-1} , las cuales son típicas para un hidrato [Tong, 2001; Chen, X., 2005; Kulkarni, 2011]. Como se puede observar, los gráficos de IR cambiaron drásticamente desde la isoforma de la HIMC hacia señales características de un hidrato.



La Fig. 5.2 muestra el XRPD de NaIMC. Este difractograma fue comparado con los espectros de NaIMC·3H₂O de los trabajos realizados por Chen, 2005 y Dubbini, 2014, los cuales tienen mucha similitud con el obtenido en esta contribución.

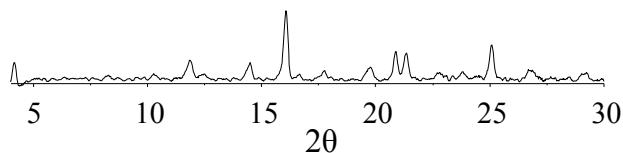


Fig. 5.2. XRPD de NaIMC.

Adicionalmente un análisis de ¹H RMN se realizó para confirmar la estructura de la NaIMC, éste espectro se muestra en la Fig. 5.3.

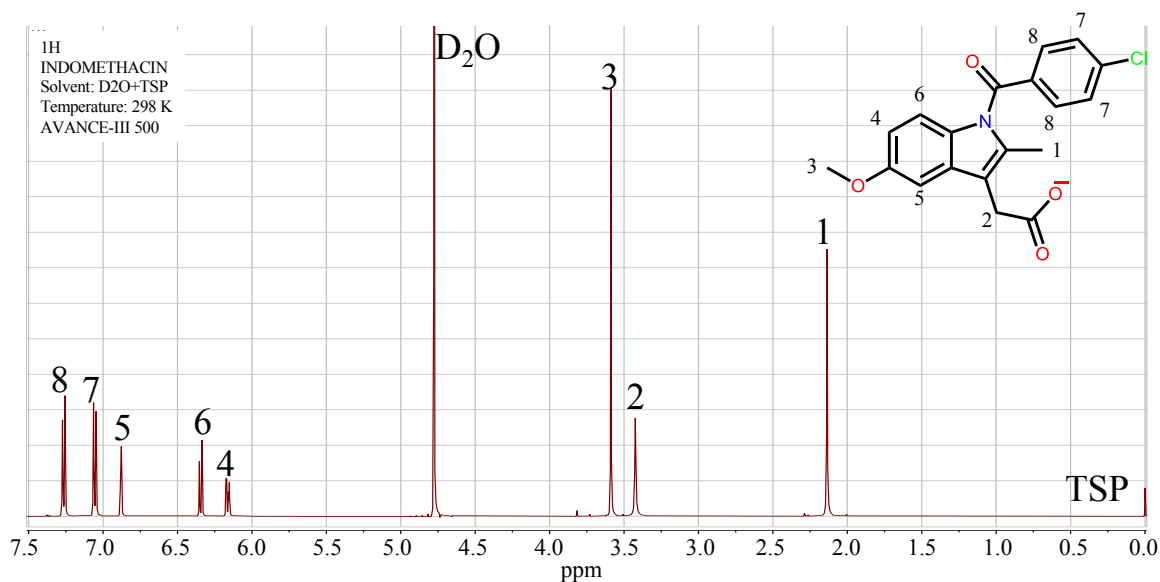


Fig. 5.3. Espectro de RMN de la NaIMC, en D₂O, usando TSP.

Como puede observarse, en el espectro de ¹H RMN de la Fig. 5.3, se caracterizan los desplazamientos químicos de los protones de la molécula de la NaIMC. Los desplazamientos obtenidos se asignan para cada protón de la molécula, por lo cual el protón numerado con el no. 1 presenta una señal singulete con desplazamiento de 2.14 ppm, que integra para 3H; el no. 2, presenta un singulete a 3.42 ppm que integra para 2H; el no. 3 presenta un singulete en 3.59 ppm que integra para 3H), el no. 4 presenta un doblete en 6.16 ppm con J = 9.0, 2.6 Hz,



que integra para 1H; para el no. 6, se tiene un doblete a 6.34 ppm con $J = 9.0$ que integra para 1H; el no. 5 presenta un singulete a 6.88 ppm con $J = 2.5$ Hz, que integra para 1H; el no.7 presenta un multiplete entre 7.09–7.03 ppm que integra para 2H; y finalmente el no. 8 que presenta un multiplete entre 7.29–7.23 ppm integra para 2H.

Para finalizar la caracterización, se realizó una titulación de una solución de NaIMC por potenciometría, usando HCl 0.09M (estandarizado). Al pesar 0.0405g de precipitado de NaIMC y disolverlo en 10 mL agua, y al realizar la titulación por triplicado (Fig. 5.4), se obtiene que el volumen de punto de equivalencia se alcanza a los 0.99 mL de HCl y neutralizando a la NaIMC después de éste punto. Lo anterior indicaría que la cantidad de NaIMC en molaridad en los 10 mL de solución es de 0.0091 M, y relacionando la concentración con la cantidad pesada inicialmente, se puede concluir que el peso molecular de la sal de IMC trihidratada es de 433.83 ± 0.63 g/mol con una pureza del $97.4 \pm 0.13\%$.

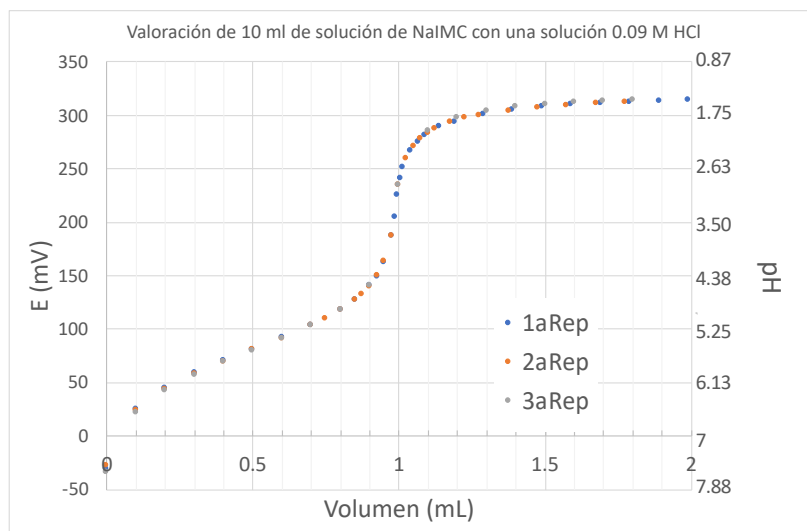


Fig. 5.4. Valoración de la sal de indometacina.

En conclusión, fue posible confirmar la identidad de la sal sódica trihidratada de IMC, con la evidencia espectroscópica, difractográfica y potenciométrica.

5.2. Síntesis y caracterización de los complejos MIMC.

Después de sintetizar los complejos $\text{CuIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ y $\text{ZnIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ de acuerdo a Weder de 1999, se prosiguió a identificarlos por IR, Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR, por sus siglas en inglés) en el caso del complejo con Cu(II) y XRPD en el caso de Zn(II).

La Fig. 5.5 muestra los espectros obtenidos por IR, en donde se muestra a los complejos de a) $\text{CuIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ y b) $\text{ZnIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2$; los cuales presentan señales características de la vibración del carboxilo de la amida en $\nu_{\text{amide}} = 1673$ y 1679 cm^{-1} , respectivamente. El espectro de c) NaIMC de la Fig. 5.5, presenta $\nu_{\text{amide}} = 1674 \text{ cm}^{-1}$ por lo que al comparar con los obtenidos con $\text{CuIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ y $\text{ZnIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ se puede inferir que el nitrógeno de la amida no participa en la esfera de coordinación del ion metálico. En contraste, las vibraciones asimétricas que corresponden al carboxilo de la IMC van desde $\nu_{\text{asym}} = 1557 \text{ cm}^{-1}$ en NaIMC a $\nu_{\text{asym}} = 1589 \text{ cm}^{-1}$ y 1567 cm^{-1} para $\text{CuIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ y b) $\text{ZnIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2$, respectivamente; haciendo evidente la complejación de M(II) por IMC [Dillon, 2004, Singla, 1995].

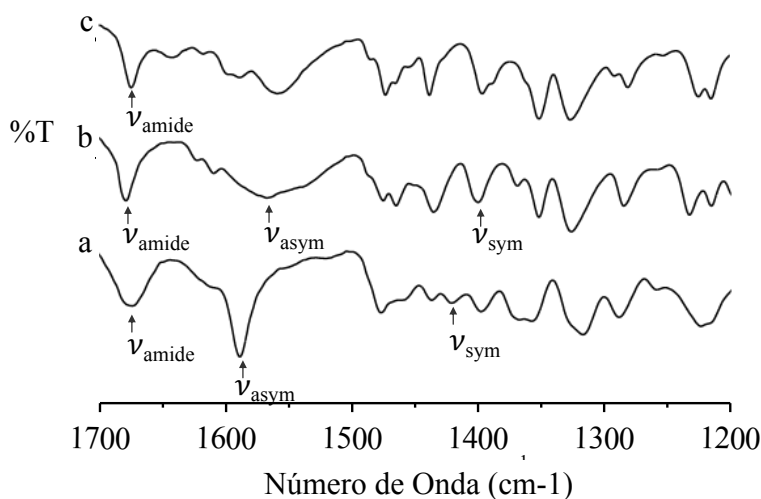


Fig. 5.5. Espectros IR de a) $\text{CuIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ b) $\text{ZnIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ y c) NaIMC,. Se señalan las vibraciones respectivas de los carboxilatos presentes. ν_{amide} es la vibración de la amida. ν_{asym} es la vibración asimétrica del carboxilo unido al metal y ν_{sym} es la vibración simétrica del carboxilo unido al metal.

Por otra parte, el estiramiento simétrico del carboxilo ν_{sym} a 1400 y 1440 cm^{-1} ha sido usado para diferenciar especies mononucleares de dinucleares de complejos metal-carboxilato [Zhou, 2000, 2003; Dillon, 2004]. La ausencia de la banda a 1400 cm^{-1} está asociada con las especies puente dinucleares [Zhou, 2000; Morgan, 2001]. En el caso de complejos sólidos

sintetizados en este trabajo, ν_{sym} se observa en 1420 y 1437 cm^{-1} para $\text{CuIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ y a 1400 y 1435 cm^{-1} para $\text{ZnIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2$. La separación (Δ) entre ν_{asym} y ν_{sym} es también indicativo de puente simétrico dinuclear cuando el valor de $\Delta > 200 \text{ cm}^{-1}$, mientras que un valor $\Delta < 200 \text{ cm}^{-1}$ es típico para especies monoméricas quelatadas [Zhou, 2000; Jabali, 2016; Jennieffer, 2013; Deacon, 1980]. En este trabajo Δ es 169 cm^{-1} y 167 cm^{-1} para $\text{CuIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ y $\text{ZnIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2$, respectivamente, sugiriendo que la geometría es de un quelato monomérico cuando los complejos se encuentran en sólido.

Para llevar a cabo un análisis comparativo, los espectros en sólido de EPR de a) dinuclear $\text{Cu}_2(\text{AcO})_4$ y $\text{CuIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ a 25°C, se muestran en la Fig. 5.6. El espectro de $\text{Cu}_2(\text{AcO})_4$ (Fig. 5.6a) tiene respuestas típicas para dos átomos de Cu(II), derivadas de un estado triplete ($S = 1$) [Dillon, 2004]. El espectro de $\text{CuIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ (Fig. 5.6b) tiene una respuesta para una especie mononuclear, con un momento magnético $S = 1/2$, a 330 mT con un valor de $g = 2.0786$ (ANEXO A4); no se observa acoplamiento debido a su forma sólida. Debido a señales características de una especie mononuclear por EPR y a la evidencia por IR, el complejo sólido $\text{CuIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ tiene la estequiometría esperada.

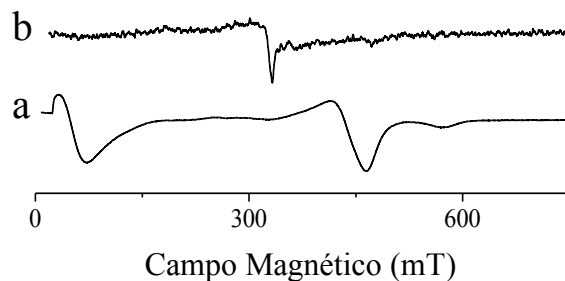


Fig. 5.6. Espectro de EPR de a) $\text{Cu}_2(\text{AcO})_4$ y b) $\text{Cu}_2\text{IMC}_4(\text{H}_2\text{O})_2$.

Además, se observa una señal débil a 470 mT, derivada de un estado triplete ($S = 1$), el cual podría surgir de impurezas de la especie $[\text{Cu}_2\text{IMC}_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ [Weder, 1999]. Estos resultados señalan que la especie mononuclear $[\text{CuIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ predomina en estado sólido. Parece ser que la síntesis de los complejos de $\text{CuIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ al usar NaIMC ayuda al predominio de especies mononucleares, además del uso de agua como solvente.

El espectro de XRPD para zinc (Fig. 5.7a), presenta similitudes con el difractograma reportado por Zhou, 2003, específicamente para la especie mononuclear $[\text{Zn}(\text{IMC})_2(\text{MeOH})_2]$



(Fig. 5.7b), sugiriendo isoestructuralidad con el complejo sintetizado en este trabajo y una posible estructura $[\text{Zn}(\text{IMC})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$. El difractograma en el caso de $\text{CuIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ no fue obtenido debido a una baja cristalinidad. Zhou en 2003 y Jabali en 2016 han establecido, por evidencia de IR, XRPD y XAFS, que la síntesis en solventes polares (MetOH, EtOH y H_2O) producen especies mononucleares.

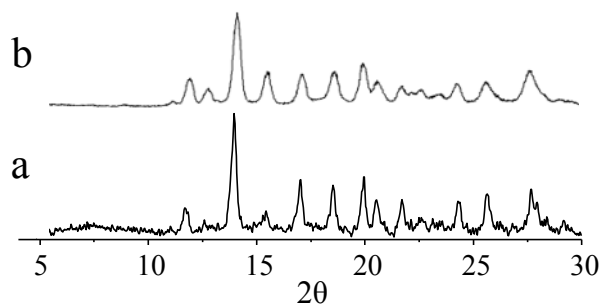


Fig. 5.7. XRPD de a) $\text{ZnIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ (Este trabajo) b) $\text{ZnIMC}_2(\text{MetOH})_2$ (Zhou, 2003).

Zhou, et al. también concluyen que el mejor modelo de ajuste para sus datos de XAFS, en muestras de polvos, se obtiene para un complejo tetraédrico mononuclear monodentado con dos IMC complejadas. Dada la similitud entre el XRPD de $\text{ZnIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ aquí reportado y el reportado por Zhou, 2003, una especie tetraédrica de $[\text{ZnIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ se propone exista mayoritariamente en la forma sólida. Estos resultados concuerdan con lo esperado con los complejos de $\text{Zn}(\text{II})$, ya que su capa llena d no le da una estabilización de campo cristalino, por lo que el tamaño del ión y los requerimientos estéricos del ligante, serán los que determinen el número de coordinación y estereoquímica. Los complejos esperados para $\text{Zn}(\text{II})$ son regularmente mononucleares, regularmente como quelatos o monodentados [Burgess, 2011] y a pesar de que existen los complejos carboxilatos como puentes estos generalmente no se estabilizan.



5.3. Estudios de estabilidad de IMC a pH 5 y 7.

Después de someter una solución de IMC 5.64×10^{-5} M a pH 5 y 7 con buffer de fosfatos 0.1 M, su espectro UV-Vis cambia de la siguiente manera:

pH 4.5

La Fig. 5.8 muestra los espectros de la IMC al paso del tiempo; en cada uno de ellos se observan los máximos característicos a 225, 270 y 320 nm.

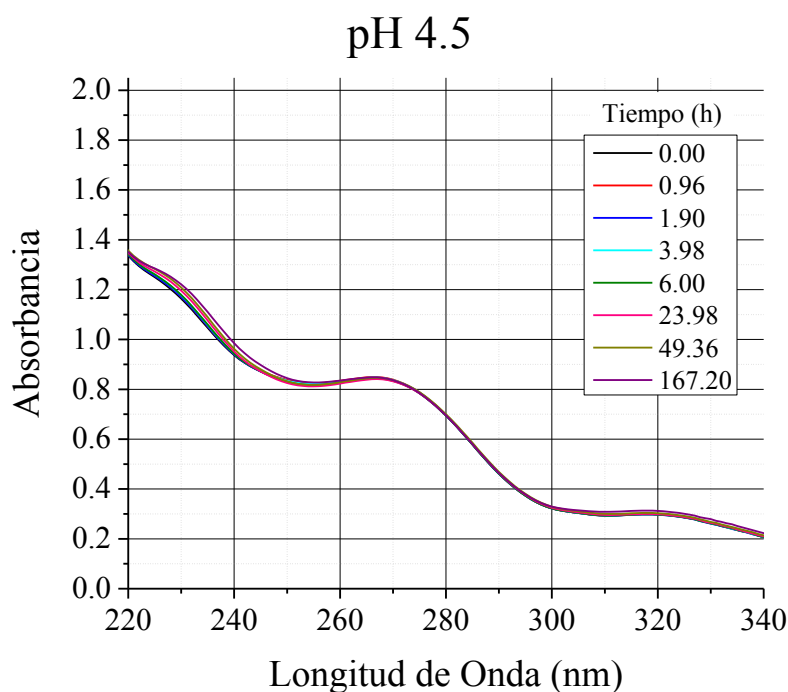


Fig. 5.8. Espectros de la IMC, en función del tiempo, a pH de 4.5.

El cambio de los máximos, en función del tiempo, con respecto a la señal a 0 h, tomada como 100 %, se observa en la Fig. 5.9; los máximos sufren cambios prácticamente despreciables. Los cambios perceptibles podrían adjudicarse a interacciones leves entre IMC^- -HIMC. La IMC parece ser muy estable a pH 4.5, parece ser que la especie HIMC en solución no se descompone y es más estable con el tiempo, sin embargo, al disminuir más el pH de la solución, por debajo de 4.5, la IMC precipita, y no permite el estudio en solución.



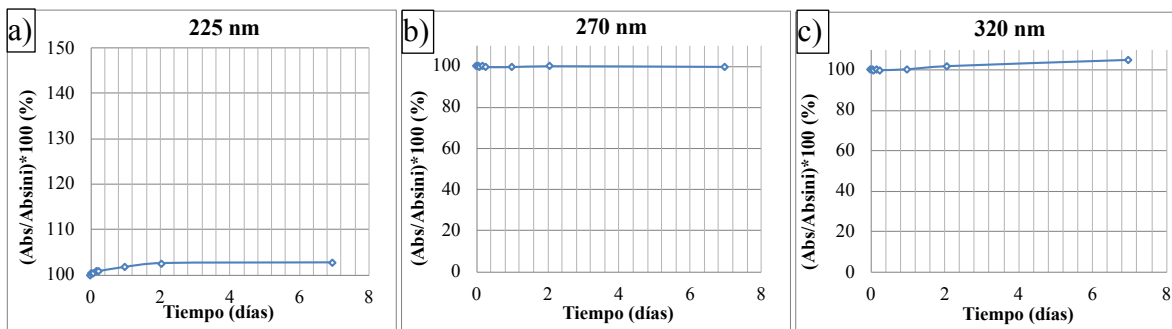


Fig. 5.9. Porcentaje de modificación de los máximos de IMC a a) 225, b) 270 y c) 320 nm, con respecto al valor a 0h, a pH 4.5, en función del tiempo.

pH 7

A pH 7, la IMC presenta más cambios perceptibles, en comparación a pH 4.5, como se observan en la Fig. 5.10 y 5.11. Se puede observar que todos los máximos aumentan y ninguno disminuye; además, después de las 48 h los gráficos comienzan a tener menos modificaciones; indicativo de que la descomposición se vuelve mas lenta. Estos aumentos se pueden asumir debido a formación de dímeros de IMC^- con HIMC ya que se encuentran presentes ambas especies en solución y en los cuales se ha observado asociación por los grupos carbonilo en solución (Fig. 5.12) [Tong, 2001].

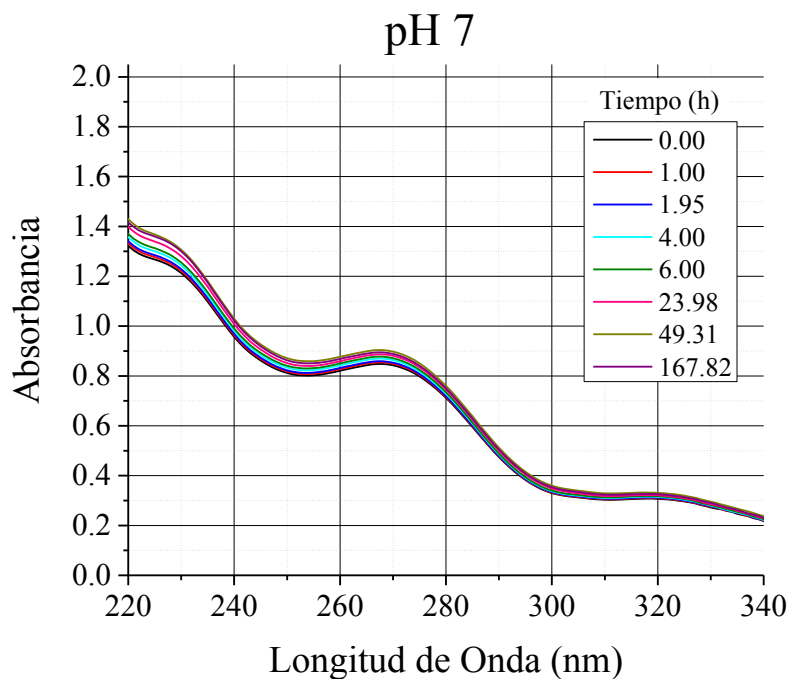


Fig. 5.10. Espectros de la IMC en función del tiempo a pH de 7.

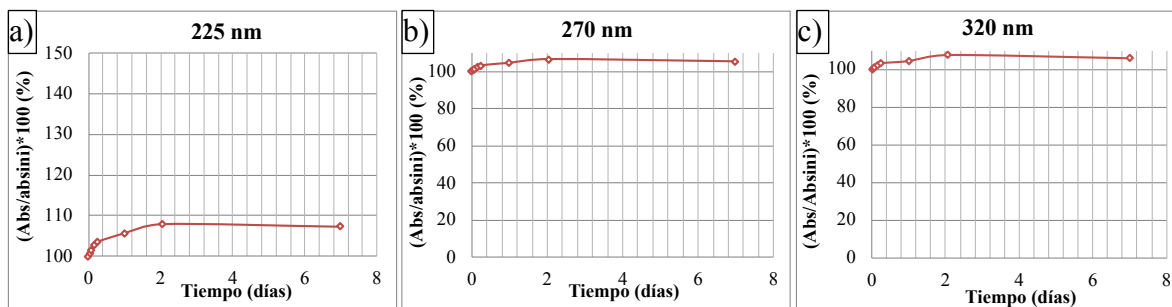


Fig. 5.11. Porcentaje de modificación de los máximos de IMC a a) 225, b) 270 y c) 320 nm, con respecto al valor a 0h, a pH 7 en función del tiempo.

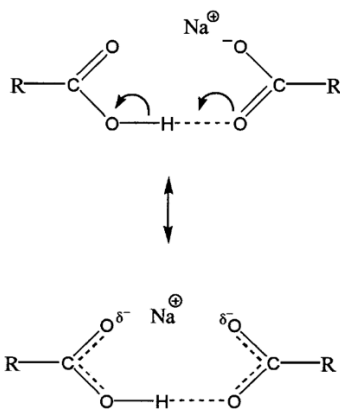


Fig. 5.12. Formación de dímeros de IMC por el grupo carboxilato.

pH 11

A pH 11, es donde se observan cambios considerables en los espectros Fig. 5.13 y 5.14. Es muy notorio el hiper Cromismo de la señal entre 225 y 230 nm convirtiendo el *hombro* a máximo, así como hipocromismo de la señal a 270 nm la cual presenta una disminución y un cambio batocrómico, indicación de cambios en la estructura de la molécula considerables, de igual manera la señal a 320 nm prácticamente desaparece, la banda que crece alrededor de 290-300 nm hace que la banda que se mueve a 270 nm se vea muy ancha, lo cual es indicativo de formación de al menos 2 diferentes productos con máximos muy próximos, lo cual hace difícil diferenciarlos. Para todas las señales, después de 48 h el cambio deja de ser tan drástico.



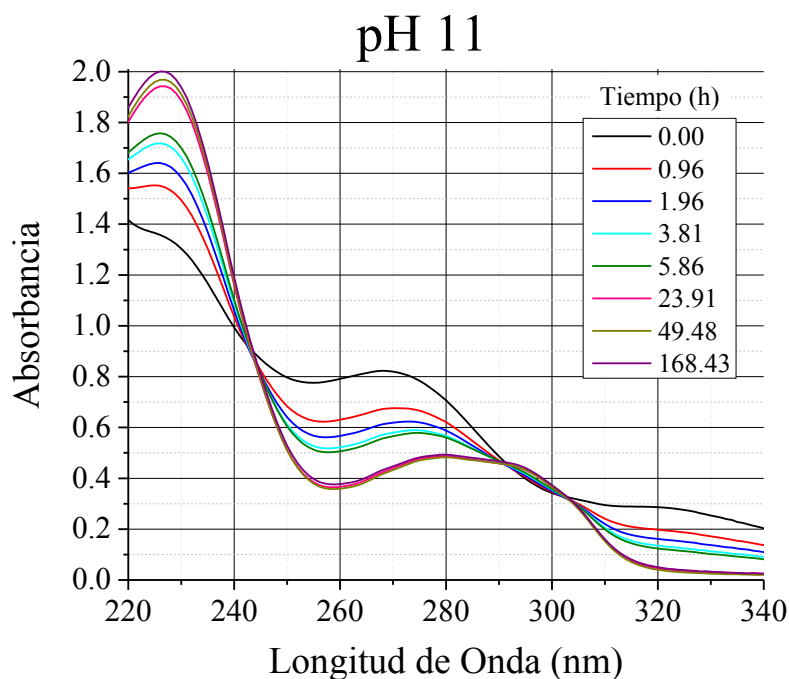


Fig. 5.13. . Espectros de la IMC en función del tiempo a pH de 11.

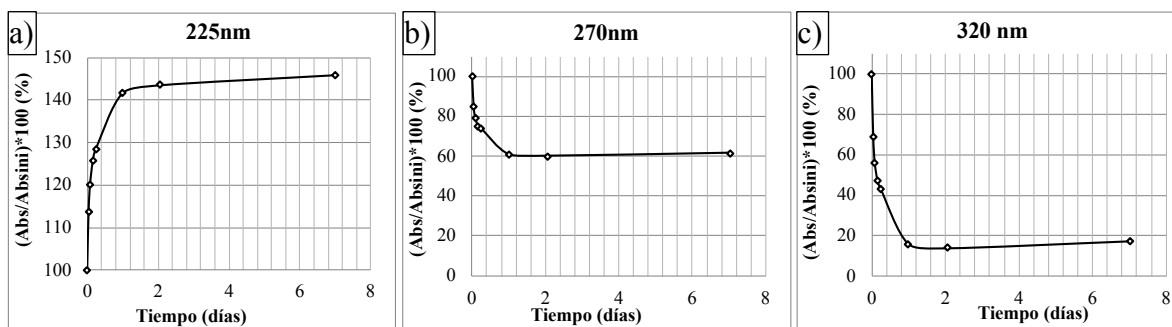


Fig. 5.14. Porcentaje de modificación de los máximos de IMC a a) 225, b) 270 y c) 320 nm, con respecto al valor a 0h, a pH 11, en función del tiempo.

Es posible asignar las nuevas señales a la formación de productos de degradación de la IMC por hidrólisis básica que ya se han reportado, los cuales son: el ácido 2-(5-metoxi-2-metil-1H-indol-3-il) acético y el ácido p-clorobenzoico (Fig. 5.15) [Comer, 2014. Fadhil , 2015].



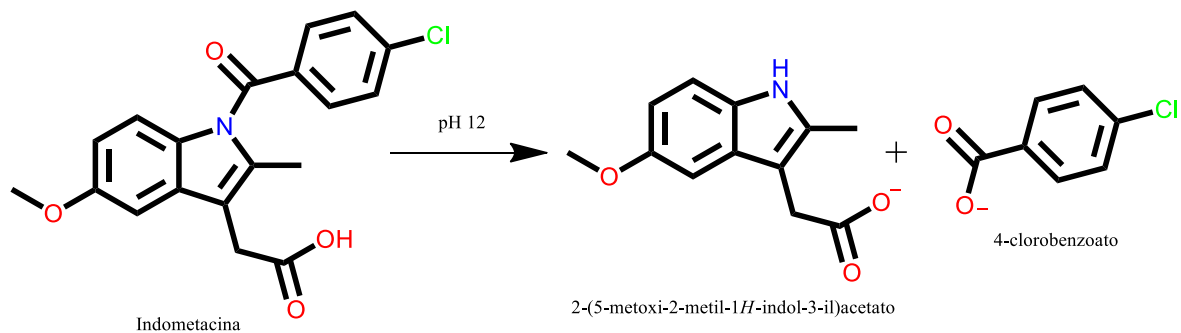


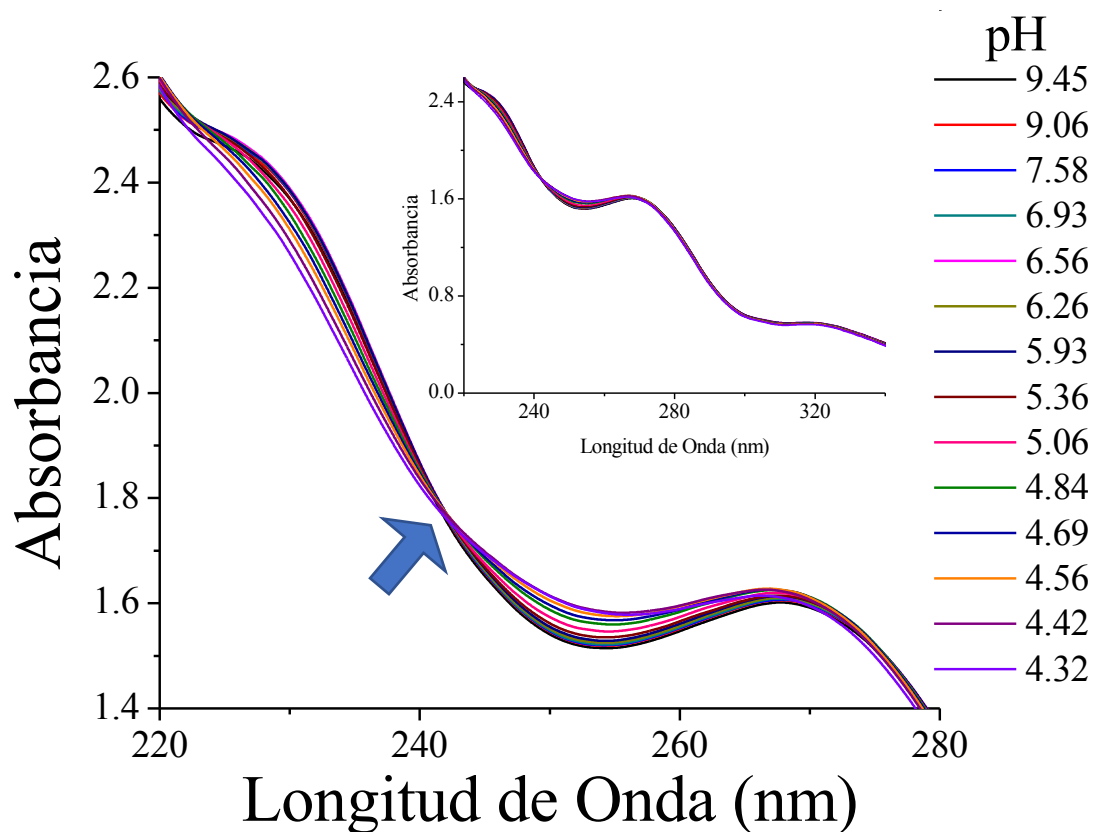
Fig. 5.15. La indometacina y sus productos de degradación a pH básico (Comer, 2014; Fadhil, 2015).

Por lo tanto; es posible observar que no sería favorable estudiar a la IMC a pH mayor a 7 debido a la descomposición rápida de la IMC. Por lo tanto las mejores condiciones para estudiar a la IMC en solución sin presentar descomposición considerable; es entre pH 7 y pH 4.5 a una concentración de 5.64×10^{-5} M.



5.4. Determinación del pK_a de la IMC por UV-Vis.

En la Fig. 5.16 se observa el cambio de absorbancia de una solución inicial de IMC 5.83×10^{-5} M a pH 9.45, a medida que se realizan adiciones de HCl 0.09 M. El cambio de pH modifica el intervalo entre 280 y 220 nm, observándose un punto isobéptico, indicación de que al menos se está llevando a cabo un equilibrio, esto se explicaría debido a la protonación



de la IMC^- para la formación de HIMC.

Fig.5.16. Espectros obtenidos de la titulación de 10 mL de IMC 5.53×10^{-5} M con HCl 0.09. el gráfico completo se observa en el gráfico reducido, mientras que el acercamiento de 220-280 nm se muestra en primer plano.

El *hombro* observado a 230 nm tiene una disminución de absorbancia (cambio hipocrómico) [Husain, 2017], hasta el punto de desaparecer al final de la titulación y el máximo cercano a 270 tiene un ligero desplazamiento hasta 267 nm (cambio hipsocrómico), el valle que se forma entre 250-260 nm aumenta en absorbancia (cambio hiperocrómico). Los efectos que se pueden estar observando, son debidos principalmente al cambio de ambiente que sufre la

parte indol de la molécula, ya que los máximos reportados para indol (216, 271 y 278 nm) se encuentran entre 220 y 280 nm, que tiene relación a los máximos de 220 y 270 nm de la indometacina (los máximos de la molécula de ácido p-clorobenzoico son 202 y 234 nm) [Hirayama, K. (1967)], además de que los desplazamientos no son tan marcados, por lo que la aportación del carboxilo a la resonancia del grupo indol, no es tan significativo [Chakraborty, 2010].

Por lo tanto, es de esperarse que las transiciones que más predominan y las que mayores modificaciones presentarán en este sistema sean las $\pi-\pi^*$ [Kalsi, 2006].

Los espectros de la Fig. 5.16 fueron alimentados en SQUAD, proponiendo el siguiente equilibrio:



Lo anterior para poder elucidar la constante de acidez ($-\log K_a = \text{p}K_a$). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Valor de $\text{p}K_a$ para la IMC refinado por SQUAD.

$\text{p}K_a$	σ	U
4.52 ± 0.06	5.81×10^{-3}	9.68×10^{-3}

El valor de $\text{p}K_a$ obtenido, concuerda con los valores reportados en Valentovic, 2007; Salústio, 2009 y Lucas, S., 2016. Mientras que los valores de σ (desviación estándar) y U (suma de cuadrados de los residuales, Anexo A5) indican una diferencia mínima del modelo propuesto, con los obtenidos experimentalmente.

Adicionalmente, para comprobar gráficamente el modelo propuesto con los datos experimentales, se construyó un diagrama de distribución de especies con el dato de $\text{p}K_a$ obtenido por SQUAD (Fig. 5.17). En donde se puede observar que a $\text{pH} < 4.5$ la especie que predominará será la HIMC y a $\text{pH} > 4.5$, predominará la especie IMC^- . Con este gráfico es posible saber la fracción de la especie a un pH definido y gracias a los valores de absorptividad calculados por SQUAD es posible reproducir el experimento de manera teórica (ajuste).



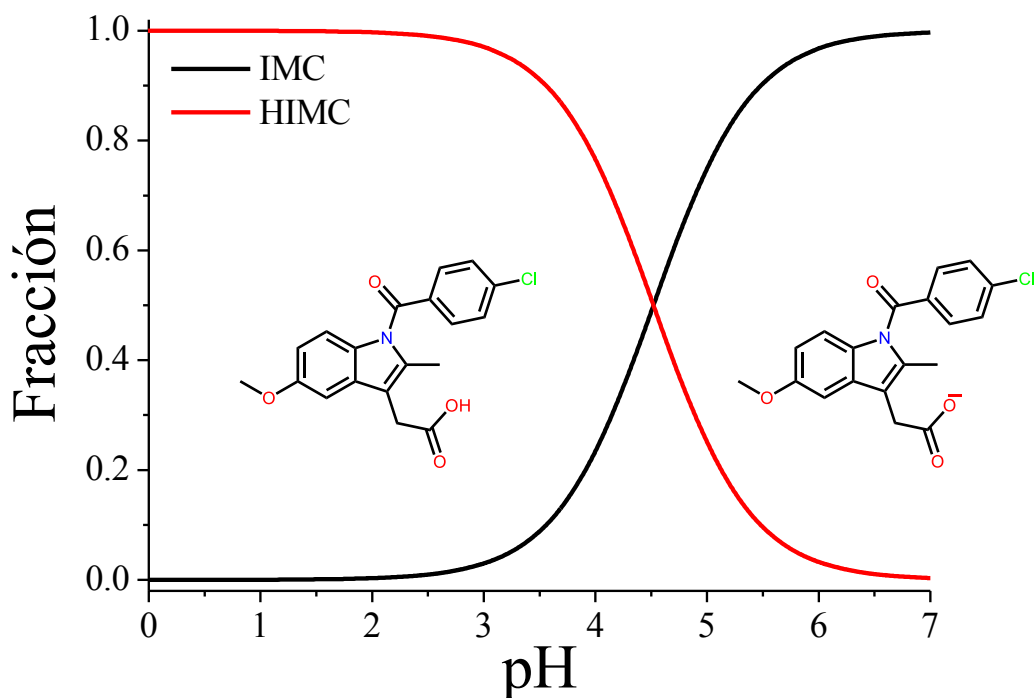


Fig.5.17. Diagrama de distribución de especies de HIMC en función del pH. Se pueden observar los valores de pH donde predominará la especie protonada y desprotonada de la HIMC.

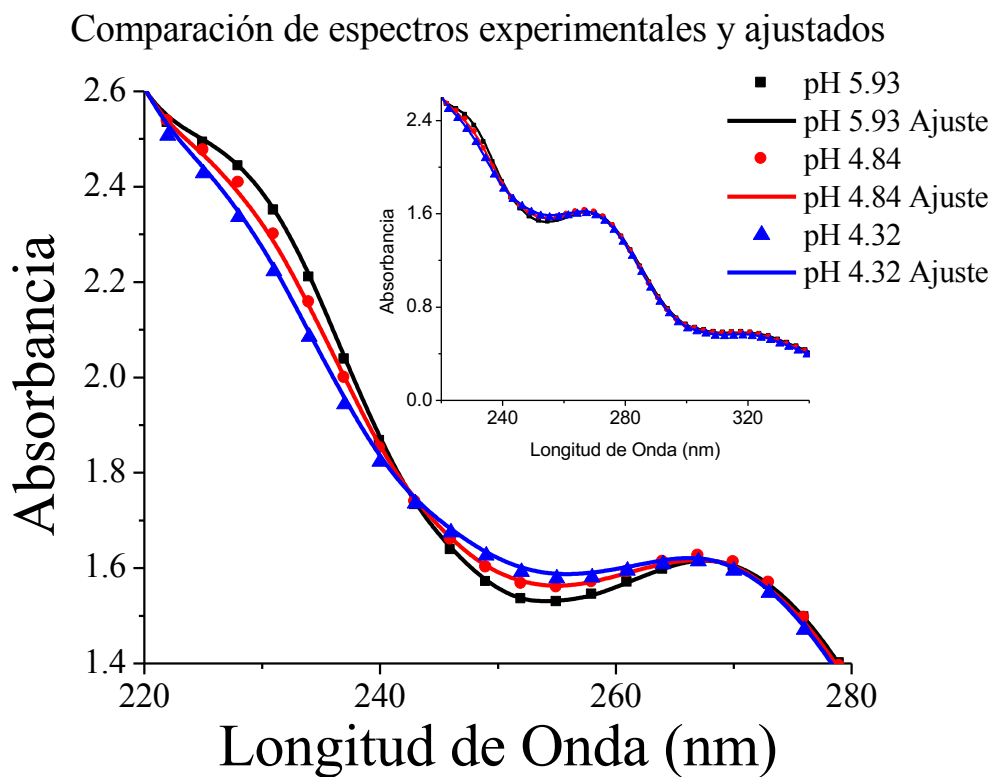


Fig. 5.18. Comparación gráfica entre los espectros obtenidos experimentalmente con los gráficos teóricos (ajuste).

En la Fig. 5.18 se puede observar el gráfico en el que se comparan algunos espectros experimentales, con sus respectivos teóricos (ajuste), cuando se encuentra en mayor medida la especie IMC ($\text{pH} = 5.93$), cuando se está cerca del punto de equivalencia ($\text{pH} = 4.82$) y cuando se encuentra en mayor proporción la especie HIMC ($\text{pH} = 4.32$). Se observa gran correspondencia entre el teórico (ajustado) y el experimental, por lo cual se puede confirmar que el modelo propuesto (Ec. 5.1) explica el comportamiento de los datos obtenidos experimentalmente.



5.5. Estudio de la interacción IMC con CDs.

5.5.1. Análisis estructural de la interacción IMC con CDs.

Se realizó un análisis estructural con las medidas de las moléculas involucradas para proponer una manera en que las CDs incluyen a la IMC. Las medidas y el volumen de la IMC, así como los volúmenes del indol, como del grupo p-clorobenzoílo fueron calculados con el programa Gaussian [Frisch, 2016] (Fig. 5.19).

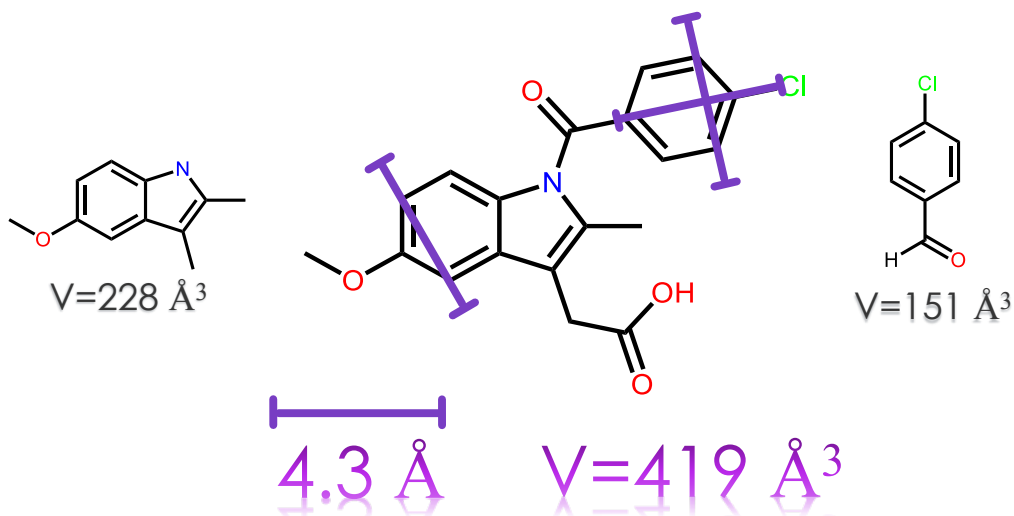


Fig. 5.19. Tamaños calculados para la molécula de IMC, así como para la molécula metoxiindol y el ácido p-clorobenzoico.

Las medidas de las CDs se tomaron de Frömming de 1994 (Fig. 5.20). Aquí se presentan tanto a la IMC como a las CDs como moléculas rígidas, sin embargo esto en la realidad no sucede, todas las moléculas tendrán libertad conformacional y en el caso de la CDs este movimiento tendrá efecto en la apertura de la cavidad y su disponibilidad para tener contacto con el huésped, en este caso la IMC.

La α -CD, al ser la CD más pequeña, va a interactuar por las secciones hidrófobas que permitan un mejor contacto con la molécula de IMC, los dos sitios posibles son los que se presentan en la Fig. 5.21. Es posible la entrada de la IMC en la cavidad, sin embargo la entrada no sería completa ya que la cavidad se vuelve más pequeña con la profundidad,



además de que el volumen de los residuos disponibles, se encuentran en los límites o sobrepasan el volumen de la α -CD.

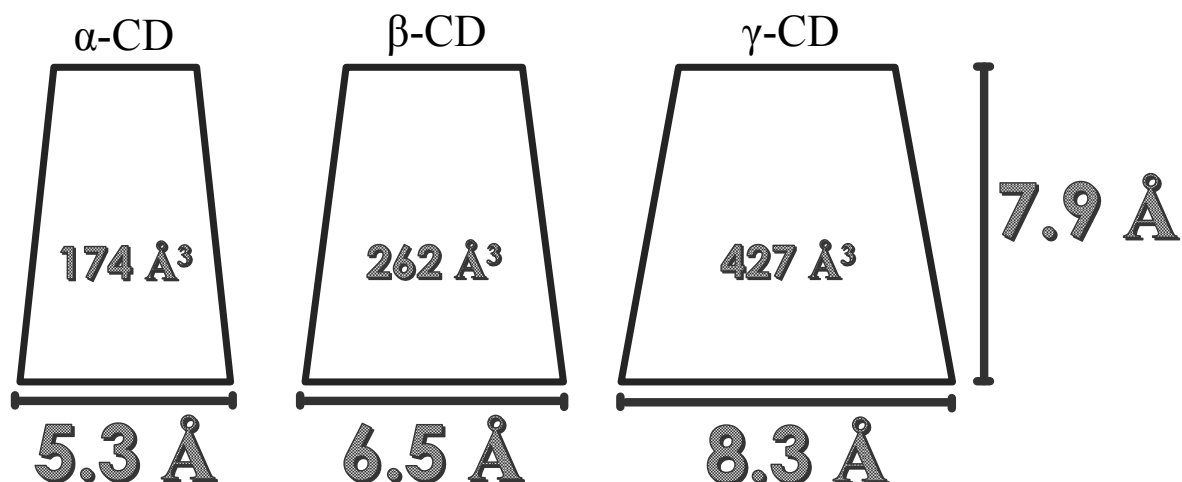


Fig. 5.20. Dimensiones de la CDs nativas.

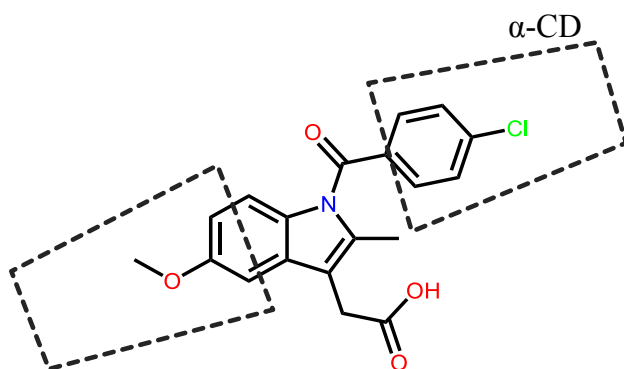


Fig. 5.21. Interacción propuesta para la α -CD con IMC.

En el caso de la β -CD (Fig. 5.22), los residuos pueden interactuar con la molécula de IMC por los mismos lugares que se plantearon antes con la α -CD, sin embargo la entrada sería un poco más libre debido a un volumen mayor de la cavidad de la β -CD. Por lo tanto permitiría una mayor inclusión de la molécula. Sería posible proponer 2 sitios disponibles para que la CD interactúe. Debe notarse que los grupos o las zonas más polares no interactuarán con la IMC.



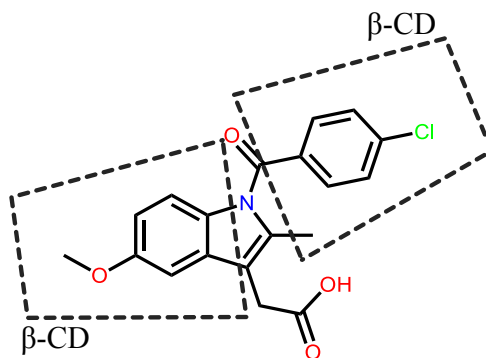


Fig. 5.22. Interacción propuesta para la β -CD con IMC.

En el caso de la γ -CD (Fig. 5.23), es posible que incluya a la IMC, pero con una libertad aún mayor que con α - y β -CD, además de mayores movimientos conformacionales, la inclusión podría ser por los dos sitios anteriormente planteados con α - y β -CD (Fig. 5.23a); aunque, el volumen de la γ -CD podría incluir a la IMC completa, debido al volumen tan grande, aunque los efectos estéricos podrían comenzar a tener impactos desfavorables (Fig. 5.23b).

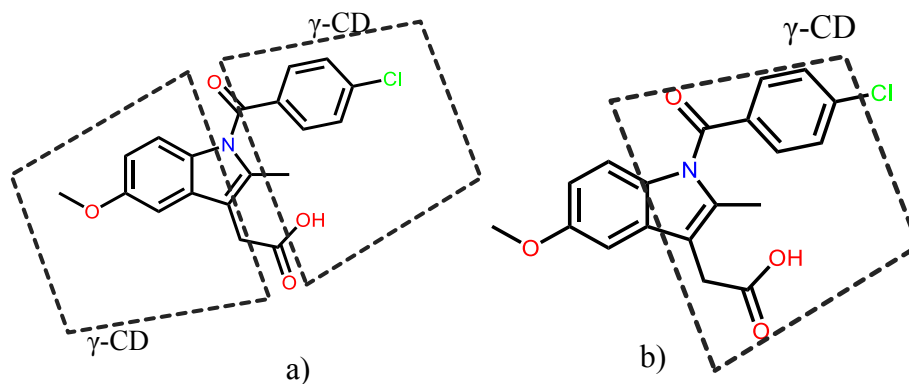


Fig. 5.23. Interacción propuesta para la γ -CD con IMC. a) con dos moléculas de CD, y con b) una molécula de CD.

Es posible observar que con todas las CDs la IMC puede interactuar ya que tiene grupos disponibles hidrofóbicos que son candidatos para que se lleva a cabo la inclusión. Los tamaños relativos de las CDs sustituidas como HP- β - ó HP- γ -CD, no tendrán cambios significativos en sus dimensiones debido a los grupos hidroxipropilos.

Existen estudios de modelado molecular sobre la interacción de la IMC con CDs y muestran la preferencia que tiene el grupo p-clorobenzoilo para incluirse en la cavidad, además de que un gran número de contribuciones se elige la relación 1:1, lo cual indicaría que sólo una

molécula de CD interaccionará con una molécula de IMC [Backensfeld, 1990; Rudrangi, 2015; Hamada, 1975, Backensfeld, 1991; Casella, 1998; Jambhekar, 2004; Zhang, 2006; Iohara, 2008; Salústio, 2009; Alsarra, 2010; Rudrangi, 2015].

5.5.2. Determinación de las constantes de inclusión IMC con CDs por UV-Vis a pH 5 y 7.

Diversos estudios de interacción IMC con CDs se han reportado anteriormente por UV-Vis, usando el método de Higuchi-Connors [Higuchi-Connors, 1965] para determinación de constantes aparentes de inclusión [Hamada, 1975, Backensfeld, 1991; Casella, 1998; Jambhekar, 2004; Zhang, 2006; Iohara, 2008; Salústio, 2009; Alsarra, 2010; Rudrangi, 2015]. Sin embargo, este método limita su estudio a sólo pocos puntos y al uso de sólo una longitud de onda, además de una cuantificación del analito de interés ya incluido en la CD. En los experimentos propuestos en este trabajo, se toman al menos 24 espectros con 40 puntos, desde 220 hasta 340 nm, por cada espectro; además de que no es necesaria una cuantificación adicional de la cantidad del analito huésped.

Es bien sabido que los complejos de inclusión CD-huésped presentan valores de constantes de complejación ($\log K_{1:1}$) menores de 3 [Szejtli, 1998], por lo tanto, al proponer un equilibrio como el de la Ec. 5.2, y al realizar adiciones en exceso de CD, podremos asegurar la formación del complejo. Por lo tanto, en cada experimento presentado, un exceso de CD de hasta 200 veces por arriba de la concentración de IMC fue agregado. Esta forma de experimentación fue seleccionada para desplazar el equilibrio hacia la formación de productos y poder estudiar el efecto de las CDs sobre la IMC. El experimento inverso, adicionar exceso de IMC a una solución de CD, es también factible, sin embargo por practicidad en las señales por UV-vis debido a un mayor coeficiente de absortividad de la IMC, se eligió dejar constante la IMC y variar las CDs, que tienen bajo coeficientes de absortividad. Debe notarse que los experimentos fueron realizados a pH de 7 y de 5 debido a la estabilidad que se ha descrito en la sección 5.3 para la IMC, en donde es relativamente estable y no precipita.



De los experimentos de RM realizados, se seleccionaron los espectros de las RM de 0-30 para alimentar en SQUAD (ANEXO A5, A6 y A7) y refinar los valores de $\log K_{1:1}$. En las

Figs. 5.24 y 5.25 se muestran, algunos de los espectros experimentales obtenidos por UV-Vis (a pH 5 y 7) para las CDs nativas y para las CDs sustituidas, respectivamente. El uso de marcadores indican los puntos experimentales, mientras que las líneas continuas señalan los ajustes teóricos del modelo 1:1 Ec. 5.2. construidos usando SQUAD y MEDUSA.

Las ligeras modificaciones en los espectros y los valores de $\log K_{1:1}$ refinados por SQUAD (Tabla 5.2), indican que existe interacción entre la IMC y las CDs y que efectivamente las interacciones son débiles, muy probablemente del tipo de van der Waals y puentes de hidrógeno [Szejtli, 1998] En el ANEXO A7, se muestran los gráficos del pCD contra la absorbancia corregida. Los valores de $\log K_{1:1}$ son diferentes para cada CD y a cada pH. Los valores de σ y de U (suma de cuadrados), fueron de los más bajos, indicación de un buen ajuste al modelo propuesto, debe mencionarse que otros modelos fueron evaluados, pero el modelo 1:1 Ec. 5.2 presentó mejores ajustes y menores valores de σ y de U.

En el caso de α -CD (Fig. 5.24), los espectros de la IMC tanto a pH 5 como 7, presentan un efecto hipercrómico a relaciones molares bajas, el efecto es poco perceptible y tiende a mezclarse con efectos de dilución. Una vez alimentando y refinando las constantes por SQUAD, las constantes ($\log K_{1:1}$); en comparación al conjunto de constantes obtenidas, son de las más bajas siendo de 2.22 ± 0.05 y 2.32 ± 0.05 a pH 5 y 7, respectivamente. Al ser diferentes, indicarían que la inclusión es distinta, teniendo una mejora de inclusión al aumentar el pH. Este valor pareciera estar relacionado al porcentaje de especies presentes de IMC y HIMC en solución. Al aumentar el pH, habrá más porcentaje de IMC desprotonada en solución (Sección 5.3). Esto indicaría que la α -CD tiene más afinidad con la IMC^- .

En el caso de la β -CD (Fig 5.24), un efecto hipercrómico similar al de α -CD se observa al iniciar las adiciones de CD, sin embargo, después de la relación 6 este efecto se pierde por dilución surgiendo un efecto hipocrómico, sin embargo puede notarse que en los máximo a 225 y 270 nm el efecto hipocrómico es más marcado, pero en el máximo a 320 nm y en el intervalo de 240 a 250 nm, no parece que el efecto hipocrómico presente mucho efecto, ya que se esperaría que el efecto de dilución afecte a todo el espectro en iguales proporciones, como sucede en el caso de la α -CD. Esto confirma la inclusión de la IMC en la β -CD, además de que indicaría que una sección de la IMC es la que entrará en la CD.



Se puede observar que los valores de $\log K_{1:1}$ son 2.86 ± 0.01 y 2.80 ± 0.04 a pH 5 y 7, respectivamente; son muy similares, ligeramente más grandes a pH 5, lo que indicaría que la HIMC podría estar incluyendo de una mejor manera, esto es claro debido a la cavidad hidrofoba que atraería a la molécula también hidrófoba y al acomodo que pudiera tener dentro de la cavidad, situación que cambió con respecto a la α -CD, esto puede ser indicio del cambio de polaridad de α -CD y la β -CD al interactuar con IMC.

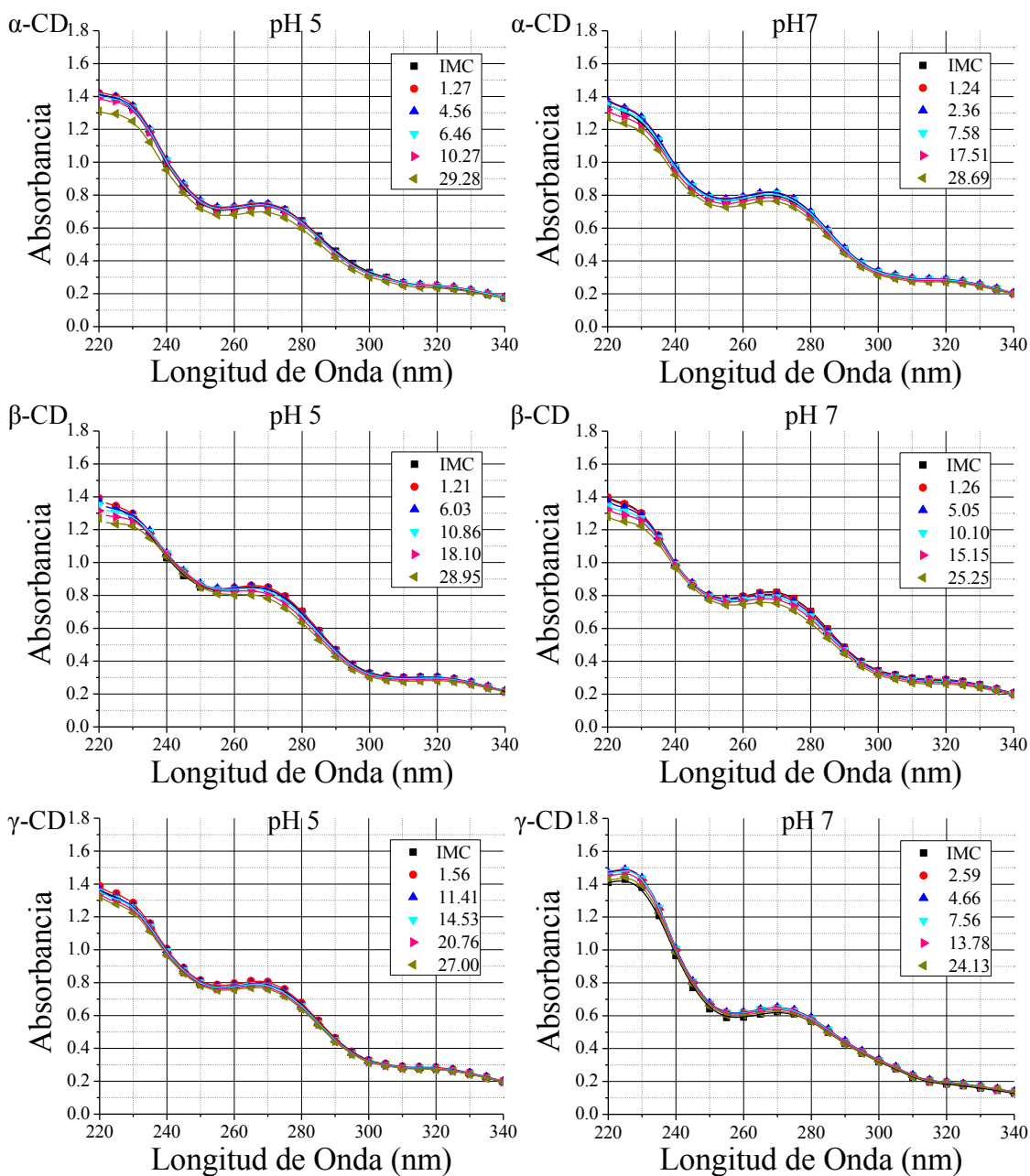


Fig. 5.24. Gráficos de la interacción IMC con las CD nativas (α -, β - y γ -CD) por UV vis a pH 5 y 7. Las líneas continuas indican el ajuste realizado por SQUAD.



Tabla 5.2. Tabla de resultados de la interacción IMC con CDs por UV-Vis a pH 5 y 7.

CD	pH	$\log K_{1:1}$	σ	U
α	5	2.22 ± 0.05	2.56×10^{-3}	4.58×10^{-3}
α	7	2.32 ± 0.05	3.67×10^{-3}	7.18×10^{-3}
β	5	2.86 ± 0.01	2.67×10^{-3}	3.69×10^{-3}
β	7	2.80 ± 0.04	1.72×10^{-3}	1.59×10^{-3}
γ	5	2.31 ± 0.03	3.82×10^{-3}	7.79×10^{-3}
γ	7	2.13 ± 0.02	4.09×10^{-3}	9.51×10^{-3}
HP- β	5	2.57 ± 0.04	4.25×10^{-3}	7.92×10^{-3}
HP- β	7	3.00 ± 0.04	3.24×10^{-3}	6.02×10^{-3}
HP- γ	5	2.43 ± 0.06	6.11×10^{-3}	1.99×10^{-2}
HP- γ	7	2.00 ± 0.05	4.30×10^{-3}	9.83×10^{-3}

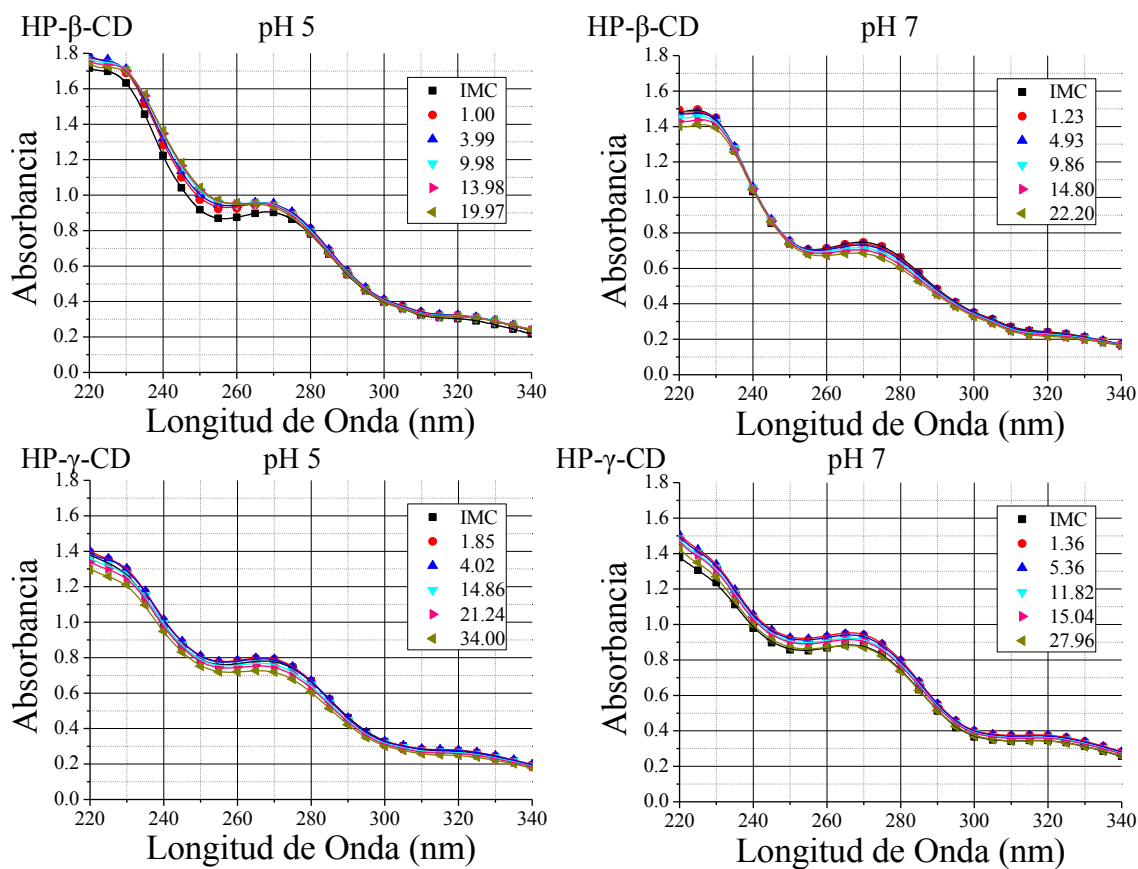


Fig. 5.25. Gráficos de la interacción IMC con CD sustituidas (HP- β y HP- γ -CD) por UV-vis a pH 5 y 7. Los recuadros indican la relación molar a la que se llegó. Las líneas continuas indican el ajuste realizado por SQUAD.



Los valores son mayores que los de la α -CD, indicación de una mayor cavidad mejora la inclusión. El pH no parece tener un efecto tan considerable como con α -CD.

Con γ -CD (Fig. 5.24), los espectros de la IMC presentan el efecto hipercrómico-hipocrómico antes mencionado al realizar las adiciones. El efecto es perceptible en el máximo a 225 nm. Al ser evaluados los espectros experimentales, se tienen valores de $\log K_{1:1}$ de 2.31 ± 0.03 y 2.13 ± 0.02 a pH 5 y 7, respectivamente; los cuales, en comparación a las demás CD no sustituidas, son bajas pero a pH 7 es de las más bajas de todas las constantes calculadas. Lo anterior indicaría que la HIMC tiene preferencia por la γ -CD, al igual que como sucede con β -CD, esto posiblemente al ambiente dentro de la CD; sin embargo el tamaño de la CD, contrario a lo que se pensaría no hace mejorar la inclusión.

Los gráficos de la interacción IMC con HP- β -CD (Fig. 5.25), muestran a pH 5, un incremento de absorbancia al adicionar la CD en el intervalo de 220-280nm, este aumento comienza a disminuir por dilución después de la relación 3.99. A pH 7 este cambio es diferente, se puede observar que las modificaciones de absorbancia sólo se dan en los máximos cerca de 230 y 275nm. Los resultados de la IMC con HP- β -CD Tabla 5.2 presenta valores de $\log K_{1:1}$, 2.57 ± 0.04 y 3.00 ± 0.04 a pH 5 y 7, respectivamente; indicación de que la HP- β -CD tiene más afinidad por la IMC que por la HIMC, en comparación con la β -CD, es más evidente la diferencia de afinidad, la cavidad de la HP- β -CD es del mismo tamaño que la β -CD siendo los residuos 2-hidroxipropilo los que mejoran la preferencia por IMC. En el trabajo de Backensfeld de 1991, usando HP- β -CD M.S. 0.39 la afinidad es mejor por HIMC ($\log K_{1:1} = 3.20$ y 2.28 , a pH 5 y 7, respectivamente) de igual manera que β -CD. En este trabajo la modificación de M.S. 0.6 mejora la afinidad por IMC.

Con la HP- γ -CD (Fig. 5.25) los valores de $\log K_{1:1}$ son 2.43 ± 0.06 y 2.00 ± 0.05 a pH 5 y 7 (Tabla 5.2). Al igual que la γ -CD, la afinidad por HIMC es mayor que por IMC, la sustitución por 2-hidroxipropil mejora aún más la preferencia por HIMC que por IMC. En comparación con HP- β -CD, la preferencia por IMC disminuye drásticamente, y la preferencia por HIMC disminuye ligeramente. Esto indicaría que la cavidad afecta desfavorablemente la inclusión y que la sustitución por hidroxipropilos en HP- γ -CD y HP- β -CD, tiene efectos distintos al interaccionar con las especies de IMC.



En general se observa una mayor afinidad por las CDs que tienen 7 residuos glucopiranosos. Las diferencias entre pH s de los valores de $\log K_{1:1}$ de las CDs nativas son más cercanas, lo cual cambia con los valores de las CDs sustituidas que presentan una mayor diferencia entre un pH y otro, aunque el tamaño será el que dictamine la afinidad, con 6 y 8 residuos glucopiranosos la IMC disminuye su afinidad; esto debido a la posible existencia de efectos estéricos en el caso de la α -CD y con la probable deficiencia de interacciones con la γ -CD debido a un mayor tamaño.

Sin embargo, el estudio de UV-Vis no nos brinda mayor información sobre la manera en que las CDs incluyen a la IMC, otras técnicas tendrán que ser utilizadas.

5.5.3. Determinación de las propiedades termodinámicas de la inclusión IMC con CDs por Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC) a pH 7.

La técnica de calorimetría de titulación isotérmica (ITC, por sus siglas en inglés: isothermal titration calorimetry) es una herramienta muy útil y versátil para el estudio de interacciones moleculares. Durante un experimento de calorimetría de titulación isotérmica, se mide el calor generado o absorbido durante la reacción de interés. En nuestro caso, una solución de CD (titulante) es adicionada a una solución de IMC (titulado) por un tiempo determinado usando una o más adiciones individuales (inyecciones). El calor en el caso de un VP-ITC, que fue utilizado para este trabajo, es medido como el cambio de potencia necesaria para mantener la celda de muestra y la celda de referencia a la misma temperatura. El calor producido durante cada inyección es proporcional a la cantidad de complejo formado (ANEXO A3). El cambio en calor durante el experimento, permite la evaluación de la estequiometría de interacción, la constante de afinidad (K) y la entalpía de interacción (ΔH), de las cuales se puede derivar el valor de energía libre de Gibbs (ΔG) y el valor de entropía (ΔS) [Duchêne, D. 2011; Gaisford, 2006; Costas, 2015].

En este trabajo, los experimentos sólo se realizaron a pH 7 debido a que a pH 5, a las concentraciones de trabajo, la IMC precipita, además de que se usó solución NaOH 0.01M para disolver a la HIMC.

Los gráficos de las Fig. 5.26, 5.27 y 5.28, muestran para cada experimento de interacción IMC con CD, un termograma o potenciograma (potencia en función del tiempo) de dilución;

en dónde se realizan adiciones de CD al buffer de fosfatos en los que fueron preparadas las soluciones, enseguida se muestra el termograma de la titulación de una solución de CD en una solución de IMC. Por último, se muestran los isotermas (calor por inyección en función de la relación molar) de dilución (círculos negros) y titulación (círculos rojos). A la isoterma de titulación ya se le ha realizado la resta del efecto debido a la dilución y además se compara con el ajuste del modelo realizado (línea azul). El ajuste fue realizado usando el modelo de la Ec. 5.2, con la ayuda del software Affinimeter. Los ajustes fueron seleccionados en función del valor más bajo de chi-cuadrada (χ^2) obtenido (otros modelos fueron probados sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron para modelos 1:1) [Bouchemal, 2012].

Las respuestas obtenidas en los termogramas presentan, en su mayoría, señales características de liberación de energía hacia el entorno del sistema. Las señales de dilución (Fig. 5.26a, 5.27 a,d y 5.28a,d) siempre son más bajas que las señales de titulación (Fig. 5.26b, 5.27b,e y 5.28b,e). Al hacer el ajuste al modelo, el efecto de dilución se resta del experimento de titulación para sólo considerar a la interacción IMCCD. En los isotermas de enlace (titulación), la gráfica de titulación no presenta una forma característica de sigmoide, esto debido a que la interacción es débil (Fig. 5.26b, 5.27 c,f y 5.28c,f). En la mayoría de los casos la curva tiende a cero, indicación del grado de saturación de los sitios en donde la CD puede interaccionar, pero a pesar de llegar a relaciones mayores a 1 nunca se llega a saturación, una posible razón de esto es la baja cuantitatividad de la reacción de formación del complejo de inclusión, además de un valor de $1/K_{1:1}$ menor de 10 [Jelesarov,1999]. Para cada CD, las particularidades al interaccionar con la IMC se muestran en la Tabla 5.3 y se describen a continuación.

Los valores obtenidos por ITC (Tabla 5.3), para la interacción α -CD con IMC a pH 7, señalan que la interacción es débil y poco espontánea por los valores de $\log K_{1:1}$ y ΔG . Es de las interacciones más exotérmicas y con un ΔS negativo. Esto indicaría que la contribución entálpica es mayor, en comparación al resto de las CDs. La contribución entálpica tiene muchas fuentes, sin embargo en el caso de las CDs los efectos de enlaces no polares son los que mayoritariamente se espera que afecten los valores de entalpía [Jelesarov, 1999]. Además de que los grados de libertad disminuyen, indicación de un sistema más ordenado. La interacción es impulsada por la contribución entálpica.



IMC α -CD.

$[IMC]=5.53 \times 10^{-4}M$; $[\alpha\text{-CD}]=1.73 \times 10^{-2}M$

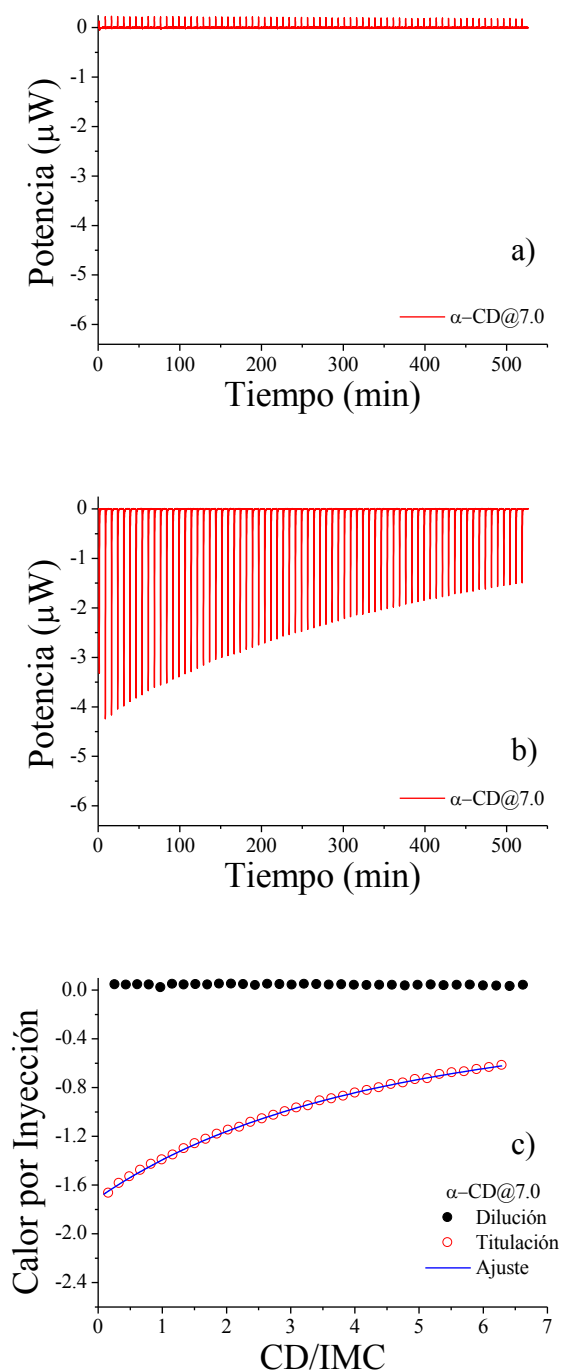


Fig. 5.26. Experimento obtenidas por ITC para la interacción de IMC con α -CD a) Potenciograma de dilución, b) potenciograma de titulación y c) isotermas de dilución y titulación con ajuste al modelo 1:1.



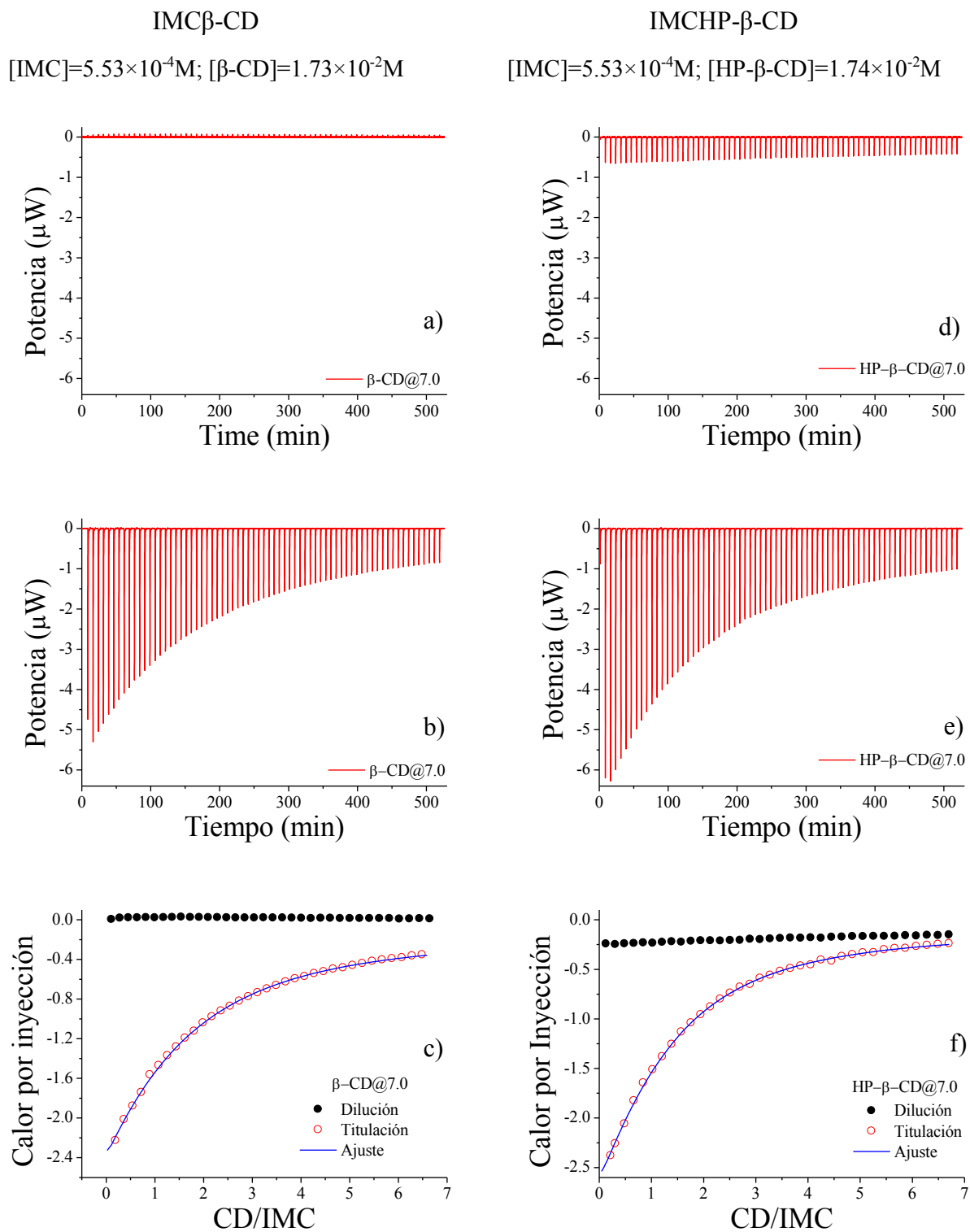


Fig. 5.27. Experimento obtenidas por ITC para la interacción de IMC con: β-CD a) Potenciograma de dilución, b) potenciograma de titulación y c) isotermas de dilución y titulación con ajuste al modelo 1:1 y HP-β-CD d) potenciograma de dilución, e) potenciograma de titulación y f) isotermas de dilución y titulación con ajuste al modelo 1:1.

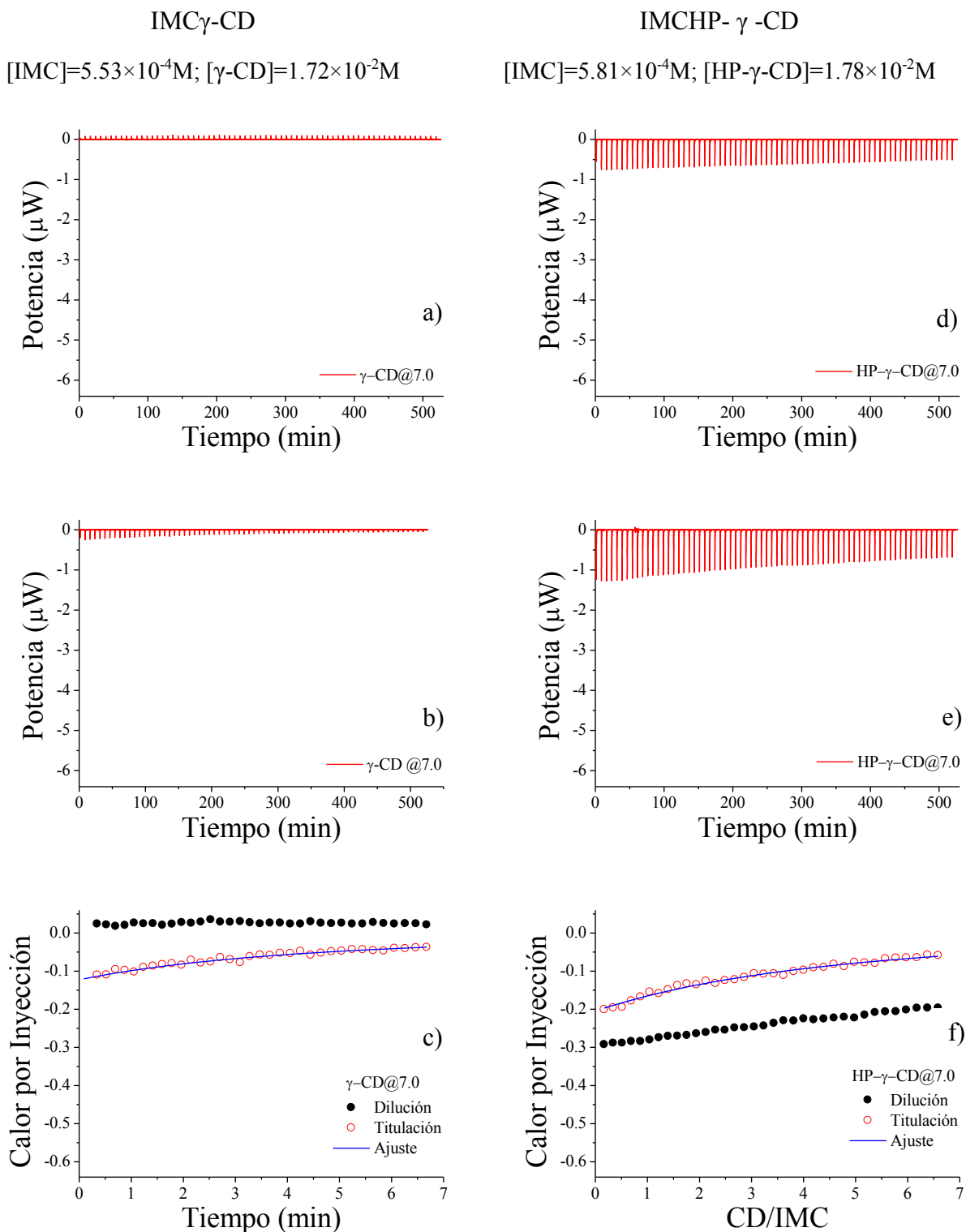


Fig. 5.28. Experimento obtenidas por ITC para la interacción de IMC con: γ -CD a) Potenciograma de dilución, b) potenciograma de titulación y c) isothermas de dilución y titulación con ajuste al modelo 1:1 y HP- γ -CD d) potenciograma de dilución, e) potenciograma de titulación y f) isothermas de dilución y titulación con ajuste al modelo 1:1

Tabla 5.3. Resultados de ITC para la interacción IMC con CDs.

CD	log K _{1:1}	ΔG (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)	-TΔS (kJ/mol)	ΔS (J/molK)
α-CD	2.10 ± 4.62×10 ⁻⁴	-11.99 ± 4.62×10 ⁻⁴	-25.50 ± 0.02	13.51 ± 0.05	-45.32 ± 0.06
β-CD	2.749 ± 0.002	-16.11 ± 2.97×10 ⁻⁴	-10.97 ± 0.01	-5.15 ± 0.02	17.26 ± 0.05
γ-CD	2.666 ± 0.002	-15.22 ± 6.96×10 ⁻⁴	-0.493 ± 0.001	-14.72 ± 0.05	49.38 ± 0.01
HP-β-CD	2.98 ± 4.02×10 ⁻⁴	-17.00 ± 1.35×10 ⁻⁴	-9.79 ± 0.01	-7.21 ± 0.02	24.19 ± 0.02
HP-γ-CD	2.258 ± 0.002	-12.885 ± 0.001	-2.14 ± 0.01	-10.74 ± 0.04	36.03 ± 0.03

En el caso de β-CD con IMC, se puede decir que la interacción es espontánea, exotérmica y con un valor positivo entrópico, la reacción es impulsada por la contribución entálpica. En comparación con la α-CD; ambas CDs producen una interacción espontánea, exotérmica e impulsada entálpicamente. Sin embargo, los valores entrópicos para la β-CD son positivos, esto indicaría que los grados de libertad o que el desorden del sistema está aumentando, esta diferencia se puede explicar por la entrada de la IMC a la cavidad de la CD, pero a diferencia de la α-CD, existe otro factor adicional que favorece a un valor entrópico positivo. Se ha reportado que este efecto adicional es debido a efectos de hidratación; los cuales pueden ser asignados la expulsión de moléculas de agua de la interface del complejo o a la salida de moléculas de agua de la cavidad de las CDs [Jelesarov, 1999, Liu, 2008]. Al parecer un mayor número de moléculas de agua son desplazadas fuera de la cavidad en el caso de la β-CD a diferencia de la α-CD. Además debe resaltarse que los valores de ΔH, son más bajos que α-CD, indicación de una menor interacción, debido muy probablemente al incremento de tamaño de la cavidad de la CD.

Al tener contacto la γ-CD y la IMC, se puede notar que las señales de calor experimentales son muy bajas (Fig. 5.28a), aun así, es posible distinguir una diferencia entre la interacción de CD con IMC, que de la interacción CD con buffer. Los valores termodinámicos obtenidos demuestran una interacción espontánea, exotérmica y entrópica, siendo el valor entrópico el que impulsa la interacción. En comparación con las otras CDs nativas, la interacción es más espontánea que la α-CD, pero menor que la β-CD. Los valores de entalpía parecen tener una tendencia a disminuir con el tamaño de la CD, indicación de menos interacciones IMCCD. En contraste, el valor de entropía aumenta con el tamaño de la CD, indicación de mayor



desorden, evidencia de una mayor salida de moléculas de agua de la cavidad al ser sustituidas por la IMC.

Hasta el momento, se puede decir que la mejor CD para incluir a la IMC es la β -CD, por presentar mayor espontaneidad derivada del equilibrio entálpico-entrópico, en comparación con el resto de CDs nativas. En el caso de la α -CD, la inclusión no es tan espontánea, muy probablemente por su tamaño, lo que provoca dificultad para que la IMC se incluya a una profundidad considerable, y que el desplazamiento de moléculas de agua de la cavidad a la solución no sea un efecto considerable, lo que explicaría, en este caso; que el valor entrópico o sólo las interacciones sean las que impulsen la inclusión. En el caso de la γ -CD, la inclusión no es efectiva por la cavidad de gran tamaño que evita a la IMC mantener las interacciones que permitan que la IMC permanezca en la cavidad, de tal manera que no estabiliza al complejo de inclusión. Los efectos entrópico y entálpicos parecen ser los que determinan la espontaneidad o estabilidad de los complejos de inclusión, los cuales parecen ser determinados por las características de la cavidad y la manera de interacción.

Cuando la β -CD presenta grupos 2-hidroxipropilo en su estructura y está presente la IMC, la interacción es espontánea, exotérmica y con valores entrópicos positivos. La interacción está impulsada por el valor entálpico. Los valores entre β - y HP- β -CD son muy parecidos, aunque la β -CD tiende a ser más espontánea, menos exotérmica y más entrópica, lo cual indica que los grupos 2-hidroxipropilo favorecen una mayor liberación de moléculas de agua de la cavidad, por una posible inclusión más profunda dentro de la cavidad por una posible mayor afinidad por IMC.

En el caso de la HP- γ -CD la interacción con IMC se da de manera espontánea, exotérmica y entrópica; siendo esta última contribución la que impulse la interacción. Esto indicaría que la IMC entraría en la cavidad y a su vez saldrían moléculas de agua, sin embargo, la poca interacción con la CD no estabilizaría al complejo de inclusión. Con la γ -CD sucede algo parecido, sin embargo los grupos 2-hidroxilpropilo, hacen que la interacción sea mayor con la CD, pero no permiten que la IMC reemplace más moléculas de agua dentro de la cavidad, provocando que la interacción IMCHP- γ -CD presente valores de $\log K_{1:1}$ mucho más pequeños que todas las CDs estudiadas en este trabajo.



Se sabe que los residuos HP (M. S. 0.6), aumentan el efecto estérico y modifican bloqueando la cavidad, alterando también la rigidez y estructura de las CDs [Schönbeck, 2010; Costas, 1994]. Estos efectos alterarían de manera menos favorable el valor de entalpía en el caso de HP- β -CD y lo contrario sucede con HP- γ -CD en donde el valor de entalpía es mayor; con respecto a sus CDs no sustituidas. De igual manera el valor de entropía se ve afectada por los sustituyentes HP. Un aumento de entropía es observable en el caso de IMCHP- β -CD con respecto a IMC β -CD, que indicaría una mayor salida de moléculas de agua. Pero en el caso de IMCHP- γ -CD; el valor disminuye con respecto a IMC γ -CD. La explicación de estos comportamientos es el tamaño de CD y a la facilidad o dificultad de deshidratar la cavidad debido a la entrada de la IMC. En el caso de HP- β -CD, las interacciones no son tan cercanas lo que permitiría mayores movimientos y mayor salida de agua en comparación con β -CD. Por otra parte, lo que pareciera suceder con la HP- γ -CD es que hay una menor entrada de la IMC en la cavidad, lo que evita la salida de moléculas de agua (por el valor positivo de ΔS) debido a un efecto estérico (debido a un valor más alto de entalpía), en comparación con γ -CD, lo cual impactaría al valor de $\log K_{1:1}$ y al valor de ΔG . El valor de $\log K_{1:1}$ para HP- γ -CD es consistente con el obtenido por UV-Vis, por lo cual el efecto hidrofóbico planteado en el capítulo anterior debido a los grupos HP se debe en mayor medida a efectos estéricos que derivan en mayor hidrofobicidad, que hacen que la IMC con carga negativa sea repelida en este caso.

En el caso de CDs sustituidas, se observa que un mayor tamaño no necesariamente ayudará a que el complejo se vea tan favorecido, esto debido a las interacciones con IMC ya que es posible observar que el valor entrópico es mayor con HP- γ -CD que con HP- β -CD. Este efecto entrópico mayor, no es suficientemente grande para estabilizar al complejo de inclusión.

El tamaño de la CD será el que dictamine la inclusión por permitir el acomodo de la IMC y que las interacciones se den de tal manera que los complejos de inclusión puedan estabilizarse. La sustitución de las CDs por grupos HP ayudará a tener mayores valores entálpicos y/o entrópicos dependiendo de la CD y harán que el ambiente químico sea favorable para la inclusión o sea impactada por efectos estéricos.



Los valores obtenidos por ITC tienen tendencias y valores parecidos a los obtenidos por UV-Vis a pH 7, confirmando que la reacción de inclusión puede ser seguida por medición de la cantidad de luz absorbida o la cantidad de calor que producen los complejos de inclusión o productos formados.

5.5.4. Determinación de las propiedades termodinámicas de la inclusión IMC con CDs por Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC) a pH 7, a diferente temperatura.

Determinación de ΔC_p .

Para la determinación de ΔC_p de la interacción IMC con CD fue necesario determinar los valores termodinámicos ΔG , ΔH y $-T\Delta S$ (o ΔS) [Weber, 1995] a diferentes temperaturas (293.15, 298.15, 303.15 y 308.15 K) los gráficos de la isoterma de dilución y de titulación con su ajuste se observan en las Figs. 5.29-5.33. Los resultados de los mejores ajustes se muestran en las Tablas 5.4-5.8. Se puede observar que los valores de $\log K_{1:1}$ y de ΔG disminuyen en la mayoría de los casos, indicación de que la estabilidad y la espontaneidad de la reacción disminuye al aumentar la temperatura. En el caso de $IMC\alpha$ -CD, el valor de ΔH aumenta con el paso de la temperatura (el incremento de 5 K en temperatura hace más exotérmico el sistema por 2.27 kJ/mol, en promedio), haciendo que la interacción sea más exotérmica, resultado de posibles mayores interacciones [Rekharsky, 1994, Rekharsky, 2006]. Además de que el valor de $-T\Delta S$ incrementa (el incremento de 5 K en temperatura hace menos entrópico al sistema por 2.51 kJ/mol, en promedio), indicación de que el desorden de la reacción disminuye (disminución de libertad conformacional) con la temperatura. En todas las temperaturas, la reacción es impulsada por el valor de ΔH , por lo que se espera que para el complejo $IMC\alpha$ -CD exista más contribución a la estabilidad debido a las interacciones. A pesar de que las contribuciones tanto entálpica como entrópica aumentan en valor con la temperatura, la relación entre ambas no hace que la espontaneidad de la reacción de inclusión aumente. Esto puede deberse a que, en comparación con el ΔH ; el valor de ΔS tiene un incremento mayor con la temperatura. Lo que sugiere que las contribuciones que hacen aumentar al ΔH no aumentan tanto como lo hacen las contribuciones que modifican al ΔS , por lo tanto el complejo no se estabiliza. La mejor



temperatura para incluir a la IMC con α -CD será a 293.15 K ya que habrá una mayor espontaneidad para que el complejo se forme.

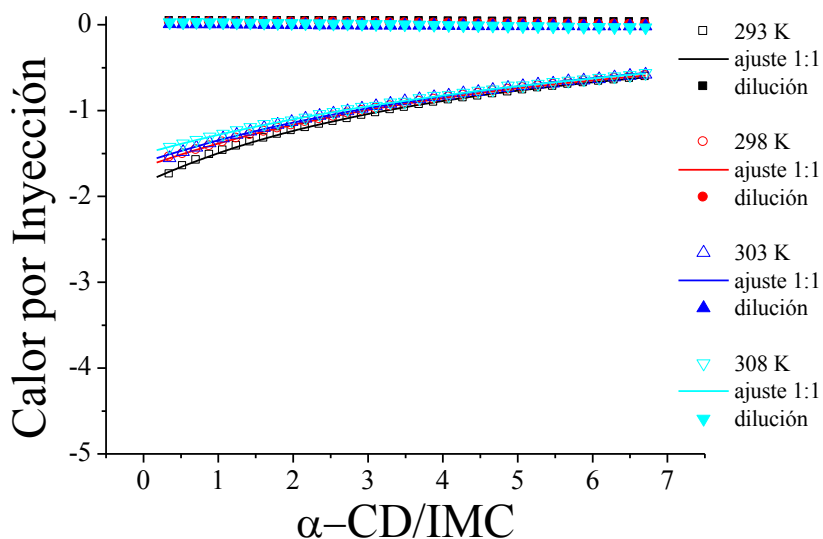


Fig. 5.29. Isotermas de enlace y de dilución de la interacción IMC α -CD a pH 7 y diferente temperatura. La isoterma de enlace ya incluye la resta de la dilución.

Tabla 5.4. Resultados de ITC obtenidos para la interacción de IMC con α -CD a pH 7 y diferente temperatura.

T (K)	logK _{1:1}	ΔG (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)	$-T\Delta S$ (kJ/mol)	ΔS (J/molK)
293.15	$2.20 \pm (5.71 \times 10^{-4})$	$-12.36 \pm (2.59 \times 10^{-4})$	-20.95 ± 0.02	8.58 ± 0.03	-29.28 ± 0.06
298.15	2.17 ± 0.002	$-12.02 \pm (7.66 \times 10^{-4})$	-23.31 ± 0.06	11.29 ± 0.04	-37.86 ± 0.21
303.15	2.081 ± 0.001	$-12.08 \pm (4.96 \times 10^{-4})$	-25.44 ± 0.04	13.37 ± 0.04	-44.09 ± 0.14
308.15	1.978 ± 0.001	$-11.67 \pm (6.42 \times 10^{-4})$	-27.78 ± 0.06	16.11 ± 0.05	-52.29 ± 0.19

El valor de ΔC_p (Tabla 5.9) en el caso de la interacción IMC α -CD es de -452.75 ± 27.25 J/molK, es de los valores más altos negativos, los valores de ΔC_p que reporta Inoue de 1998 para la interacción huésped- α -CD en comparación con otras CDs, suele ser más alto. Este valor indica un gran contacto del ambiente hidrófobo de la CD con la parte más apolar de la IMC [McPhail, 1997; Cooper, 2001], ya que se sabe que entre mayor y negativo sea el valor de ΔC_p habrá una mayor transferencia de grupos hidrófobos a un ambiente á polar.

Se sabe que al incrementar la temperatura, los puentes de hidrógeno se vuelven menos estables y las interacciones hidrofóbicas se mantienen prácticamente sin cambios

[Rekharsky, 1998], lo que podría estar sucediendo en éste caso y por lo tanto, los puentes de hidrógeno se ven afectados entre la α -CD y la IMC, mientras que las interacciones hidrófobas no cambian, por lo que los valores de ΔH no son lo suficientemente grandes para contrarrestar el efecto del incremento del orden del sistema o del ΔS , cuando la interacción se lleva hasta temperaturas de 308.15 K.

Como puede observarse en la Tabla 5.5 los valores termodinámicos de los experimentos de la Fig. 5.30 se modifican con la temperatura al interactuar la IMC con la β -CD.

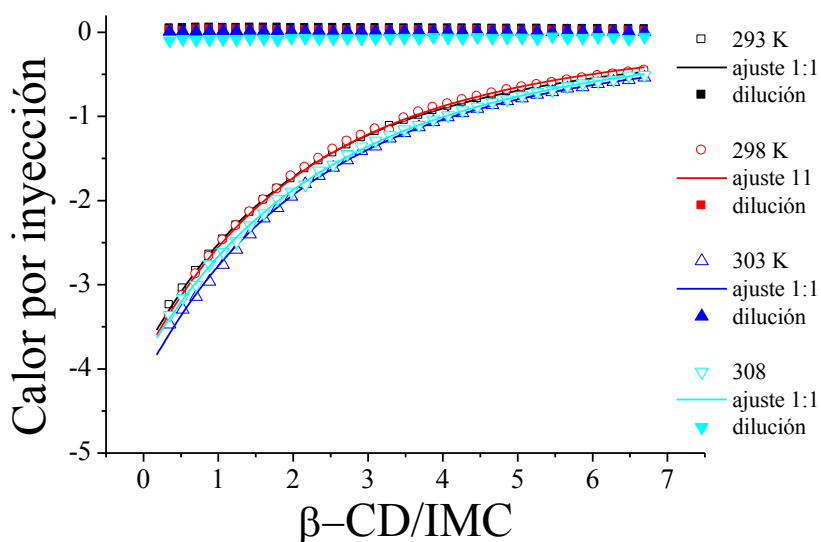


Fig. 5.30. Isotermas de enlace y de dilución de la interacción IMC β -CD a pH 7 y diferente temperatura. La isoterma de enlace ya incluye la resta de la dilución.

Tabla 5.5. Resultados de ITC obtenidos para la interacción de IMC con β -CD a pH 7 y diferente temperatura.

T (K)	$\log K_{1:1}$	ΔG (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)	$-T\Delta S$ (kJ/mol)	ΔS (J/molK)
293.15	$2.79 \pm (3.24 \times 10^{-4})$	$-15.67 \pm (1.22 \times 10^{-4})$	-13.767 ± 0.005	-1.899 ± 0.006	6.48 ± 0.02
298.15	$2.78 \pm (8.72 \times 10^{-4})$	$-15.88 \pm (3.13 \times 10^{-4})$	-14.93 ± 0.01	-0.947 ± 0.003	3.18 ± 0.05
303.15	$2.74 \pm (5.84 \times 10^{-4})$	$-15.88 \pm (2.13 \times 10^{-4})$	-16.411 ± 0.007	0.528 ± 0.002	-1.74 ± 0.02
308.15	$2.70 \pm (5.61 \times 10^{-4})$	$-15.93 \pm (2.08 \times 10^{-4})$	-17.459 ± 0.009	1.527 ± 0.005	-4.95 ± 0.03

Se puede observar que el valor de $\log K_{1:1}$ disminuye y el valor de ΔG de la interacción aumenta, debido al efecto de la temperatura, por lo tanto; la interacción se vuelve menos estable y más espontánea, respectivamente.

Como se puede observar, el valor de ΔH incrementa por cada 5 K en promedio en 1.23 kJ/mol, como α -CD, el valor se hace más exotérmico, pero el incremento es menor. El valor de $-T\Delta S$ disminuye 1.13 kJ/mol por cada 5 K de aumento en temperatura. Además, debe notarse que los valores de $-T\Delta S$ son muy cercanos a cero, se observa un cambio de signo del valor del $-T\Delta S$ cuando la temperatura es mayor o igual a 303.15 K. La relación $\Delta H-\Delta S$ hace que los valores de ΔG sean ligeramente más espontáneos que con la α -CD. La mejor temperatura para incluir a la IMC con la β -CD será a 298.15 K, debido a que será más estable y más espontánea.

En comparación; los valores de β -CD para ΔH son menores (menos exotérmicos) y los valores de $-T\Delta S$ son menores (más entrópicos) que la α -CD. La posible razón de que los valores de ΔH sean menores es debido al tamaño de la cavidad y a la menor interacción que presentan con el residuo de IMC que está incluyéndose. La posible razón del valor de $-T\Delta S$ es el fenómeno de desplazamiento de moléculas de agua de la cavidad por la introducción de la IMC, el cual es más marcado con β -CD que con α -CD, ya que es posible que se relacione a la cantidad de moléculas de agua presentes en la cavidad, pues se sabe que α -CD puede almacenar menos moléculas de agua que β -CD y por lo tanto la interacción de IMC con α -CD tenga valores poco entrópicos o valores de $-T\Delta S > 0$.

El valor obtenido para ΔC_p es de -251.06 ± 48.22 , el cual indica que la IMC interacciona con el ambiente no polar de la β -CD, el valor es menor que con la α -CD, lo que indicaría menos interacciones de IMC con β -CD y que el tamaño de la CD tiene mucha relevancia. La α -CD es más pequeña y por lo tanto se puede pensar que tiene más contacto con la IMC al momento de incluirse, mientras que con la β -CD, el contacto se lleva a cabo pero no es en tal grado como con una CD más pequeña, esto podría confirmar los valores tan grandes de ΔH con α -CD.

En el caso de la γ -CD, se puede resaltar que la interacción con IMC presenta calores por inyección relativamente bajos, en comparación con las CD anteriores (Fig. 5.31). Aún así, fue posible ajustar los resultados experimentales a un modelo 1:1. Los resultados se muestran en la Tabla 5.6.



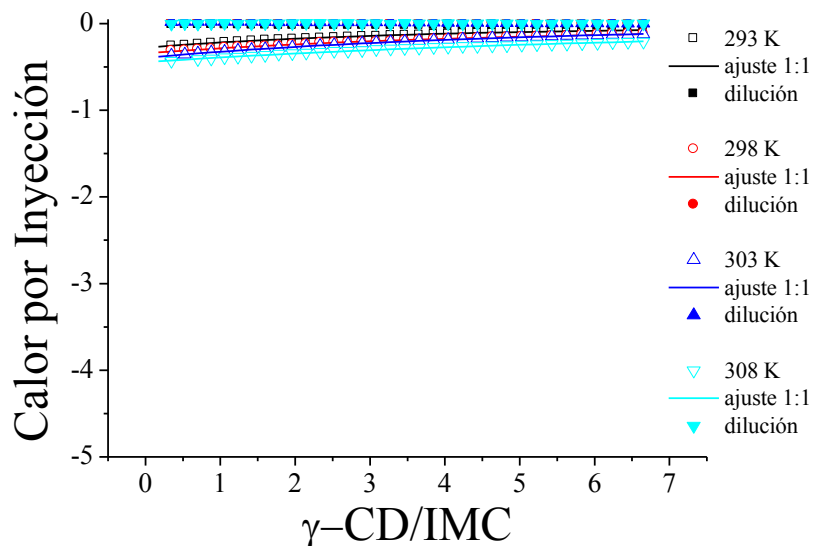


Fig. 5.31. Isotermas de enlace y de dilución de la interacción IMC γ -CD a pH 7 y diferente temperatura. La isoterma de enlace ya incluye la resta de la dilución.

Tabla 5.6. Resultados de ITC obtenidos para la interacción de IMC con γ -CD a pH 7 y diferente temperatura.

T (K)	$\log K_{1:1}$	ΔG (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)	$-T\Delta S$ (kJ/mol)	ΔS (J/molK)
293.15	2.108 ± 0.001	$-11.83 \pm (6.27 \times 10^{-4})$	-4.04 ± 0.01	-7.79 ± 0.03	26.57 ± 0.03
298.15	2.171 ± 0.001	$-12.39 \pm (6.86 \times 10^{-4})$	-4.13 ± 0.01	-8.26 ± 0.03	27.70 ± 0.04
303.15	2.205 ± 0.002	$-12.80 \pm (1.10 \times 10^{-3})$	-4.23 ± 0.02	-8.57 ± 0.03	28.26 ± 0.06
308.15	2.133 ± 0.004	$-12.58 \pm (1.85 \times 10^{-3})$	-4.30 ± 0.03	-8.28 ± 0.03	26.87 ± 0.10

Como puede observarse los valores de $\log K_{1:1}$ y ΔG tienen un aumento al incrementar la temperatura, sin embargo, al llegar a la temperatura de 308.15 K el valor disminuye. Hasta ahora, esta es la única CD con la que se presenta este efecto con la temperatura. Este comportamiento puede atribuirse a las contribuciones de ΔH y ΔS que se modifican con la temperatura.

Los valores de ΔH se incrementan con el valor de la temperatura. En promedio, por cada 5 K de incremento en temperatura hay un incremento de 0.086 kJ/mol.

Además el valor de $-T\Delta S$ es más negativo a medida que la temperatura lo hace, aunque a valores de 308.15 K este comportamiento parece revertirse, en promedio el cambio por cada



5 K es de 0.16 kJ/mol. Los valores de $-T\Delta S$ son los que dirigen la inclusión en todas las temperaturas, además de que presenta el mismo comportamiento que $\log K_{1:1}$ y de ΔG . La mejor temperatura para incluir a la IMC con γ -CD será a 303.15 K debido a una mayor estabilidad y mayor espontaneidad.

El valor obtenido de ΔC_p para la interacción γ -CD es de -17.68 ± 3.61 J/Kmol, el cual es el valor más bajo hasta ahora. Esto indica que con γ -CD, la temperatura no impacta o impacta muy poco a la entalpía. El tamaño parece ser el principal factor para que el valor de ΔC_p sea tan bajo.

En comparación con las CD anteriores; se observa que los valores de ΔH son los más bajos que los de α - y β -CD, es posible pensar que la γ -CD no tiene un buen contacto con la IMC. Los valores de $-T\Delta S$ son de los más positivos, indicativo de una mayor cantidad de desorden en el sistema, derivado muy probablemente a la exclusión de moléculas de agua por la entrada de la IMC, además de mayor movimiento conformacional y por lo tanto, de un mayor grado de libertad que el estado inicial, en donde no se ha llevado a cabo la inclusión.

Los valores de $\log K_{1:1}$ y de ΔG son relativamente parecidos a los obtenidos con α -CD, con la diferencia de que con α -CD, la entalpía dirige la inclusión en todas las temperaturas y con γ -CD, el valor entrópico es el que la dirige en todas las temperaturas. El balance entrópico-entálpico es lo único que explica estas similitudes pues hace que las contribuciones relativas se cancelen entre sí, provocando por tanto que debe existir un balance adecuado para que la inclusión mejore.

Este balance adecuado parece presentarse hasta el momento sólo con la β -CD, ya que los valores entálpicos y entrópicos, se relacionan entre sí para lograr la mejor inclusión, por lo que en el caso de la inclusión de la IMC con β -CD, el balance entre las interacciones hidrofóbicas (puentes de hidrógeno, fuerzas de van der wals etc.) y el desplazamiento de las moléculas de agua serán las que hagan que la interacción mejore.

En resumen hasta ahora, se puede confirmar que el valor de ΔC_p en el caso de la interacción IMCCD con CD nativas (o no sustituidas) está relacionado con el desplazamiento de la IMC del ambiente acuoso de la solución, al ambiente hidrofóbico de la cavidad de la CD. Es posible



observar que en todos los casos la temperatura incrementa el valor de ΔH , debido al incremento de la IMC con las CDs nativas. El tamaño de la cavidad será el determinante de que las interacciones sean mayores o menores.

En el caso de la HP- β -CD (Fig. 5.32 y Tabla 5.7) los valores de $\log K_{1:1}$ y ΔG disminuyen con la temperatura, lo que indica una menor estabilidad y mayor espontaneidad, respectivamente. Los valores de ΔH aumentan 5.08 kJ/mol (por cada 5 K hay un incremento de 1.93 kJ/mol), mientras que los valores de $-T\Delta S$ cambian por 5.09 kJ/mol (por cada 5 K hay un incremento de 2.77 kJ/mol) hacia un mayor orden en el sistema cuando se eleva la temperatura desde 293 a 308 K. En todas las temperaturas, los equilibrios se rigen por su valor de ΔH .

En comparación con la β -CD, se puede observar que los valores de $\log K_{1:1}$ son muy parecidos entre sí, aunque con HP- β -CD los valores numéricos son ligeramente mayores. Al igual que con la β -CD; con la HP- β -CD la inclusión también incrementa en espontaneidad con la temperatura, aunque los complejos de inclusión IMCHP- β -CD, serán más espontáneos. Los valores de ΔH con la HP- β -CD son muy parecidos a los de β -CD, pero los incrementos de ΔH son mayores para la HP- β -CD cuando se aumenta la temperatura.

Los valores de $-T\Delta S$ son más entrópicos en el caso de HP- β -CD, aunque al aumentar la temperatura a 308.15 K se alcanzan valores parecidos a la β -CD, indicación de que con ambas CDs, la contribución de $-T\Delta S$ disminuye y el orden aumenta. Por lo tanto, es posible observar que el sustituir a la CD con grupos HP, los valores de $\log K_{1:1}$ y ΔG en general aumentan, indicación de que el balance entálpico-entrópico mejora. Este balance parece ser mejorado por los valores mayores de $-T\Delta S$ cuando la temperatura es baja. Cuando la temperatura es alta, la contribución entálpica será la que mejore la inclusión ya que los valores de $-T\Delta S$ para β -CD y HP- β -CD son prácticamente iguales.



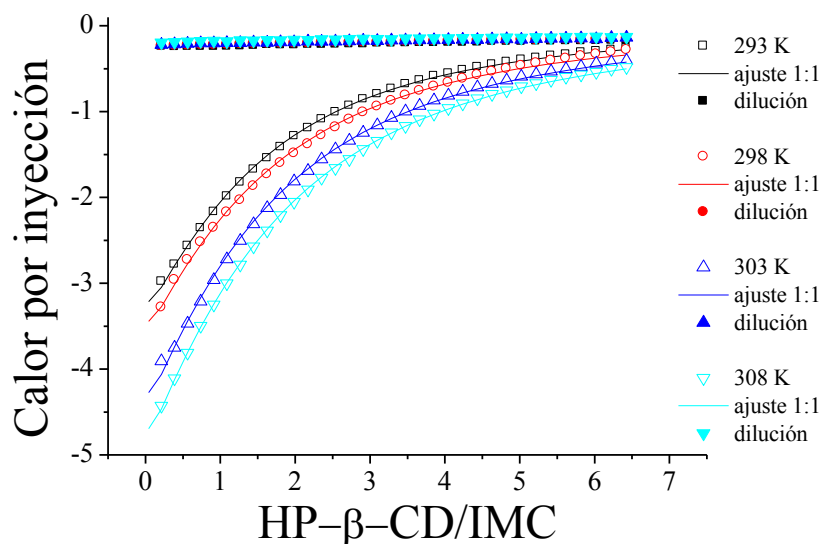


Fig. 5.32. Isotermas de enlace y de dilución de la interacción IMCHP- β -CD a pH 7 y diferente temperatura. La isoterma de enlace ya incluye la resta de la dilución.

Tabla 5.7. Resultados de ITC obtenidos para la interacción de IMC con HP- β -CD a pH 7 y diferente temperatura

T (K)	$\log K_{1:1}$	ΔG (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)	$-T\Delta S$ (kJ/mol)	ΔS (J/molK)
293.15	$2.82 \pm (1.41 \times 10^{-3})$	$-15.84 \pm (4.99 \times 10^{-4})$	-12.26 ± 0.02	-3.57 ± 0.01	12.19 ± 0.06
298.15	$2.78 \pm (6.11 \times 10^{-4})$	$-15.88 \pm (2.19 \times 10^{-4})$	-14.29 ± 0.01	-1.59 ± 0.01	5.34 ± 0.02
303.15	$2.84 \pm (4.70 \times 10^{-4})$	$-16.47 \pm (1.65 \times 10^{-4})$	-16.07 ± 0.01	-0.400 ± 0.001	1.32 ± 0.02
308.15	$2.80 \pm (5.76 \times 10^{-4})$	$-16.54 \pm (2.05 \times 10^{-4})$	-18.06 ± 0.01	1.52 ± 0.01	-4.93 ± 0.03

El valor obtenido de ΔC_p para la interacción de IMC con HP- β -CD es de -383.44 ± 28.84 J/molK, este valor al igual que con las demás CDs indica que hay un desplazamiento e interacción hidrofóbica de la parte hidrófoba de la IMC con la CD. El valor obtenido con HP- β -CD es más grande que con β -CD, pero no tan grande que con α -CD. Esto indica que los residuos HP ayudan a mejorar las interacciones hidrófobas por una mayor y mejor penetración en la cavidad de la IMC.

Se puede notar que en la Fig. 5.33 los valores de calor por inyección de la interacción IMCHP- γ -CD son bajos, en comparación con los demás experimentos con CDs, aún así; fue posible ajustar un modelo 1:1.

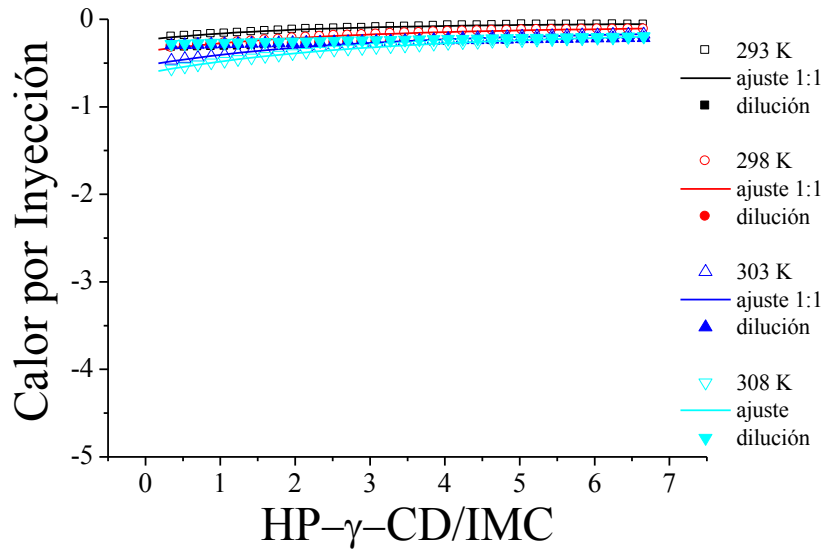


Fig. 5.33. Isotermas de enlace y de dilución de la interacción IMCHP- γ -CD a pH 7 y diferente temperatura. La isoterma de enlace ya incluye la resta de la dilución.

Tabla 5.8. Resultados de ITC obtenidos para la interacción de IMC con HP- γ -CD a pH 7 y diferente temperatura

T (K)	$\log K_{1:1}$	ΔG (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)	$-T\Delta S$ (kJ/mol)	ΔS (J/Kmol)
293.15	2.439 ± 0.005	$-13.69 \pm (2.22 \times 10^{-3})$	-1.49 ± 0.01	-12.20 ± 0.04	41.61 ± 0.05
298.15	2.439 ± 0.002	$-13.92 \pm (6.36 \times 10^{-4})$	-3.30 ± 0.01	-10.62 ± 0.04	35.61 ± 0.03
303.15	2.292 ± 0.001	$-13.30 \pm (4.55 \times 10^{-4})$	-5.36 ± 0.01	-7.94 ± 0.03	26.18 ± 0.03
308.15	2.239 ± 0.001	$-13.21 \pm (4.55 \times 10^{-4})$	-7.13 ± 0.01	-6.08 ± 0.02	19.74 ± 0.04

Los valores termodinámicos derivados del modelo 1:1 para la interacción IMCHP- γ -CD en función de la temperatura, se muestran en la Tabla 5.8. Se puede observar que los valores de $\log K_{1:1}$ disminuyen con el aumento de la temperatura, indicación de disminución de la estabilidad del complejo de inclusión. Los valores de ΔG también disminuyen indicando que la interacción es menos espontánea con la temperatura. Los valores de ΔH incrementan con la temperatura indicación de una mayor interacción IMCHP- γ -CD, mientras que los valores de ΔS disminuyen con la temperatura indicación de una disminución en el orden del sistema, esta contribución es la que tiene mayor impacto en la espontaneidad.



El valor de ΔC_p obtenido para interacción de IMCHP- γ -CD es de -379.76 ± 33.92 J/molK, indicación de que la IMC tiene un desplazamiento hacia las zonas hidrófobas de la HP- γ -CD. Este valor en comparación con γ -CD es mucho mayor, indicativo de que los grupos HP mejoran las interacciones hidrófobas de manera positiva. En comparación con el valor de HP- β -CD, el valor es ligeramente menor, debido al parecer, al tamaño de la CD, aunque parece ser notorio que los residuos HP, tienen una mejor interacción con la IMC cuando la temperatura se incrementa.

En comparación con la γ -CD, la HP- γ -CD presenta valores más grandes $\log K_{1:1}$ así como en los valores de ΔG , siendo los residuos HP las principales razones para el aumento de estos valores. Así como la comparación entre β -CD y HP- β -CD, el balance de las contribuciones entrálpicas-entrópicas serán las que hagan que incremente la estabilidad y la espontaneidad.

Los valores de ΔH debido a las interacciones IMCHP- γ -CD en comparación con las interacción de IMC γ -CD son menores a temperaturas bajas, pero a temperaturas altas los residuos HP mejoran la interacción, esto posiblemente debido a mayor movimiento con la temperatura. En los valores de ΔS , los residuos de HP parecen producir valores muy grandes a bajas temperaturas, pero al incrementar la temperatura los valores llegan a parecerse entre γ -CD y HP- γ -CD, indicación de una posible similitud de grados de libertad. Al igual que con β -CD y HP- β -CD, los grupos HP, mejoran los valores de $-T\Delta S$ a temperaturas bajas para mejorar el balance entrópico-entalpico y a temperaturas altas será el valor de ΔH el que mejore el balance.

Como se pudo observar, un incremento en la temperatura hace mejorar al complejo de inclusión en el caso de la β -CD, γ -CD y HP- β -CD. Mientras que para α -CD y HP- γ -CD la temperatura tuvo un efecto contrario. La temperatura parece tener un efecto mayor en las CDs en donde son importantes las interacciones, esto confirma que la temperatura debilita a las interacciones, mas directamente, a los puentes de hidrógeno.

Para concluir, el análisis de ΔC_p de acuerdo a los datos de la Fig. 5.34 y la Tabla 5.9; de las interacciones IMCCDs, nos permitió observar el efecto que el tamaño de la CD tiene, además de que las interacciones hidrofóbicas no se darán de la misma manera para todas las CDs. En



la Fig. 5.34 se observan claramente las zonas en las que los valores de ΔH se encuentran, de acuerdo al tamaño; mientras mayor el tamaño menor valor de entropía, además de que mientras mayor el tamaño, menos será el incremento del desplazamiento e interacción del residuo hidrofobo de la IMC con las partes hidrófobas de la CD.

Se ha hablado sobre la relación de la cantidad de la deshidratación de las partes hidrófobas de la IMC y de las CDs con un valor negativo de ΔC_p , este fenómeno es observado para todas las CDs parece ser que a mayor contacto más negativo será el valor de ΔC_p . La temperatura hace que los equilibrios de formación de complejo de inclusión IMCCD sean más exotérmicos y menos entrópicos.

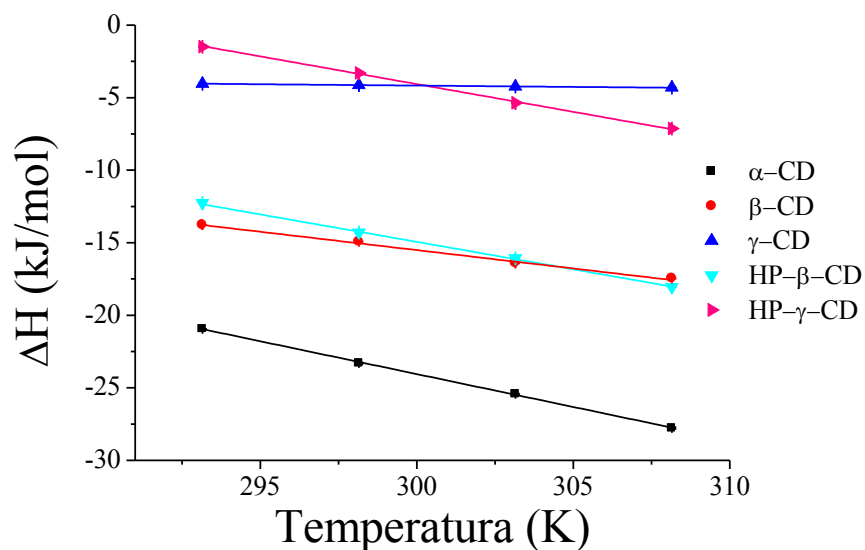


Fig. 5.34. Curvas de la relación del ΔH en función de la temperatura para la determinación del ΔC_p la línea continua señala el ajuste de mínimos cuadrados.

Tabla 5.9. Resultados del ΔC_p obtenidos a partir de las curvas de la Fig. 5.34.

CD	ΔC_p (J/molK)
α	-452.75 ± 27.25
β	-251.06 ± 48.22
γ	-17.68 ± 3.61
HP- β	-383.44 ± 28.84
HP- γ	-379.76 ± 33.92



La relación entre las contribuciones ΔH y ΔS serán las que determinen la espontaneidad y la estabilidad, por el equilibrio de fuerzas que estén presentes e involucradas en la interacción.

Estudio de la compensación entálpica-entrópica.

Como se ha hablado anteriormente, las contribuciones termodinámicas ΔH y ΔS por sí mismas dan indicios de cómo es que la inclusión IMCCD se lleva a cabo. Aunque, es posible señalar que una contribución en particular es la que lleva, dirige o gobierna la interacción; al final el balance será el que determine si una inclusión es espontánea o no. Por lo tanto, vale la pena analizar más profundamente este balance para entender mejor las fuerzas que están involucradas en la interacción y entender mejor el fenómeno de inclusión.

Un efecto entrópico-entálpico debido al cambio de temperatura, es consecuencia de efectos de ΔC_p finitos [Cooper, 1995; 1999]. Cuando hay una compensación entropía-entalpía se observa una correlación lineal [McPhail, 1997]. Es una consecuencia inevitable de perturbación de cualquier sistema en donde existen múltiples fuerzas intermoleculares débiles. Cuando existen rompimientos de enlace, en cualquier sistema [incluyendo el solvente], el sistema será endotérmico $\Delta H > 0$, pero será compensado por una entropía $\Delta S > 0$ que resulta de un incremento en flexibilidad molecular [Cooper, 1999].

La relación lineal de ΔH y ΔS observada experimentalmente lleva a la Ec. 5.3. Donde el coeficiente proporcional β tiene dimensiones de temperatura. De una combinación de la Ec. 5.3 y de la diferencial de la forma de Gibbs-Helmholtz Ec. 5.4 se obtiene 5.5.

$$\Delta H = \beta \Delta \Delta S \quad (\text{Ec. 5.3})$$

$$\Delta G = \Delta \Delta H - T \Delta \Delta S \quad (\text{Ec. 5.4})$$

$$\Delta G = \left(1 - \frac{T}{\beta}\right) \Delta \Delta H \quad (\text{Ec. 5.5})$$

La ecuación 5.5 indica un punto crítico llamado temperatura isocinética o de isoequilibrio (β). La velocidad o constante de equilibrio es totalmente independiente del cambio de entalpía causado por cualquier alteración en sustituyente, solvente, etc. Este fenómeno se ha observado para muchas reacciones y equilibrios [Rekharsky, 1998].



De la relación compensatoria dónde el valor de $T\Delta S$ se relaciona linealmente con el valor de ΔH se obtiene la Ec. 5.6, que al integrarse se obtiene la Ec. 5.7 y la subsecuente combinación con 5.4 se obtiene la Ec. 5.8.

$$T\Delta\Delta S = \alpha\Delta\Delta H \quad (\text{Ec. 5.6})$$

$$T\Delta S = \alpha\Delta H + T\Delta S_0 \quad (\text{Ec. 5.7})$$

$$\Delta\Delta G = (1 - \alpha)\Delta\Delta H \quad (\text{Ec. 5.8})$$

Por lo tanto, la pendiente (α) de la curva $T\Delta S$ contra ΔH (Ec. 5.7) indica cuanto de la ganancia entálpica $\Delta\Delta H$ es cancelada por la pérdida entrópica. Es decir, sólo una fracción ($1-\alpha$) de la ganancia entálpica puede contribuir a la mejora de la estabilidad del complejo. Por otro lado, la intersección ($T\Delta S$) representa la estabilidad del complejo inherente (ΔG) obtenida cuando $\Delta H = 0$, lo cual significa que el complejo se estabiliza inclusive en ausencia de ganancia entálpica, cuando el término $T\Delta S_0$ es positivo. Usando los valores de α y $T\Delta S_0$ como medidas cuantitativas de los cambios conformacionales y desolvatación tanto del anfitrión como el huésped, diversos sistemas químicos y biológicos supramoleculares pueden ser analizados consistentemente, a pesar de las diferencias en interacciones débiles en cada sistema supramolecular [Rekharsky, 1999; 2006].

En la Fig. 5.35 es posible observar como la interacción de la IMC con las diferentes CDs tienen valores característicos. Con la mayoría de las CDs se tiene una compensación lineal de ΔH y de $T\Delta S$, sólo con γ -CD no es lineal. El comportamiento de menor valor de ΔH y $T\Delta S$ parece ser debido a una interacción más rígida [Dunitz, 1995]. Es claro que los valores obtenidos tanto de ΔH y de $T\Delta S$ dependen principalmente al tamaño de la cavidad de la CD.

Cómo se puede observar en la Tabla 5.10 de resultados, los valores de pendiente (α) van desde 0.86-1.11 los cuales son grandes pero concuerdan con los obtenidos para diferentes experimentos con CDs [Rekharsky, 1998]. Los valores de ordenada o $T\Delta S_0$ son muy cercanos entre sí teniendo un valor entre 14 y 14.85, los cuales son comparables a los reportados para CDs y otros huéspedes de ($T\Delta S_0 = 13$ kJ/mol), y de los valores de éteres corona ($T\Delta S_0 = 12$ kJ/mol), éstos valores confirman que la liberación de moléculas de agua que originalmente



residían dentro de la cavidad y la deshidratación inducida de los grupos hidroxilos periféricos de la CD y de la IMC; son conjuntamente responsables de una ganancia entrópica grande.

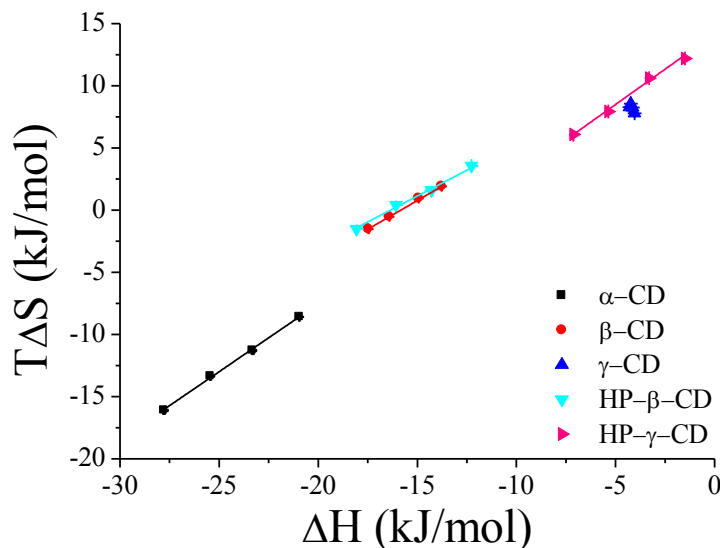


Fig. 5.35. Curvas de la compensación entálpica-entrópica para la interacción IMCCDs, los diferentes puntos se obtuvieron a 295.15, 298.15, 303.15 y 308.15 K

Tabla 5.10. Resultados del análisis de mínimos cuadrados de la compensación entálpica-entrópica para la interacción IMCCDs

CD	Pendiente (α)	Ordenada $T\Delta S_0$ (kJ/mol)
α	1.09 ± 0.11	14.24 ± 2.71
β	0.94 ± 0.11	14.85 ± 1.75
γ	—	—
HP- β	0.86 ± 0.18	14.07 ± 2.71
HP- γ	1.11 ± 0.24	14.00 ± 1.17

El valor obtenido para IMC α -CD de la pendiente o valor α es igual a 1.09 ± 0.11 y de $T\Delta S_0 = 14.24 \pm 2.71$. El valor tan grande de pendiente se puede atribuir a un incremento de cambios conformacionales, esto quiere decir que las componentes entrópicas no son completamente compensadas por las componentes entálpicas, esto concuerda debido a que el tamaño más pequeño y por lo tanto a una interacción más apretada, lo que haría que la IMC tuviera una disminución de movimiento conformacional pero las interacciones no llegan a compensar.



Por otro lado, el valor de $T\Delta S_0$ señala la suposición de tener un valor de $\Delta H = 0$, lo que supodría que no hay interacciones presentes; lo que confirmaría que la desolvatación o incremento de grados de libertad cuando se da el contacto, será lo que ayuda a que el complejo sea estable cuando no existan interacciones presentes [Schönbeck, 2010].

Para la interacción $IMC\beta$ -CD, el valor de pendiente es de 0.94 ± 0.11 , el cual indica que sólo el 6% de la pérdida o ganancia de entalpía ($\Delta\Delta H$) inducida por las alteraciones del sistema se refleja en el incremento neto de la estabilidad del complejo ($\Delta\Delta G$). Este es un resultado del efecto entrópico ($\Delta\Delta S$) cancelador que lo acompaña. Esto quiere decir que el valor entálpico se cancela mas por el mayor efecto entrópico que se presenta. Es más pequeño que el valor obtenido para la interacción $IMC\alpha$ -CD. Por otra parte, el valor de $T\Delta S_0 = 14.85 \pm 2.71$, es un poco mayor que la interacción $IMC\alpha$ -CD indicativo de que será un complejo más estable cuando $\Delta H = 0$, además de una mayor penetración a a la cavidad [Schönbeck, 2010]. Este resultado confirma como la salida de aguas de la cavidad tienen tal impacto como para poder estabilizar el complejo de inclusión. En el caso de la γ -CD no fue posible obtener los valores de pendiente ni de ordenada, debido a que no presentan un comportamiento lineal, es posible que debido a su gran tamaño las interacciones con la IMC no llegan a compensarse de manera directamente proporcional. Se observa que los valores de ΔH parecen ser ligeramente mayores y que las interacciones se debilitan [Cooper, 1999], pero al igual que todas las CDs el valor de $T\Delta S$ disminuye, lo que indica una tendencia a la disminución de grados de libertad.

Cuando la IMC interacciona con HP - β -CD, el valor de pendiente es de 0.86 ± 0.18 , el cual indica que sólo el 14% de la pérdida o ganancia de entalpía ($\Delta\Delta H$), inducida por las alteraciones del sistema, se refleja en el incremento neto de la estabilidad del complejo ($\Delta\Delta G$). Este es un resultado del efecto entrópico ($\Delta\Delta S$) cancelador que lo acompaña. Esto quiere decir que el valor entálpico ganado se cancela aún más por el mayor efecto entrópico comparado con β -CD, por lo tanto el valor es más pequeño que el valor obtenido para la interacción $IMC\alpha$ -CD y que $IMC\beta$ -CD. Por otra parte, el valor de $T\Delta S_0 = 14.07\pm 2.71$, es menor que la interacción $IMC\alpha$ -CD y que $IMC\beta$ -CD indicativo de que será un complejo



menos estable cuando $\Delta H = 0$, en comparación a las CDs nativas. Este resultado confirma que en este caso, el contacto es esencial para poder estabilizar el complejo de inclusión.

La interacción IMCHP γ -CD presenta valores de pendiente de 1.11 ± 0.24 ; es de los valores más grandes obtenidos, esto quiere decir que las componentes entrópicas no son completamente compensadas por las componentes entálpicas. Con el valor de $T\Delta S_0 = 14.00 \pm 1.17$, es posible observar que al considerar un $\Delta H = 0$ el complejo presenta una estabilidad parecida a HP- β -CD. Al parecer las interacciones en este caso también son relevantes para estabilizar al complejo. Para este punto es muy notorio el agrupamiento de las curvas cuando se tienen cavidades similares, así pues se observa, que los valores para estructuras con β -CD, se encuentran a valores de ΔH entre -20 y -10 kJ/mol y $T\Delta S$ muy cercanos a 0 kJ/mol.

Para estructuras con γ -CD los valores de ΔH se encuentran entre -7 y 0 kJ/mol y a $T\Delta S$ mayores a 5 kJ/mol. Para la α -CD se encuentra en valores de ΔH entre -30 y -20 kJ/mol y a $T\Delta S$ menores a 5 kJ/mol. Este efecto de agrupamiento no se observa para diferentes moléculas huéspedes [McPhail, 1997; Schönbeck, 2010]. No se observan cambios en la pendiente que puedan asignarse al tamaño de las CDs, a pesar de que se ha reportado que el valor de pendiente tiende a aumentar cuando la cavidad aumenta [Rekharsky, 1999].

Se observan cambios relacionados a los grupos HP en los valores de $T\Delta S_0$ siendo considerablemente más pequeños cuando las CDs están sustituidas. La compensación entrópica-entálpica nos permitió analizar el efecto de las contribuciones termodinámicas y asociarlas directamente a un efecto determinante para la inclusión. Es posible confirmar: la importancia tan considerable de la cavidad para los valores relativos de ΔH y $T\Delta S$, así como el aumento en las interacciones debido a la temperatura para observar al complejo más rígido o con menos grados de libertad. Además de confirmar la importancia de la desolvatación de ámbos analitos (IMC y CDs) para la formación de los complejos de inclusión. Parece ser una pendiente o valor (α) mayor a 1 no ayuda a la inclusión de la IMC, mientras que un valor menor a 1 mejora la inclusión. Además se puede observar que un aumento o disminución en la cavidad las fuerzas que estabilizan al complejo serán diferentes, por lo tanto se confirma que debe existir un equilibrio entre las fuerzas y un tamaño intermedio de cavidad (entre CDs nativas) para que la IMC se incluye efectivamente.



5.6. Estudios de la interacción de los complejos $M(IMC)_2(H_2O)_2$ en presencia de CDs.

5.6.1. Diagramas de solubilidad de fases de los complejos $M(IMC)_2$ en presencia de CDs.

Para diferenciar las especies en solución de las especies sólidas se utilizará: $M(IMC)_2(H_2O)_2$ para las especies sólidas y $M(IMC)_2$ ($Cu(IMC)_2$ y $Zn(IMC)_2$) para las especies en solución. De la evidencia experimental presentada anteriormente, se propone que los complejos $Cu(IMC)_2$ y $Zn(IMC)_2$, en solución acuosa, son especies mononucleares con dos moléculas de IMC enlazadas al metal central.

Los complejos $CuIMC_2(H_2O)_2$ y $ZnIMC_2(H_2O)_2$ son sólidos insolubles en agua, es bien conocido que las CDs incrementan la solubilidad de moléculas poco solubles. El efecto de las CDs sobre la solubilidad de los complejos $Cu(IMC)_2(H_2O)_2$ y $Zn(IMC)_2(H_2O)_2$ preparados en la sección 5.2, se muestra a continuación. La Fig. 5.36 muestra que la cantidad de los complejos $M(IMC)_2$ en solución es proporcional a la concentración de CD, todas las curvas son lineales con pendientes positivas (Higuchi, 1965). La Tabla 5.11 compila la pendiente, el coeficiente de correlación (de un ajuste de mínimos cuadrados) y el porcentaje de incremento de solubilidad. Asumiendo que sólo existen especies mononucleares presentes en solución la solubilidad de $Cu(IMC)_2$ y $Zn(IMC)_2$ es $S_0 = (3.14 \pm 2.35) \times 10^{-5}$ and $S_0 = (2.49 \pm 1.90) \times 10^{-5}$ M, respectivamente. Estos valores concuerdan con los reportados por Dillon de 2004 y Fini de 2001.

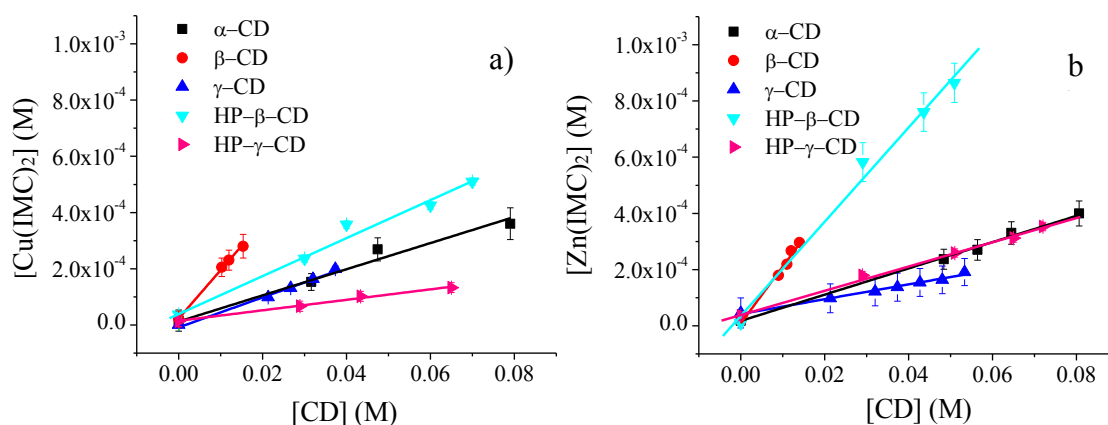


Fig. 5.36. Diagramas de solubilidad de fases para a) $Cu(IMC)_2$ y $Zn(IMC)_2$ en presencia de CDs

En el caso de Cu(IMC)_2 (Fig. 5.36a), el incremento más grande se produce con β -CD; desafortunadamente, esta CD tiene la solubilidad más baja en agua, limitando el incremento de solubilidad de Cu(IMC)_2 . La HP- β -CD tiene mejor solubilidad que la β -CD, favoreciendo grandes cantidades de Cu(IMC)_2 en solución más que con β -CD.

Además de la solubilidad de la CD, parece que existen otros factores que afectan la velocidad del incremento o el aumento de la solubilidad de los complejos $\text{M(IMC)}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ en solución.

Tabla 5.11. Pendiente, coeficiente de correlación y porcentaje de incremento de solubilidad de Cu(IMC)_2 and Zn(IMC)_2 en presencia de CDs.

Cu(IMC)_2 ($S_0=(3.14\pm 2.35)\times 10^{-5}\text{M}$)				
CD	pendiente	% aumento solubilidad	R²	Solubilidad de CDs (g/100 mL water)
HP- β	$(6.60 \pm 0.95)\times 10^{-3}$	1624.37 ± 74.75	0.99	>120.0
α	$(4.50 \pm 2.10)\times 10^{-3}$	1146.62 ± 76.33	0.98	14.5
β	$(16.10 \pm 1.80)\times 10^{-3}$	780.34 ± 78.33	0.99	1.85
γ	$(5.20 \pm 0.90)\times 10^{-3}$	633.82 ± 74.87	0.99	23.2
HP- γ	$(1.90 \pm 0.50)\times 10^{-3}$	423.61 ± 75.86	0.99	80.0
Zn(IMC)_2 ($S_0=(2.49\pm 1.90)\times 10^{-5}\text{M}$)				
CD	pendiente	% aumento solubilidad	R²	Solubilidad de CDs (g/100 mL water)
HP- β	$(16.80 \pm 0.54) \times 10^{-3}$	3474.07 ± 76.92	0.99	>120.0
α	$(4.70 \pm 0.50)\times 10^{-3}$	1608.36 ± 77.31	0.99	14.5
HP- γ	$(4.30 \pm 0.50) \times 10^{-3}$	1419.38 ± 76.62	0.99	80.0
β	$(19.80 \pm 2.30) \times 10^{-3}$	1190.19 ± 76.59	0.99	1.85
γ	$(2.50 \pm 0.20)\times 10^{-3}$	655.41 ± 82.24	0.99	23.2

Por ejemplo, los residuos HP en la HP- β -CD reducen la tasa de incremento de la solubilidad de Cu(IMC)_2 comparada con β -CD. Un efecto similar sucede con HP- γ -CD comparada con γ -CD. Adicionalmente, aunque α -CD y γ -CD tengan una solubilidad más grande que β -CD, la tasa de incremento en la concentración en solución de M(IMC)_2 es pequeña en

comparación a la CD adicionada. Por otra parte, para $Zn(IMC)_2$ (Fig. 5.36b) el mejor resultado en aumentar su solubilidad se tiene con β -CD y HP- β -CD.

Las otras CD muestran capacidades solubilizantes parecidas entre ellas, con pendientes muy cercanas (Tabla 5.11). A diferencia de $Cu(IMC)_2$, parece ser que los residuos HP de las CDs no tienen un efecto sobre la solubilidad de $Zn(IMC)_2$; este hecho parece estar relacionado con la estructura del complejo.

Como ya se ha establecido, el incremento de solubilidad está relacionado con la cantidad de CD en solución, por lo tanto, el orden de incremento de solubilidad de los complejos es el siguiente: HP- β -CD > α -CD > β -CD > γ -CD. Este orden es diferente a la solubilidad de las CDs el cual presenta el siguiente orden HP- β -CD > HP- γ -CD > γ -CD > α -CD > β -CD (Saokham, 2018). El tamaño de la cavidad parece tener cierto impacto en incluir a la IMC ya que al comparar la α -CD con β -CD y HP- β -CD la HP- β -CD presenta una mayor pendiente que α -CD, tanto para $Cu(IMC)_2$ y $Zn(IMC)_2$, sin embargo para γ -CD o HP- γ -CD la pendiente es de las más bajas.

5.6.2. Estudios de EPR de especies solubles de $CuIMC_2$ con CDs.

Debido al incremento de solubilidad de los complejos $M(IMC)_2$ en agua, la técnica de resonancia paramagnética electrónica (EPR, por sus siglas en inglés, ANEXO A4) se usó para identificar las especies mononucleares o dinucleares de las especies solubles de $Cu(IMC)_2$ en un exceso de CD. Las concentraciones altas de CD (como se observa en la Fig. 5.36) ayudan a alcanzar concentraciones en solución de $[Cu(IMC)_2] \approx 1 \times 10^{-4}$ M at pH = 6-7 una concentración que cae dentro de los intervalos de concentración de la técnica de EPR. Los resultados de EPR de la Fig. 5.37 y Tabla 5.12. confirman la presencia de una especie mononuclear de cobre, en solución congelada, en presencia de CDs, los espectros exhiben evidencia de una señal típica cerca de 330 mT para el ion $Cu(II)$ $S=1/2$. Algunas señales de acoplamiento hiperfino ($A_{||}$) se pueden observar para Fig. 5.37b) α -CD y Fig. 5.37e) HP- β -CD. Adicionalmente una mezcla de $CuCl_2$ y $NaIMC$ en relación 1:2 en etanol (EtOH) para tener $[Cu(II)]_{total}=10^{-4}M$, fue preparada para detectar $[Cu(IMC)_2(EtOH)_2]$, sus parámetros se observan en la tabla 5.12. Para todos los espectros se calculó g_{\perp} , para b) y e) se realizó una simulación para calcular los valores de $g_{||}$ y $A_{||}$, estos resultados se observan en Tabla 5.12.



Los valores sugieren una estructura elongada octaédrica con estado basal $d_{x^2-y^2}$ en donde 2 IMCs quelatan al Cu(II) en posición *trans* (Fig. 2.28) y 2 moléculas de H₂O se coordinan en posición axial. Se propone una estequiometría [Cu(IMC)₂H₂O].

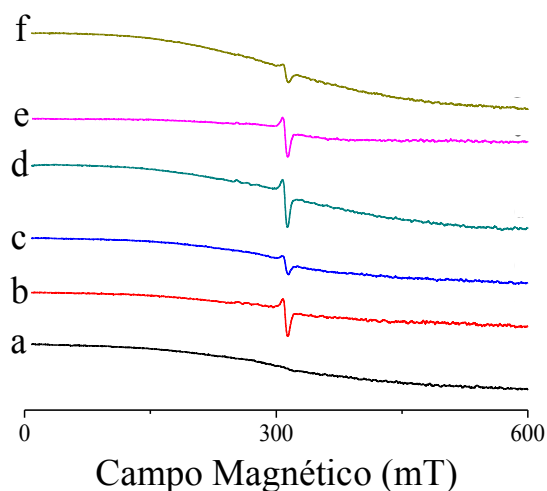


Fig.5.37. EPR spectra of Cu(IMC)₂ in a)H₂O, b)α-CD, c)β-CD, d)γ-CD, e)HP-β-CD, f)HP-γ-CD

Tabla 5.12. Valores de $A_{||}$, $g_{||}$ y g_{\perp} , obtenidos por la simulación de los gráficos de EPR de la Fig. 5.37.

CD	$A_{ }$ (mT)	$g_{ }$	g_{\perp}
α	13.5	2.3880	2.0770
β	—	—	2.0775
γ	—	—	2.0784
HP-β	12.5	2.3880	2.0770
HP-γ	—	—	2.0676
[Cu(IMC) ₂ (EtOH) ₂]	12.5	2.3655	2.0740

5.6.3. Estudio por calorimetría de titulación isotérmica (ITC) de la interacción $M(IMC)_2$ con CDs.

Cuando los complejos $M(IMC)_2$ interactúan con las CD (consideradas como ligantes) pueden interactuar independientemente con cualquiera de los residuos IMC disponibles en el complejo metálico mononuclear (Fig. 2.28). Por lo tanto, para describir el fenómeno de inclusión y los datos experimentales de ITC (Figs. 5.38-5.42) se propone un modelo de ajuste de dos sitios sucesivos independientes y equivalentes, como se presentan en la Ec. 5.9 y Ec. 5.10 [Bouchemal, 2012].

Los parámetros termodinámicos: $\log K_1$, ΔG_1 , ΔH_1 , and ΔS_1 para el primer sitio y $\log K_2$, ΔG_2 , ΔH_2 , y ΔS_2 para el segundo sitio, así como los parámetros globales de la inclusión; β_1 , ΔG_g , ΔH_g and ΔS_g , (Ec. 5.11) se reportan en la Tabla 5.13 for Cu(IMC)₂ and Zn(IMC)₂. De los

resultados de la Tabla 5.13 se puede observar que la inclusión de $M(IMC)_2$ en CDs es un proceso espontáneo independientemente del sitio ($\Delta G_1 < 0$ y $\Delta G_2 < 0$).



Comparando α -CD con β -CD y HP- β -CD, la inclusión global de la primer CD es ligeramente menos espontáneo (este comportamiento es apreciable en la Tabla 5.13). En general, $\Delta G_1 < \Delta G_2$ excepto para $Cu(IMC)_2$ HP- β -CD. Ahora, comparando entre los centros metálicos, $Cu(IMC)_2$ en β -CD es más espontáneo que en HP- β -CD; $Zn(IMC)_2$ se comporta de una manera opuesta, siendo la interacción con HP- β -CD más espontánea que con β -CD.

El fenómeno de inclusión regularmente se discute en términos de contribuciones entálpicas y entrópicas para la energía de Gibbs [Bouchemal, 2012; Rekharsky, 1998, 2006, 2002; Crini, 2014; Cooper, 1999, 2001].

Que una reacción sea impulsada entrópicamente ($|\Delta H| < |T\Delta S|$) significa que los grados de libertad se incrementan en la interacción. Dos efectos competitivos son notorios: la reducción de entropía por el efecto del cambio conformacional de $M(IMC)_2$ después de la inclusión; y el incremento de entropía debido a la liberación de moléculas de agua de la cavidad para contener al complejo $M(IMC)_2$ (Todorova, 2007). Las interacciones hidrofóbicas son impulsadas entrópicamente, donde la entropía (ΔS) de la interacción es grande y positiva y la entalpía es una contribución baja. (Bouchemal, 2012). El incremento de la entropía debido a la liberación de moléculas de agua incrementa con el tamaño de la cavidad de las CDs. Cuando una reacción se impulsa por contribuciones entálpicas ($|\Delta H| > |T\Delta S|$), quiere decir que las interacciones de van der Waals tendrán mayor contribución que las entropías por interacción (Bouchemal, 2012). Los complejos $M(IMC)_2$ poseen importantes fragmentos hidrofóbicos, los residuos aromáticos de los ligantes IMC, que son estabilizados por las cavidades de CDs liberan energía. Además, las moléculas de agua dentro de la cavidad son moléculas con estados energéticos más grandes comparados con las moléculas de agua en el seno de la solución, esta energía también se libera durante la inclusión de $M(IMC)_2$.



Tabla 5.13. Resultados de ITC de la interacción de los complejos $M(IMC)_2$ con CDs

CuIMC₂					
CD(1st site)	logK₁	ΔG₁ (kJ/mol)	ΔH₁ (kJ/mol)	-TΔS₁ (kJ/mol)	ΔS₁ (J/molK)
α	3.35 ± 0.02	-19.093 ± 0.005	-24.41 ± 0.41	5.31 ± 0.41	-17.82 ± 1.38
β	3.27 ± 0.25	-18.67 ± 0.08	-4.40 ± 0.94	-14.26 ± 1.02	47.84 ± 3.42
HP-β	2.85 ± 0.01	-16.260 ± 0.004	-19.89 ± 0.45	3.63 ± 0.45	-12.18 ± 1.52
CD (2nd site)	logK₂	ΔG₂ (kJ/mol)	ΔH₂ (kJ/mol)	-TΔS₂ (kJ/mol)	ΔS₂ (J/molK)
α	2.11 ± 0.02	-12.07 ± 0.01	-152.32 ± 4.65	140.25 ± 4.66	-470.41 ± 15.62
β	2.70 ± 0.47	-15.40 ± 0.17	-5.10 ± 0.95	-10.30 ± 1.12	34.55 ± 3.77
HP-β	3.11 ± 0.03	-17.72 ± 0.01	9.47 ± 0.47	-27.19 ± 0.48	91.21 ± 1.60
CD (global)	logβ	ΔG_g (kJ/mol)	ΔH_g (kJ/mol)	-TΔS_g (kJ/mol)	ΔS_g (J/molK)
α	5.46 ± 0.03	-31.16 ± 0.01	-176.73 ± 5.06	145.57 ± 17.00	-488.23 ± 17.00
β	5.97 ± 0.72	-34.06 ± 0.25	-9.50 ± 1.89	-24.57 ± 2.14	82.39 ± 7.18
HP-β	5.95 ± 0.04	-33.98 ± 0.01	-10.42 ± 0.92	-23.56 ± 0.93	79.03 ± 3.12
ZnIMC₂					
CD(1st site)	log K₁	ΔG₁ (kJ/mol)	ΔH₁ (kJ/mol)	-TΔS₁ (kJ/mol)	ΔS₁ (J/molK)
α	3.41 ± 0.13	-19.44 ± 0.04	-3.67 ± 0.54	-15.77 ± 0.58	52.90 ± 1.96
β	2.99 ± 0.02	-17.09 ± 0.01	-26.22 ± 1.16	9.13 ± 1.17	-30.63 ± 3.92
HP-β	3.39 ± 0.01	-19.371 ± 0.002	-10.44 ± 0.68	-8.93 ± 0.69	29.94 ± 2.30
CD(2nd site)	logK₂	ΔG₂ (kJ/mol)	ΔH₂ (kJ/mol)	-TΔS₂ (kJ/mol)	ΔS₂ (J/molK)
α	2.02 ± 0.19	-11.55 ± 0.10	-62.86 ± 0.88	51.31 ± 0.98	-172.09 ± 3.29
β	2.46 ± 0.06	-14.05 ± 0.02	-7.02 ± 1.20	-7.03 ± 1.22	23.59 ± 4.09
HP-β	2.39 ± 0.01	-13.645 ± 0.003	-38.16 ± 3.48	24.52 ± 3.49	-82.24 ± 11.69
CD (global)	logβ	ΔG_g (kJ/mol)	ΔH_g (kJ/mol)	-TΔS_g (kJ/mol)	ΔS_g (J/molK)
α	5.43 ± 0.32	-30.99 ± 0.13	-66.53 ± 1.43	35.54 ± 1.56	-119.19 ± 5.24
β	5.46 ± 0.08	-31.14 ± 0.03	-33.24 ± 2.36	2.10 ± 0.69	-7.04 ± 4.67
HP-β	5.78 ± 0.01	-33.64 ± 0.01	-48.61 ± 4.17	15.59 ± 4.17	-52.29 ± 13.99



Al analizar las contribuciones entálpicas y entrópicas para ΔG_g se puede observar que la inclusión Cu(IMC)_2 en α -CD es impulsada entálpicamente, en contraste, inclusión en β -CD y HP- β -CD es controlada entrópicamente. Parece ser que las moléculas de agua liberadas de la cavidad son determinantes en la inclusión en β -CD y HP- β -CD en comparación con α -CD, lo cual concuerda con el contenido en la cavidad de la CD antes de la inclusión. Para Zn(IMC)_2 , la entalpía guía la inclusión para las 3 CDs. Se espera que para la α -CD al ser una cavidad pequeña, las interacciones débiles sean mayores o más numerosas, explicando la entalpía tan grande y por lo tanto en comparación con β -CD y HP- β -CD, al tener un mayor tamaño en la cavidad son propensas a tener pocas interacciones (Wenz, 2008, Danil de Namor, 1990, Bouchemal, 2012, Rekharsky, 2002).

La interacción de la CDs con el primer sitio de M(IMC)_2 es un proceso más exotérmico que la interacción con el segundo sitio, excepto para $\text{Cu(IMC)}_2\text{HP-}\beta$ -CD, donde el segundo sitio es más exotérmico que el primero, lo anterior puede explicarse por una posible disminución en interacciones. En cualquier caso esta evidencia nos indica que los sitios no son equivalentes. Respecto a la contribución exotérmica, la interacción de Cu(IMC)_2 con α -CD es más exotérmica que con Zn(IMC)_2 . En contraste, la interacción de Zn(IMC)_2 es más exotérmica que Cu(IMC)_2 con β -CD y HP- β -CD. Esto indica que el complejo con Cu(IMC)_2 presenta mayores interacciones con α -CD, por otra parte; Zn(IMC)_2 presenta mejores interacciones con β -CD y HP- β -CD. Lo anterior puede estar relacionado con diferencias estructurales entre Cu(IMC)_2 y Zn(IMC)_2 .

La contribución entrópica de Zn(IMC)_2 es negativa para las tres CDs. Los complejos de cobre presentan un comportamiento diferente, el cambio de entropía es negativo para α -CD, pero positivo para β -CD y HP- β -CD. Además, la inclusión de Zn(IMC)_2 en α -CD resulta en un ΔS_g menos negativo que con Cu(IMC)_2 . Ahora, para β -CD y HP- β -CD, ΔS_g para Zn(IMC)_2 es negativo mientras que para Cu(IMC)_2 es positivo. Como se ha discutido, el cambio entrópico debido a la inclusión de Cu(IMC)_2 y Zn(IMC)_2 puede ser analizado en términos de dos contribuciones competitivas: la disminución de entropía asociada con la reducción de libertad conformacional del complejo en la inclusión y el aumento de entropía debido a la salida de moléculas de agua de la cavidad, conforme la parte hidrofóbica del complejo ocupa la cavidad de la CD.



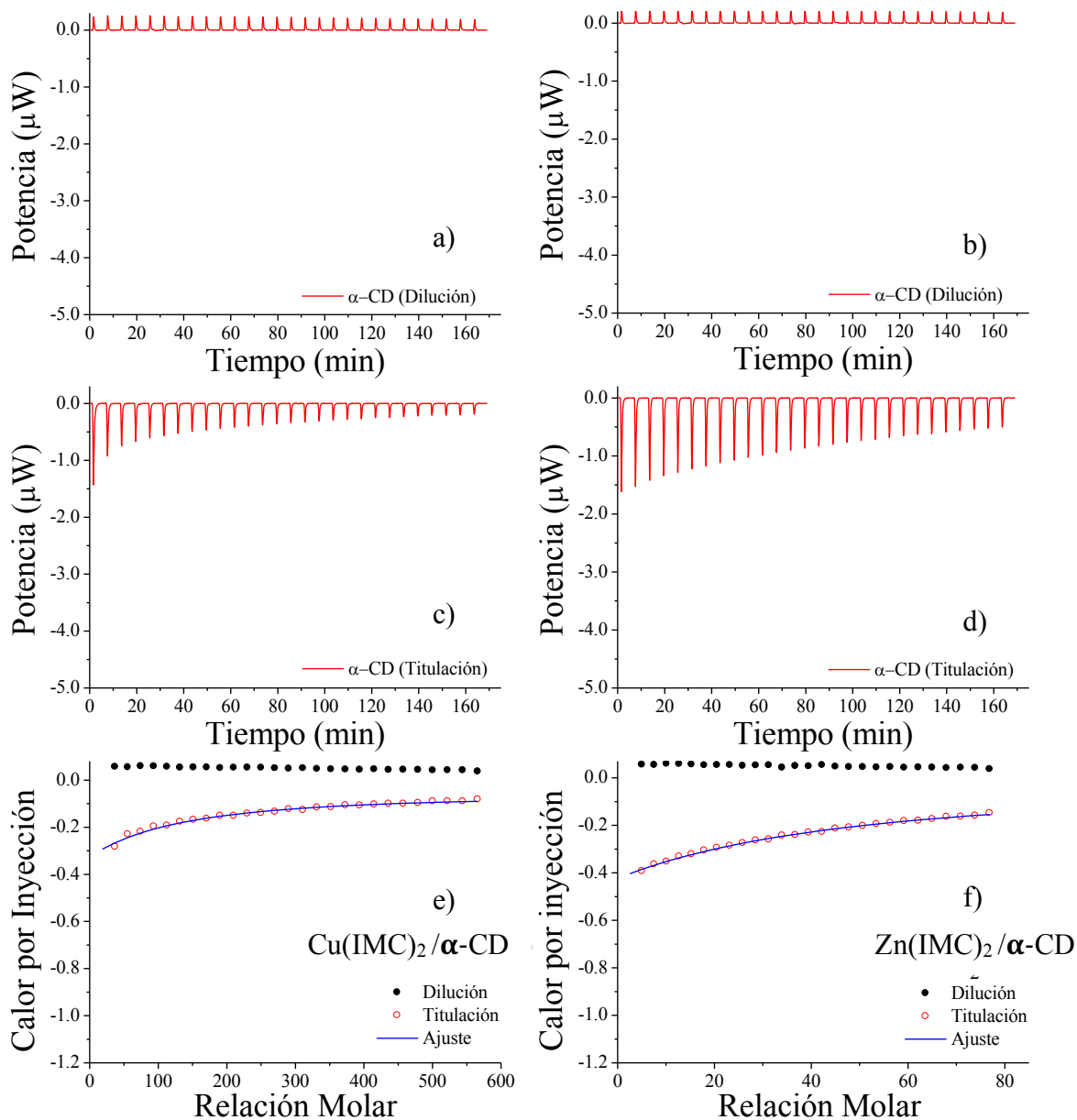


Fig. 5.38. Los gráficos a) y b) muestran los potenciogramas del experimento de dilución; los gráficos c) y d) muestran los potenciogramas de la titulación de α -CD con Cu(IMC)_2 y Zn(IMC)_2 respectivamente. Los gráficos e) y f) muestran los isothermas de enlace obtenidos para la dilución, la titulación y el ajuste al modelo de dos sitios secuenciales independientes..

Por lo tanto, la entropía positiva para la inclusión de Cu(IMC)_2 puede indicar que la reducción en los grados de libertad conformacional de Cu(IMC)_2 es insuficiente para superar la entropía generada por la salida de moléculas de agua. Por otra parte, la entropía negativa, asociada con la inclusión de Zn(IMC)_2 podría explicarse si la disminución en los grados de libertad conformacional del Zn(IMC)_2 excede el incremento en entropía debido a la deshidratación



de la cavidad. Por lo tanto, los resultados en Tabla 5.13 señalaría que la molécula de Cu(IMC)_2 tendría una estructura más rígida que el complejo de Zn(IMC)_2 .

En general, las CDs interactúan con M(IMC)_2 espontáneamente, la manera en que las CDs interactúan con los sitios es de manera independiente y no equivalentes. Se llegó a esta conclusión gracias a la elección de un modelo adecuado para explicar los datos experimentales. La relación entre ΔH y ΔS determina tendencia de formar un complejo de inclusión. Es apreciable que la cavidad de la CD es importante para determinar los valores relativos de ΔH y ΔS , pero también lo es la molécula huésped, la cantidad de interacciones y la libertad conformacional al momento de darse la inclusión.

De los valores obtenidos de $\log K_1$ and $\log K_2$ por ITC (Tabla 5.13), es posible construir diagramas de distribución de especies (Fig. 5.43) para la inclusión de M(IMC)_2 (en sus concentraciones de solubilidad, S_0 en Tabla 5.11) en función de la cantidad de CD adicionada, expresada como $p\text{CD}_{\text{Total}}$ ($-\log[\text{CD}]_{\text{Total}}$). Es notorio que en todos los diagramas la primer especie, $\text{M(IMC)}_2\text{CD}$, no alcanza el 100% de formación, su predominio se encuentra alrededor de $p\text{CD}_{\text{Total}} \approx 3$. El predominio de $\text{M(IMC)}_2(\text{CD})_2$ sucede cuando $p\text{CD}_{\text{Total}} < 2$. Algunas diferencias entre Cu(IMC)_2 y Zn(IMC)_2 se pueden observar. En el caso de los diagramas con α -CD los complejos no muestran muchas diferencias. Para obtener un complejo M(IMC)_2 completamente incluido, menor cantidad de β -CD se necesita con Cu(IMC)_2 que con Zn(IMC)_2 . En el caso de HP- β -CD; el complejo $\text{Zn(IMC)}_2\text{HP-}\beta\text{-CD}$ predominara en un ligero mayor porcentaje que $\text{Cu(IMC)}_2\text{HP-}\beta\text{-CD}$.

Al comparar la CDs se puede observar que el complejo $\text{Cu(IMC)}_2\alpha\text{-CD}$ presentará un mayor porcentaje de predominio que los demás complejos $\text{Cu(IMC)}_2\text{CD}$. Será necesario adicionar menor β -CD y HP- β -CD para alcanzar la formación del 100% (fracción = 1) del complejo $\text{Cu(IMC)}_2(\text{CD})_2$. No se observan diferencias considerables en el caso de β -CD y HP- β -CD con el complejo de CuIMC_2 . El complejo $\text{Zn(IMC)}_2\alpha\text{-CD}$ al igual que $\text{Cu(IMC)}_2\alpha\text{-CD}$ tendrá el mayor porcentaje de predominio que sus similares $\text{Zn(IMC)}_2\text{CD}$. Aunque la CDs que necesitará menor cantidad de CD para formar el complejo $\text{M(IMC)}_2(\text{CD})_2$ con Zn(IMC)_2 serán la β -CD y HP- β -CD. Esto explicaría una mayor solubilidad de los complejos sólidos con estas CDs.



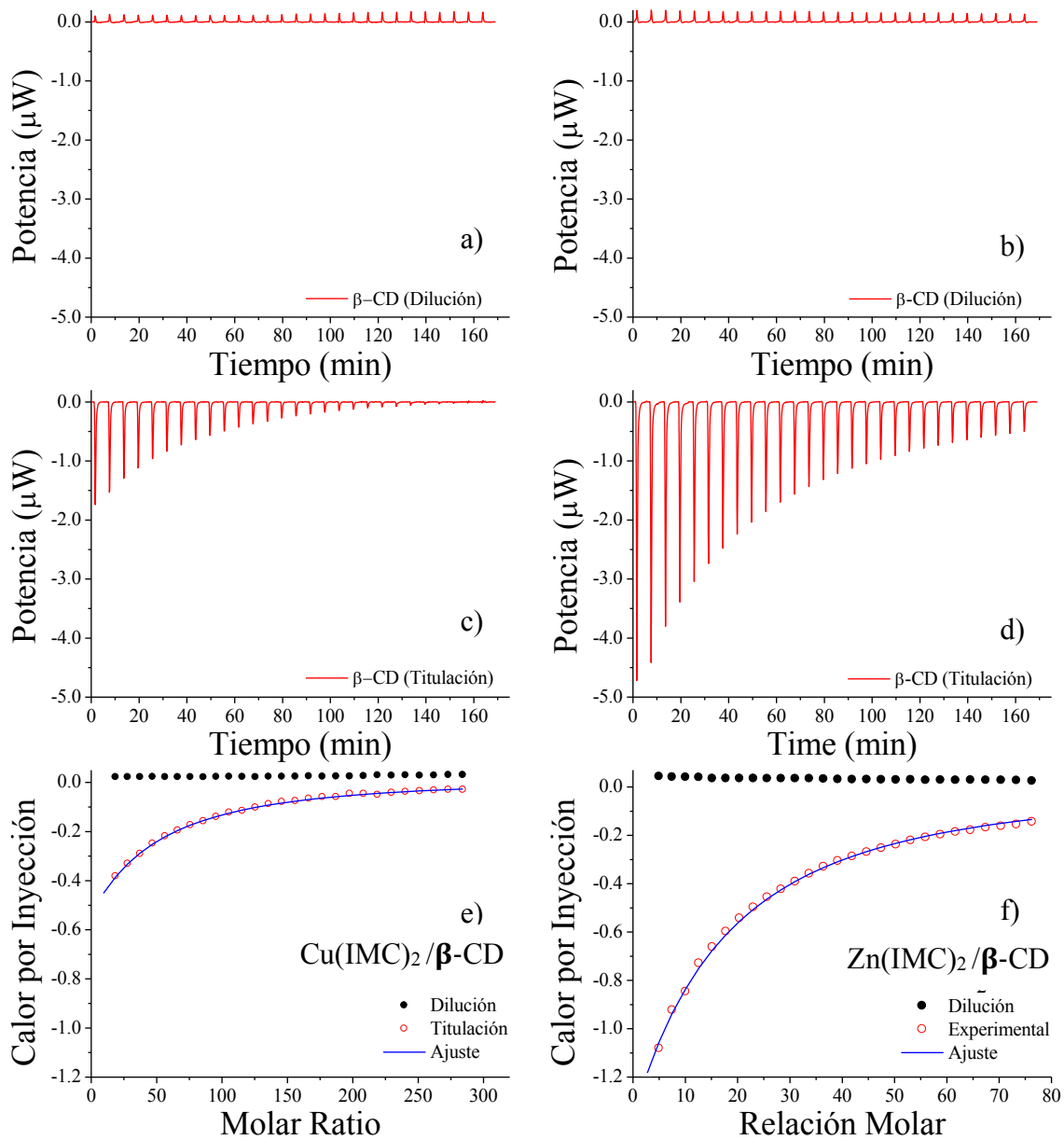


Fig.5.39. Los gráficos a) y b) muestran lospotenciogramas del experimento de dilución; los gráficos c) y d) muestran los potenciogramas de la titulación de $\beta\text{-CD}$ con $\text{Cu}(\text{IMC})_2$ y $\text{Zn}(\text{IMC})_2$ respectivamente. Los gráficos e) y f) muestran los isotermas de enlace obtenidos para la dilución, la titulación y el ajuste al modelo de dos sitios secuenciales independientes.



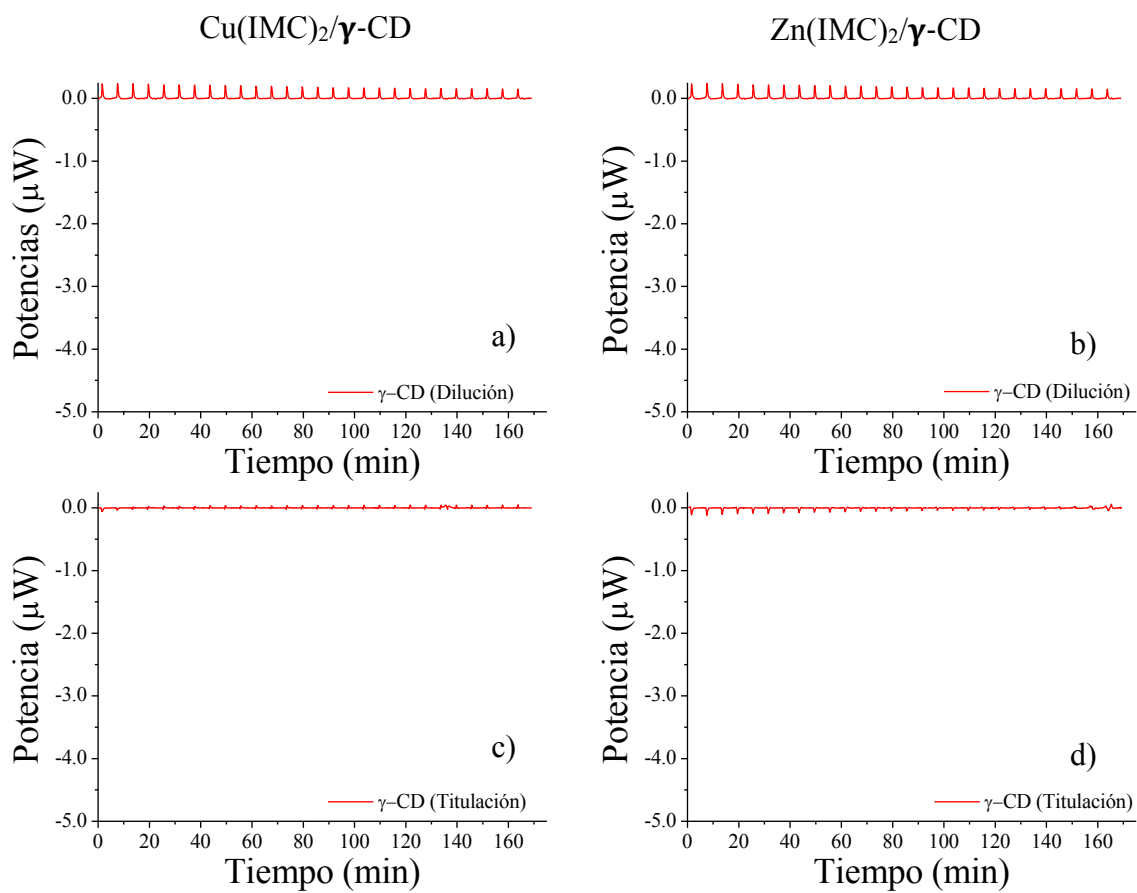


Fig.5.40. Los gráficos a) y b) muestran los termogramas de los experimento de dilución; los gráficos c) y d) muestran los termogramas de la titulación de γ -CD con Cu(IMC)_2 y Zn(IMC)_2 , respectivamente.

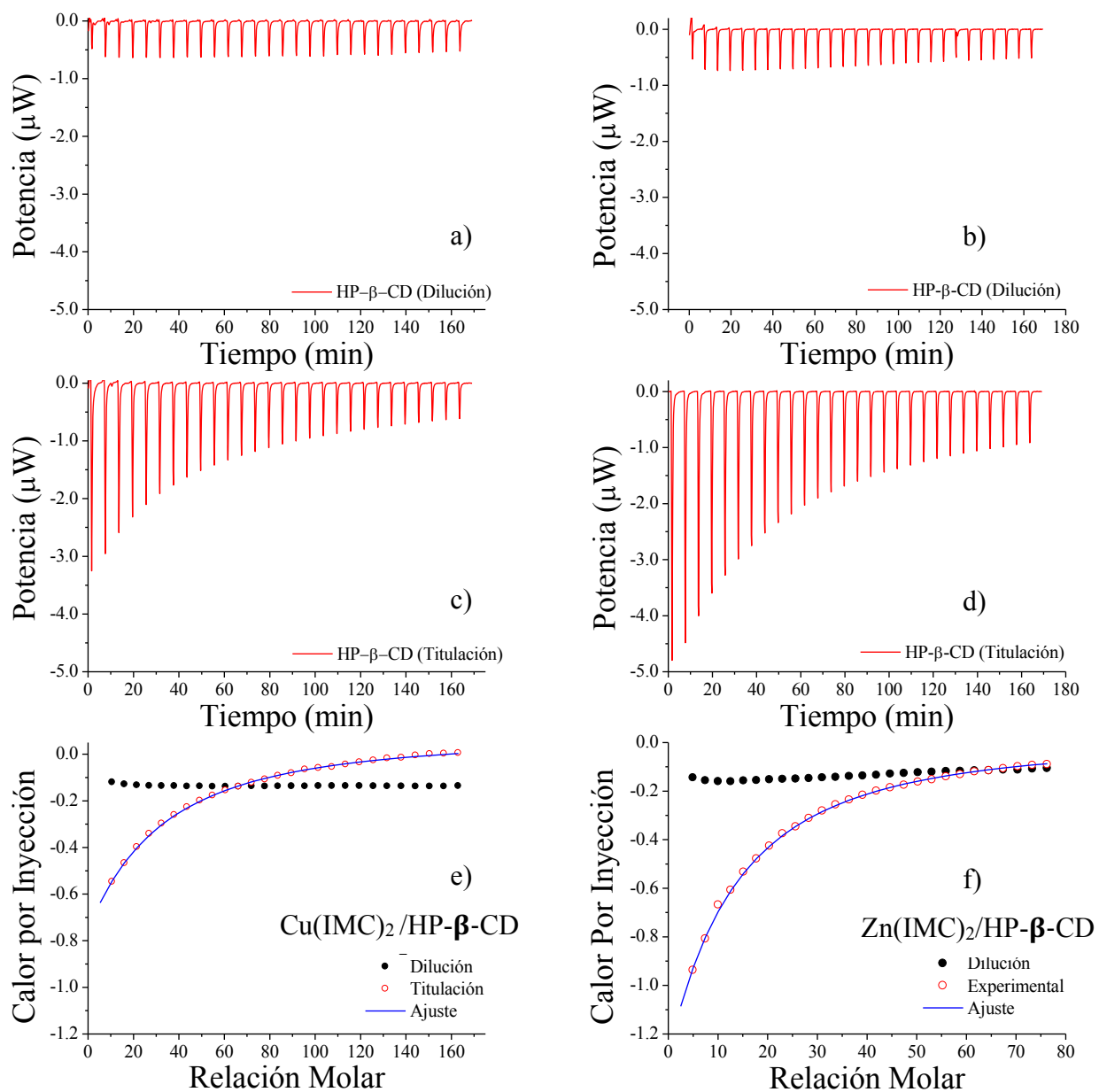


Fig.5.41. Los gráficos a) y b) muestran los termograma del experimento de dilución; los gráficos c) y d) muestran los termogramas de la titulación de HP-β-CD con Cu(IMC)₂ y Zn(IMC)₂ respectivamente. Los gráficos e) y f) muestran los isothermas de enlace obtenidos para la dilución, la titulación y el ajuste al modelo de dos sitios secuenciales independientes y no equivalentes.



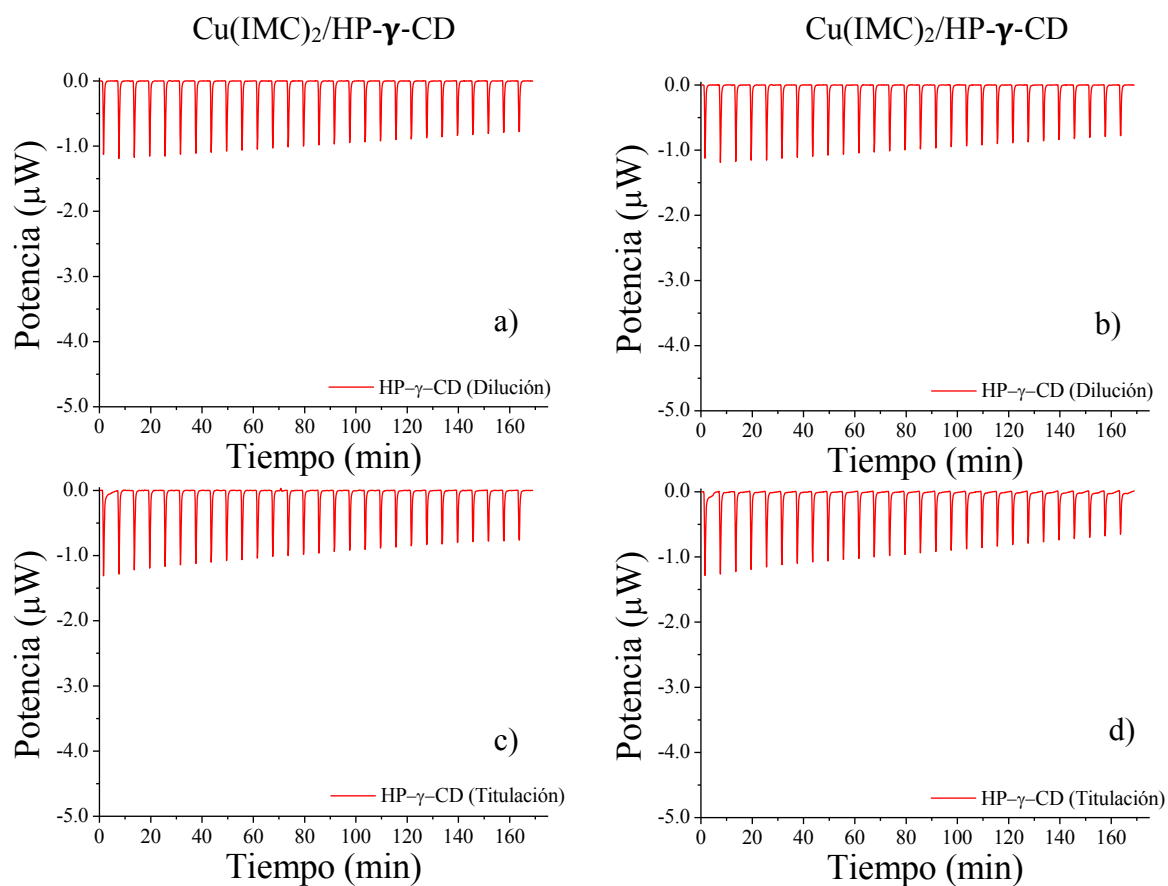


Fig.5.42. Los gráficos a) y b) muestran el termograma del experimento de dilución, los gráficos c) y d) muestran los termogramas de la titulación de HP- γ -CD con Cu(IMC)₂ y Zn(IMC)₂ respectivamente.



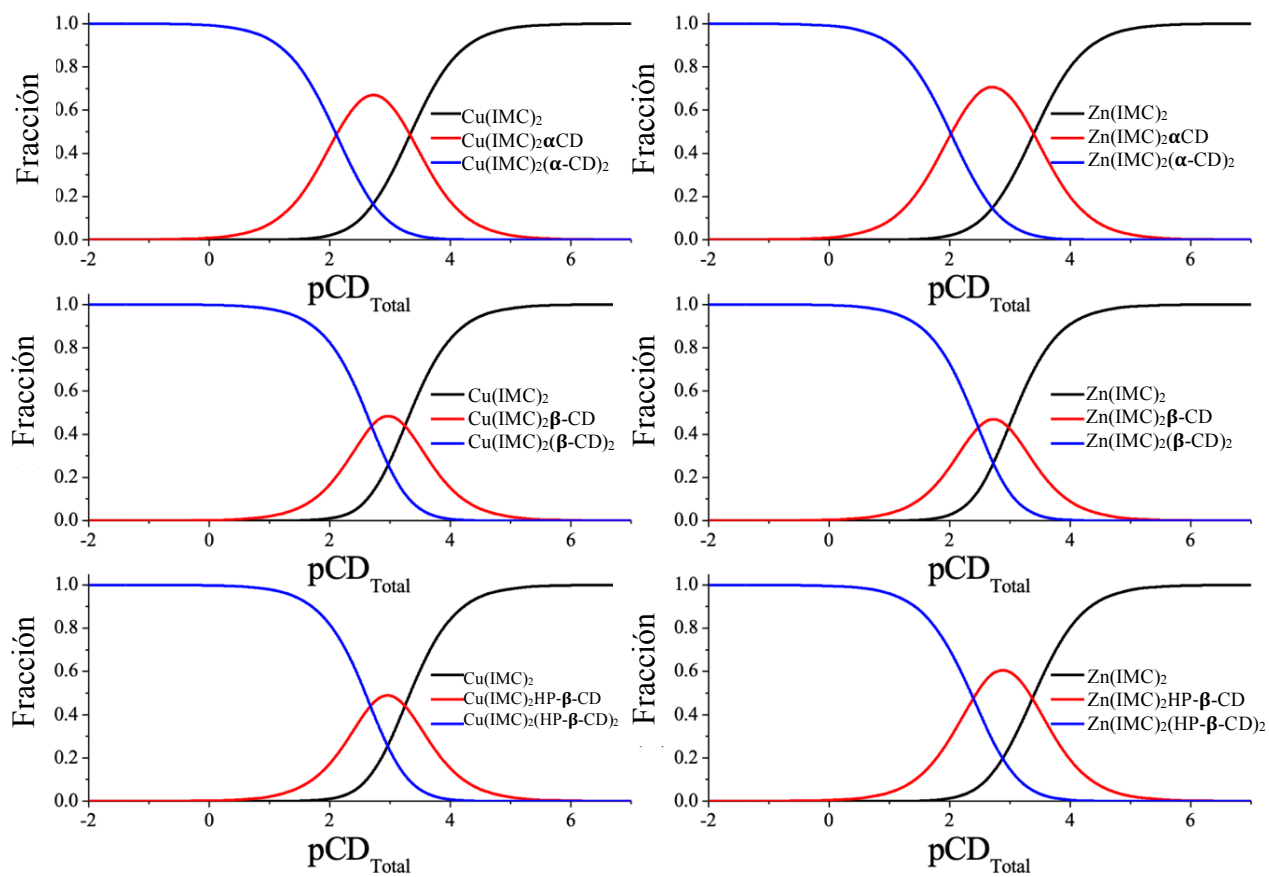


Fig.5.43. Diagramas de distribución de especies de los complejos $M(IMC)_2$ en CDs



6. Conclusiones.



Se logró sintetizar a la sal de IMC ($\text{NaIMC}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) y se caracterizó como un precipitado en hojuelas amarillo pardo, además; con IR, XRPD y RMN se confirmó la formación de un hidrato y la estructura de la IMC^- . Se logró determinar el peso y pureza de la sal $\text{NaIMC}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ como 433.83 ± 0.63 g/mol y $97.4\pm 0.13\%$, respectivamente.

Se determinó que la IMC es estable en solución a $\text{pH} < 7$. Por UV-Vis, Se observan señales de posible formación de dímeros de IMC que pueden asociarse pero no llegan a precipitar, aunque a pH por debajo de 4.5 la precipitación no permite el estudio de IMC en solución. Se determinó, que la IMC es poco estable a valores de pH básicos, observando cambios en los máximos de absorbancia y por lo tanto, una descomposición de la molécula considerable, debido al rompimiento de la amida presente en la molécula.

Se confirmó, por UV-Vis el pK_a de la IMC, refinando un valor de pK_a de 4.52 ± 0.06 . La especie HIMC predominará antes del pH 4.5 y la especie IMC^- predominará pH mayor de 4.5.

Fue posible determinar las propiedades termodinámicas de la inclusión IMC con CDs con 5 CDs diferentes, por UV-Vis e ITC, con lo cual se puede concluir lo siguiente: La IMC se incluye con una sola molécula de CD muy probablemente por el residuo p-clorobenzoilo de la IMC. La IMC tiene mayor preferencia por la β - y HP- β -CD; mientras que con el resto de las CDs la afinidad es menor. El tamaño de las CDs tiene un impacto en la afinidad por la IMC. El tamaño de la cavidad tiene un efecto favorable al pasar de la α -CD a la β -CD, pero al pasar de la β -CD a la γ -CD la afinidad no mejora. El cambio de pH de 5 a 7 hace que la inclusión mejore sólo con α -CD y HP- β -CD, en los demás casos la inclusión se ve afectada, lo que indica que la afinidad por IMC^- es mejor para α -CD y HP- β -CD. En las demás CDs, la afinidad es mayor por HIMC.

A partir de los valores de ΔH y ΔS , obtenidos por ITC, se logró entender que la inclusión dependerá de dos razones principalmente; las interacciones no polares que pueden llevarse a cabo y el cambio de libertad conformacional debido a las moléculas de agua desplazadas del centro de la cavidad. El equilibrio de las fuerzas moleculares anteriores, serán las que faciliten la inclusión. Por lo anterior, la fuerza que mayor impacto tiene en el caso de la IMC



con CDs es el contacto y formación de interacciones no polares y puentes de hidrógeno. El efecto de salida de moléculas de agua de la cavidad comienza a ser considerable al aumentar el tamaño de las CDs, aunque las interacciones se ven afectadas. El mejor equilibrio de fuerzas se logra con la β -CD y la HP- β -CD.

Se estudió el efecto que tiene la temperatura en las propiedades termodinámicas, determinadas por ITC, en la inclusión IMC con CDs, en general los valores de $\log K_{1:1}$ ó ΔG , disminuyen haciendo que los complejos sean menos estables y menos espontáneos, se observa que el fenómeno es más exotérmico y con menos grados de libertad para todas las CDs.

Se logró determinar el valor de ΔC_p , obtenido por ITC a diferente temperatura, para las interacciones IMC con CDs, observando que en todos los casos el valor es negativo indicación de que para todas las CDs la IMC presenta una interacción mayoritaria con las zonas hidrófobas de la CD además de una desolvatación de los grupos en donde se lleva a cabo la interacción. El valor más grande se obtiene con α -CD (-452.75 ± 27.25 J/molK) y el menor con γ -CD (-17.68 ± 3.61 J/molK). El sustituir a las CDs ayuda a que los valores de ΔC_p se incrementen en comparación a las CDs no sustituidas.

Los complejos en sólido $M(IMC)_2(H_2O)_2$ se sintetizaron a partir de la sal de indometacina. La caracterización, de los sólidos preparados, por IR brindó señales de especies CuIMC y ZnIMC quelato o puente, donde la IMC enlaza el metal a través del grupo carboxilato. Los estudios de EPR para CuIMC y de XRPD para ZnIMC, respectivamente, permitieron identificar especies mononucleares. Las especies puente se pueden descartar, por lo tanto, las especies propuestas para este trabajo son $[Cu(IMC)_2(H_2O)_2]$ y $[Zn(IMC)_2(H_2O)_2]$ en estado sólido.

Se determinó la solubilidad de los complejos para $Cu(IMC)_2(H_2O)_2$ y $Zn(IMC)_2(H_2O)_2$, por UV-Vis, las cuales fueron $(3.14 \pm 2.35) \times 10^{-5}$ y $(2.49 \pm 1.90) \times 10^{-5}$ M, respectivamente. Se demostró que la solubilidad de los complejos de Cu(II) se incrementa $\approx 500\%$ con HP- γ -CD y hasta $\approx 1700\%$ con HP- β -CD, mientras que la solubilidad de los de Zn(II) aumenta $\approx 700\%$ con γ -CD y hasta $\approx 3500\%$ con HP- β -CD; la CD que mejor solubilizó a los complejos $M(IMC)_2(H_2O)_2$ fue la HP- β -CD, siendo mayor el efecto para $Zn(IMC)_2(H_2O)_2$ que para



$\text{Cu}(\text{IMC})_2(\text{H}_2\text{O})_2$. El orden de poder solubilizante de los complejos $\text{M}(\text{IMC})_2(\text{H}_2\text{O})_2$ con CDs es: $\text{HP-}\beta\text{-CD} > \alpha\text{-CD} > \beta\text{-CD} > \gamma\text{-CD}$.

El aumento de solubilidad, permitió estudiar las especies presentes en solución del complejo de cobre por EPR, se confirmó la presencia de una especie mononuclear de cobre, donde 2 moléculas de IMC forman un complejo quelato de posible estequiometría $\text{Cu}(\text{IMC})_2(\text{H}_2\text{O})_2$. En analogía con este complejo de Cu, se propone que el complejo de Zn tenga la estequiometría $\text{Zn}(\text{IMC})_2(\text{H}_2\text{O})_2$.

Con las posibles estequiometrías en solución, se estudió la termodinámica de la interacción de los complejos $\text{M}(\text{IMC})_2$ con CDs por ITC. Se propuso un modelo de dos sitios de enlace secuencial, con el cual se determinaron los valores de ΔG , ΔH , ΔS para cada sitio y el valor global. La termodinámica con el modelo propuesto indica que los sitios de enlace de los complejos $\text{M}(\text{IMC})_2$ son independientes y no equivalentes, con valores distintos entre ellos. La interacción de los complejos $\text{M}(\text{IMC})_2$ con CDs es espontánea. El primer sitio siempre es más espontáneo que el segundo sitio. El aumento en la cavidad entre $\alpha\text{-CD}$ y $\beta\text{-CD}$, mejora la espontaneidad. Los valores de espontaneidad dependerán del equilibrio entálpico entrópico que se genere debido a todas las fuerzas inter e intra moleculares que intervienen en la inclusión. De esta manera se observa que para $\alpha\text{-CD}$ la contribución entálpica será la que predomine para ambos complejos, esto debido a una inclusión más justa. En el caso de $\beta\text{-CD}$ y $\text{HP-}\beta\text{-CD}$ con $\text{Cu}(\text{IMC})_2$, la contribución entrópica será la que dicte la manera de inclusión, por otra parte la interacción de $\beta\text{-CD}$ y $\text{HP-}\beta\text{-CD}$ con $\text{Zn}(\text{IMC})_2$ es dirigida por la contribución entálpica. El comportamiento anterior sugiere una diferencia estructural entre los complejos de $\text{M}(\text{IMC})_2$, en donde el complejo de $\text{Zn}(\text{IMC})_2$ presenta más libertad conformacional. Los diagramas de distribución de especies confirman la necesidad de usar cantidades muy altas de CD ($p\text{CD}_{\text{Total}}$ bajas) para el predominio de un complejo completamente incluido ($\text{M}(\text{IMC})_2(\text{CD})_2$).



Artículos publicados.





Interaction of indomethacin–cyclodextrins in water by UV–Vis and ITC

Adrián Ricardo Hipólito-Nájera¹ · María del Rosario Moya-Hernández¹ · Alberto Rojas-Hernández² · Rodolfo Gómez-Balderas¹

Received: 28 August 2018 / Accepted: 3 May 2019 / Published online: 30 May 2019
© Springer Nature B.V. 2019

Abstract

In this contribution, we analyze indomethacin–cyclodextrin (IMC–CD) inclusion by means of UV–Vis spectrophotometry and isothermal titration calorimetry (ITC) at 25 °C. Experiments were carried out in water at pH 5 and 7, using β -CD and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (2-HP- β -CD). The study with UV–Vis was made using a molar relation method analyzing the spectra with Stability Quotients from Absorbance Data (SQUAD) to obtain the inclusion constants. In the case of ITC, the study was performed in aqueous-phosphate buffer at pH 7. The values of ΔG , ΔH , $-\Delta S$ were determined for the first time for the inclusion of IMC within β -CD and 2-HP- β -CD. Results for $\log K_{1:1}$ obtained by ITC agree reasonably with those determined by UV–Vis, confirming the formation of a complex of stoichiometric ratio IMC:CD of 1:1. Besides the confirmation of formation of the inclusion complex, inclusion is exothermic, and given the sign of entropy it is suggested that IMC inclusion is driven by release of water molecules from the cavity of CD. With the values of $\log K_{1:1}$ we construct the diagrams of species distribution to compare which CD performs better in including IMC.

Keywords Non-steroidal anti-inflammatory drugs · Indomethacin/cyclodextrin complexes · Stability constants

Introduction

Indomethacin (IMC) is a non-steroidal analgesic, antipyretic and anti-inflammatory drug (NSAID), molecular formula $C_{19}H_{16}ClNO_4$ and chemical name 2-[1-(4 chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methylindol-3-yl]acetic acid, a member of the arylalkanoic acid family (Fig. 1), it has high permeability to pass through the intestinal membrane and low solubility in aqueous media. IMC is prescribed for rheumatoid arthritis, osteoarthritis, acute gouty arthritis, bursitis, etc. However, it has been documented that long term treatment has

several secondary effects such as gastrointestinal bleeding, abdominal pain, heartburn, nausea, stomatitis, dizziness, drowsiness, insomnia, psychic disturbance, incontinence, prolonged bleeding time, blood dyscrasias, rashes and headache [1]. The therapeutic and adverse event profiles of IMC are caused by the inhibition of cyclooxygenase (COX) that decreases the production of prostaglandins (PGs) of arachidonic acid [2]. Given that therapeutic use of IMC is extensive and distribution of the drug in the body depends on its physicochemical properties [3], the study of IMC in aqueous solution is fundamental [4]. However, physicochemical information about IMC in water is limited due to its low solubility (<0.01 mg/ml) [4–10].

An increased solubility of Indo assisted by cyclodextrins (CDs) has been observed [11–14] this observation has been taken as evidence of the formation of an IMC–CD inclusion complex. IMC can occupy the cavity of the CD, which is about 0.78 nm in diameter [15], through the chlorobenzoyl moiety which is roughly 0.48 nm wide, other approaches of IMC exposes a fragment that is wider than the cavity diameter. Having a pKa of 4.5 [1, 16], IMC anion (Indo⁻) is able to coexist with the protonated form (HIndo) in biological fluids. Moreover, given the pH of solutions, the anionic form of IMC is the most abundant species; therefore, the less polar

Adrián Ricardo Hipólito-Nájera, María del Rosario Moya-Hernández, Alberto Rojas-Hernández and Rodolfo Gómez-Balderas have contributed equally to this work.

✉ María del Rosario Moya-Hernández
rosariomoya@gmail.com

¹ Laboratorio de Fisicoquímica Analítica, Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli 54700, Estado de México, Mexico

² Departamento de Química, Área de Química Analítica, UAM-Iztapalapa, Apdo. Postal, 55-534, Iztapalapa Mexico City, Mexico



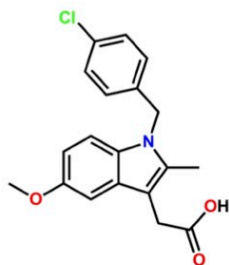


Fig. 1 HIIndo molecular structure

region of the IMC molecule (the chlorobenzoyl fragment) is the most prone to occupy the CD cavity of hydrophobic nature [17]. In consequence, the chemical model that can account for the formation of an inclusion complex is of 1:1 stoichiometry, as represented in Eq. 1.



CDs are macrocycles of toroidal shape built from monomeric units of glucopyranose, β -cyclodextrin (β -CD) comprises 7 glucopyranose units [15] (Fig. 2a). CDs possess a hydrophobic cavity and a hydrophilic outer, these structural features are responsible for the use of CDs as solubilizing low water solubility chemicals [18]. An important aspect

is the low toxicity of CD toward humans [18]. The CDs have been used as protein and enzyme models due to similar interactions with many substances [19]. 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (2-HP- β -CD) is a modified CD, which includes seven glucopyranoside fragments containing hydroxypropyl groups in the sixth position [20, 21] (Fig. 2b). 2-HP- β -CD presents higher solubility in water than β -CD provided by hydrophilic alcohol groups [22]. Moreover, there exist up to three substitution position in each glucopyranoside unit, a molar substitution index (MS) indicates the average number of hydroxyalkyl groups per glucose unit. Substitution degree strongly affects the properties of the CD, the lower MS the better solubilizer [15, 18–22]. It is well known that CDs highly increase IMC water solubility by forming an inclusion complex [11–14]. However, values of inclusion constants have been determined under a variety of experimental conditions that makes their applicability difficult in the pharmaceutical context.

UV–Vis is a common technique to perform chemical speciation studies of complexes in solution, absorbance data are recorded and then fitted to a chemical model, which contains a series of complexation equilibria established between species in the system. Although equilibrium constants, or Gibbs energies (ΔG), and stoichiometric ratio can be obtained by means of these procedures, important thermodynamic quantities such as reaction enthalpies and entropies (ΔH and ΔS) are only attainable if the experiments are performed

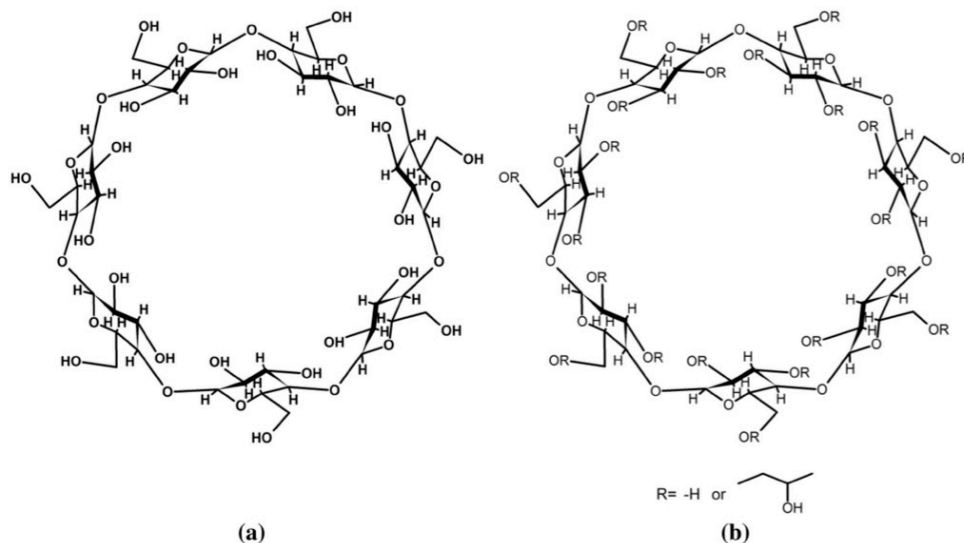


Fig. 2 a β -cyclodextrin and b 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin structure



at different temperatures [20]. On the other hand, isothermal titration calorimetry (ITC) allows measuring the heat resulting from the interaction of species in solution, heat is liberated or absorbed as a result of the redistribution of non-covalent bonds, for example, when the interacting molecules go from the free to the bound state. By applying ITC, the values of ΔH , ΔS and ΔG (expressed as dissociation constants K_D), number of binding sites and stoichiometric ratio are estimated from experimental data of heat [23]. Developments in ITC instrumentation allows detection sensitivities in the order of μJ ; therefore, intermolecular weak interactions as those present in inclusion phenomena are readily revealed by this analytical technique [24]. In fact, ITC has been applied to study drug-CD inclusion complexes with remarkable results [25].

This study aims to provide valuable information, in the context of pharmaceutical formulations, on biologically active compounds with improved water solubility and low toxicity, namely thermodynamic parameters and relative stabilities of IMC-CD inclusion complexes. As IMC species are pH-dependent, it is desirable to perform studies at different pH values [26].

Materials and methods

Materials

Reagents

IMC, β -CD, 2-HP- β -CD (MS=0.6) were purchased from Sigma Aldrich, concentrated hydrochloric acid (Química Meyer), sodium chloride (analytical grade, Reactivos y Productos Químicos Finos, México), sodium hydroxide (analytical grade, Química Meyer), anhydrous dibasic sodium phosphate (ACS grade, Fermont), IMC salt ($\text{NaIMC}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (synthesized and characterized in the laboratory according to [27]).

Equipment

Ohaus PA214 Pioneer Balance (± 0.0002 g). Combined pH/conductivity meter (Seven-Multi S47, Mettler Toledo), pH electrode (HACH), deionizer (Pure Lab Classic, $\rho = 18.2$ M Ω cm). Spectrophotometer Lambda 35 (Perkin Elmer), MicroCal VP-ITC (G. E. Healthcare). Volumetric flasks: 250.00 ± 0.12 mL, 50.00 ± 0.10 mL, 25.00 ± 0.03 mL.

Methods

Exploratory experiments showed that the concentration of Indo⁻ should be around 1.40×10^{-5} M to avoid saturation of the UV-Vis detector, whereas for ITC experiments, IMC

concentrations must be higher than 1.0×10^{-4} M for the binding isotherm to be resolved in detail.

UV-Vis experimentation

UV-Vis experiments followed the molar ratio method [28]; a set of solutions of IMC were prepared by dissolving a weighed amount of HIndo with 600 μL of NaOH 0.1 M, then a 0.10 M phosphate buffer was used to adjust the pH of solutions and dilute to the calibration mark in a 50 mL volumetric flask. These samples were titrated either with solutions of β -CD or 2-HP- β -CD, which were also prepared with phosphate buffer and 300 μL of NaOH 0.1 M in a 25 mL volumetric flask, concentrations of the IMC and CD are indicated in Table 1, every experiment was triplicated, experimental system temperature was set to 25 °C.

UV-Vis registered data were treated by means of the program Stability Quotients from Absorbance Data (SQUAD) [29], which is designed to obtain the equilibrium constants for a proposed chemical model that can be pH-dependent or pH-independent. Absorbance data obtained at different wavelengths and different chemical composition of the systems are fed to SQUAD, the program employs a least square approximation using a Gauss-Newton algorithm, calculating the values of the global formation constants that minimize the sum of residual squares (U) between the experimental ($A_k^{\text{exp}(\lambda)}$) and calculated ($A_k^{\text{cal}(\lambda)}$) absorbance of the k species at the λ wavelength, as follows:

$$U = \sum_{k=1}^q \sum_{\lambda}^m \left(A_k^{\text{exp}(\lambda)} - A_k^{\text{cal}(\lambda)} \right)^2. \quad (2)$$

In order to provide evidence on the Indo inclusion in CDs in aqueous solution, UV-Vis studies of Indo-CD were carried out at pH 5 and 7.

ITC experimentation

ITC experiments are also designed following the molar ratio method. 0.10 M of phosphate buffer was used as solvent and pH adjustment for preparing all solutions. Buffered IMC solutions were prepared by dissolving a weighed amount of IMC salt and set to the mark, in a 50 mL volumetric

Table 1 Performed experiments, concentrations are in mol/L

Cyclodextrin@ pH	UV-Vis		ITC	
	IMC	CD	IMC	CD
β -CD@7.0	5.42×10^{-5}	1.75×10^{-3}	5.63×10^{-4}	1.74×10^{-2}
β -CD@5.0	5.64×10^{-5}	1.75×10^{-3}		
2-HP- β -CD@7.0	5.64×10^{-5}	1.74×10^{-2}	5.63×10^{-4}	1.74×10^{-2}
2-HP- β -CD@5.0	6.99×10^{-5}	1.74×10^{-2}		

flask. Buffered β -CD and 2-HP- β -CD were also prepared with buffer solution in a 25 mL volumetric flask. Final concentrations of the IMC and CDs are indicated in Table 1.

In the case of titration experiment, reference cell and reaction cell ($V = 1.4303$ mL) were initially filled with buffered IMC solution, while the syringe was filled with the corresponding buffered CD solution. In order to obtain the CD dilution heat maintaining pH and phosphate concentrations, in the blank experiments the reference cell and reaction cell were filled only with the buffer solution, while syringe was filled with the corresponding buffered CD solution. As less and bigger additions are recommended to reduce the error in heat determinations, blank and titration experiments were performed with a set of 35 additions of 8 μ L each, setting 16 s of time per injection and 360 s between subsequent additions. To refine the inclusion constants, titration curves were fitted to an interaction model (Eq. 1) and evaluated by means of MicroCal PEAQ Analysis Software developed by Malvern [30]. Each experimental run was triplicated to assure reproducibility of results, experimental temperature was 25 °C.

Results and discussion

Given that experiments are carried out to different pH values, it is important to consider the predominance of the IMC species as a function of the pH. Figure 3 shows the distribution diagram of IMC species as a function of pH. In particular, for pH 5, 24% is the acid species whereas at pH 7 the anionic species is 99%. It would be appropriate to increase the amount of HIndo, by means of reducing the pH, in order to investigate the dependency of inclusion with the pH, however neutral indomethacin solubility is strongly limited at $\text{pH} < 6.5$ [27].

UV–Vis

Figure 4 shows a set of experimental UV–Vis spectra of systems of Indo- β -CD and Indo-2-HP- β -CD at pH 5 and 7 resulting from titration of Indo solutions with the corresponding CD; markers are used for experimental results, for the sake of clarity we present only a selected group of spectra. Increasing CD the general UV–Vis spectrum shape is similar regardless the pH of the system. In all the cases, as the relative CD increases the maximum around 275 nm, which shows a hypochromic displacement, becomes less pronounced. More appreciable changes in the spectra appear in the 230–280 nm wavelength region; these changes may be associated with the inclusion of Indo in the CD cavity.

Table 2 compiles the results produced after applying SQUAD for refining the constants of inclusion, values are presented as $\log K_{1:1}$ at each pH condition, the sum of

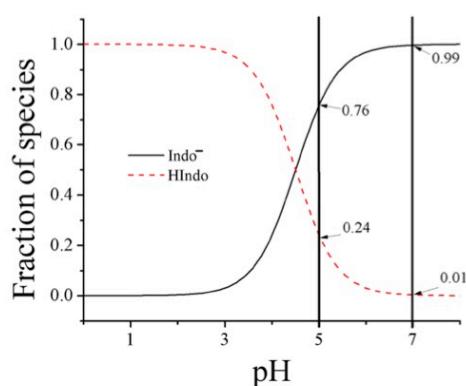


Fig. 3 Distribution diagram of the IMC species versus pH, abundances are indicated for pH 5 and 7

residual squares is also reported. The values for $K_{1:1}$ indicate a weak but favorable interaction between IMC and CD, results agree reasonably well with those reported by other groups [11–14, 22, 23, 31] SQUAD also calculates the absorptivity coefficients of the species absorbing in solution, this information can be used to reproduce the experimental UV–Vis spectra, in fact reconstruction of experimental information is a manner to validate the chemical model, as it can be observed in Fig. 4 reconstruction of experimental behavior (continuous line) captures in a very acceptable way the main characteristics of the spectra.

Comparing the computed inclusion constants for β -CD we can notice that pH hardly contributes to affinity of IMC towards β -CD. In contrast, for 2-HP- β -CD there is a slight decrease in the affinity as the pH is reduced, previous reported values of $\log K_{1:1}$ for 2-HP- β -CD show the same trend: 2.88 [12] and 2.69 [31] at pH 7 and 5, respectively. Finally, at pH 7, 2-HP- β -CD shows slightly greater affinity than β -CD for IMC.

Isothermal titration calorimetry

Results of ITC experiments are shown in Fig. 5. Given that IMC concentrations for ITC are higher than UV–Vis, experiments at pH 5 produce precipitation due to IMC reduced solubility limiting our study to pH 7. Calorimetric study reveals that, in the studied cases, inclusion is an exothermic process; curves evidence that high molar ratios, where CD abounds with respect to IMC, would be needed to saturate the host CD favoring the inclusion over small molar ratios. Moreover, for the dilution and binding isotherms to converge, the trend of the isotherm indicates than even higher

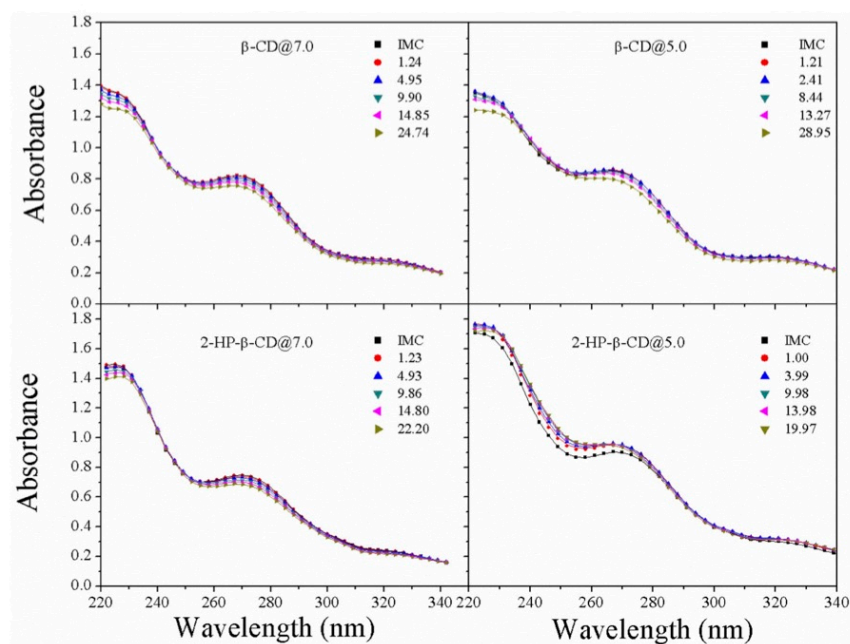


Fig. 4 UV-Vis spectra for the IMC titration with β -CD@pH or 2-HP- β -CD@pH at the indicated [CD]/[IMC] molar ratios (right hand side columns). Markers are the experimental values, continues lines are the reconstructed spectra from the results provided by SQUAD

Table 2 Inclusion constants determined by UV-Vis and ITC, U is the sum of residual squares, $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$

Cyclodextrin@pH	UV-Vis				
	$\log K_{1:1}$				U^a
β -CD@7.0	2.80 ± 0.04				1.59×10^{-3}
β -CD@5.0	2.86 ± 0.02				3.69×10^{-3}
2-HP- β -CD@7.0	2.99 ± 0.04				6.02×10^{-3}
2-HP- β -CD@5.0	2.57 ± 0.04				7.92×10^{-3}
	ITC				
	N	$\log K_{1:1}$	ΔH (kJ/mol)	$-T\Delta S$ (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)
β -CD@7.0	1.00	2.81 ± 0.00	-15.20 ± 0.03	-0.87 ± 0.04	-16.04 ± 0.01
2-HP- β -CD@7.0	1.00	2.85 ± 0.01	-12.90 ± 0.12	-3.35 ± 0.15	-16.25 ± 0.03

^aSum of residual squares of the analysis made by SQUAD (Eq. 1). Uncertainties of all parameters are the average of three measurements

CD/IMC molar ratios would be required; this effect is more pronounced for the β -CD system.

Because of passive diffusion of the titrant into the reaction cell during equilibration at the tip of the syringe, the first point was not taken into account in the data analysis. Further, data analysis of ITC is obtained under the

assumption that a one-site model (Eq. 1) describes the interaction between IMC and CDs, thus $N=1$ in Table 2. ΔH values agree with determinations on similar compounds, i.e. when CDs include different drugs by means of interactions with alike drug molecular moieties, interaction heats should be comparable. In this case, ΔH values compiled in Table 2



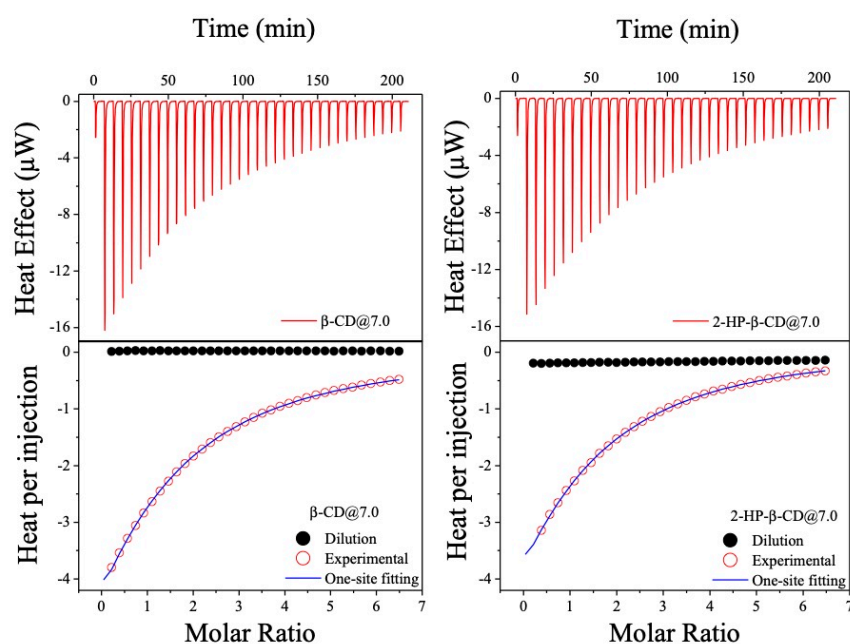


Fig. 5 ITC thermograms in top panels, bottom panels show the one-site fitting isotherms after withdrawing the CD dilution effect

are consistent with those reported by Todorova et al., for the interaction of β -CD with nabumetone and flurbiprofen of 11.7 and 16.5 kJ/mol, respectively [32]. Furthermore, in Table 2 the values of inclusion constants agree with those already calculated from the UV–Vis experiments at pH 7. Negative Gibbs energies denote that inclusion is a spontaneous event under experimental conditions; $-\Delta S$, indicates that inclusion of IMC in the CDs is accompanied of displacement of solvent molecules from the CD cavity. On the other hand, comparatively it has been observed that smaller $-\Delta S$ terms are associated with larger CD cavities [32], which is reproduced in our experiments, as can be seen in Table 2.

Once the inclusion constants have been obtained, we employed the MEDUSA program [33–35] to create diagrams of distribution for the species in solution. Figure 6 displays these diagrams, the molar fraction of the species IMC and the inclusion complex are plotted in terms of the concentrations of IMC and CD, the latter expressed as $p[\text{CD}] = -\log[\text{CD}]$; in the construction of such diagrams we employed the $\log K_{1:1}$ obtained by means of ITC.

It is convenient to explore the fraction of species formed in the CD solubility limit, which would be a realistic limit

when preparing pharmaceutical formulations. In water, β -CD solubility is reported to be around $\sim 2\%$ (w/v), equivalent to 20 mg/mL or 1.63×10^{-2} M [36] that corresponds to $p[\beta\text{-CD}] = 1.77$; whereas solubility of 2-HP- β -CD is $\sim 45\%$ (w/v) [14], equivalent to 450 mg/mL or 0.35 M, $p[2\text{-HP-}\beta\text{-CD}] = 0.48$. For an IMC concentration of $10^{-4.5}$ M and β -CD in its solubility limit, the fraction of the formed inclusion complex is 0.91. In contrast, when in the solution 2-HP- β -CD is set to its solubility limit, the fraction of the inclusion complex would be 0.99. Thus, 2-HP- β -CD performs better because it includes a higher quantity of the IMC molecule than β -CD. This higher amount of the formed inclusion complex is a consequence of the larger stability constant but also of the higher water solubility of 2-HP- β -CD.

Concluding remarks

The interaction between IMC and CD occurs in the stoichiometric ratio 1:1, with weak interaction. UV–Vis results in $\log K_{1:1}$ of 2.86 and 2.57 for β -CD and 2-HP- β -CD, respectively at pH 5. At pH 7, while by UV–Vis $\log K_{1:1}$ are 2.80

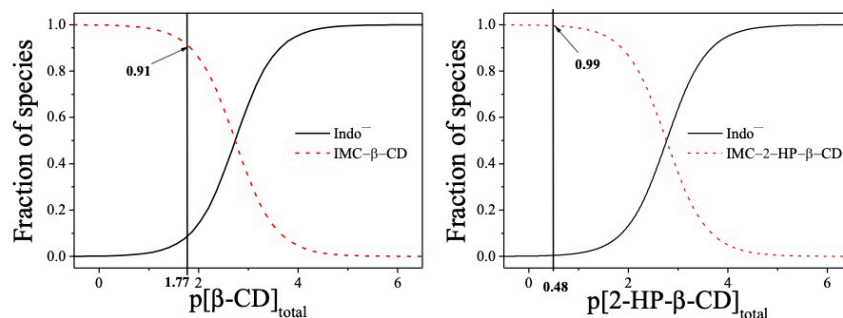


Fig. 6 Species distribution diagrams for the systems IMC- β -CD, pH 7, $[IMC] = 10^{-4.5}$ M. Inclusion constants were those obtained from the ITC experiments

and 2.99, by ITC $\log K_{1:1}$ are 2.81 and 2.85 for β -CD and 2-HP- β -CD, respectively. ITC results indicates that inclusion phenomenon of IMC in CDs is spontaneous, exothermic and entropically driven by the exclusion of water molecules from the CD cavity. As a consequence of the small inclusion constant, formation of the IMC-CD inclusion complex will be favored at high CD/IMC molar ratios. In the CDs solubility limit, 2-HP- β -CD performs better for inclusion of IMC than β -CD.

Acknowledgements The authors are grateful to PAPIIT DGAPA-UNAM Grant No. IN218118, FESC-UNAM PIAP 1846, A.R. H.-N. thanks to CONACYT for his Ph.D. Scholarship No. 300687.

Author contributions The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interests The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

References

- Valentovic, M.: Indomethacin. In: xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference, pp. 1–5. Elsevier, Amsterdam (2007)
- Lucas, S.: The pharmacology of indomethacin. *Headache J. Head Face Pain* **56**(2), 436–446 (2016)
- Bernardi, A., Braganhol, E., Jäger, E., Figueiró, F., Edelweiss, M.I., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., Battastini, A.M.O.: Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model. *Cancer Lett.* **281**(1), 53–63 (2009)
- Ruidiaz, M.A., Mora Guerrero, C.D.P., Delgado, D.R., Yurquina, A., Martínez, F.: Estimation of the indomethacin solubility in ethanol + water mixtures by the extended Hildebrand solubility approach—Open Access Library. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* **39**(1), 79–95 páginas (2010)
- Lin, S.-Z., Wouessidjewe, D., Poelman, M.-C., Duchêne, D.: In vivo evaluation of indomethacin/cyclodextrin complexes gastrointestinal tolerance and dermal anti-inflammatory activity. *Int. J. Pharm.* **106**(1), 63–67 (1994)
- Kaneniwa, N., Otsuka, M., Hayashi, T.: Physicochemical characterization of indomethacin polymorphs and the transformation kinetics in ethanol. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **33**(8), 3447–3455 (1985)
- Otsuka, M., Matsumoto, T., Kaneniwa, N.: Effect of environmental temperature on polymorphic solid-state transformation of indomethacin during grinding. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **34**, 1784–1793 (1986)
- Hancock, B.C., Parks, M.: What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals? *Pharm. Res.* **17**(4), 397–404 (2000)
- Murdande, S.B., Pikal, M.J., Shanker, R.M., Bogner, R.H.: Solubility advantage of amorphous pharmaceuticals: I. A thermodynamic analysis. *J. Pharm. Sci.* **99**(3), 1254–1264 (2010)
- Ito, T., Sugafuji, T., Maruyama, M., Ohwa, Y., Takahashi, T.: Skin penetration by indomethacin is enhanced by use of an indomethacin/smectite complex. *J. Supramol. Chem.* **1**(4–6), 217–219 (2001)
- Hamada, Y., Nambu, N., Nagai, T.: Interactions of α - and β -cyclodextrin with several non-steroidal antiinflammatory drugs in aqueous solution. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **23**(6), 1205–1211 (1975)
- Backensfeld, T., Müller, B.W., Wiese, M., Seydel, J.K.: Effect of cyclodextrin derivatives on indomethacin stability in aqueous solution. *Pharm. Res. Off. J. Am. Assoc. Pharm. Sci.* **7**(5), 484–490 (1990)
- Casella, R., Williams, D., Jambhekar, S.: Solid-state β -cyclodextrin complexes containing indomethacin, ammonia and water. I. Formation studies. *Int. J. Pharm.* **165**(1), 1–14 (1998)
- Jambhekar, S., Casella, R., Maher, T.: The physicochemical characteristics and bioavailability of indomethacin from β -cyclodextrin, hydroxyethyl- β -cyclodextrin, and hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexes. *Int. J. Pharm.* **270**(1–2), 149–166 (2004)
- Crini, G.: Review: a history of cyclodextrins. *Chem. Rev.* **114**(21), 10940–10975 (2014)



16. Wu, C.-Y., Benet, L.Z.: Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm. Res.* **22**(1), 11–23 (2005)
17. Rudrangi, S.R.S., Bhomia, R., Trivedi, V., Vine, G.J., Mitchell, J.C., Alexander, B.D., Wicks, S.R.: Influence of the preparation method on the physicochemical properties of indomethacin and methyl- β -cyclodextrin complexes. *Int. J. Pharm.* **479**(2), 381–390 (2015)
18. Kurkov, S.V., Loftsson, T.: Cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* **453**(1), 167–180 (2013)
19. Li, J., Zhang, X.: Preparation and characterization of the inclusion complex of ofloxacin with β -CD and HP- β -CD. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **69**(1–2), 173–179 (2011)
20. Ol'khovich, M.V., Sharapova, A.V., Blokhina, S.V., Skachilova, S.Y., Kesarev, O.G., Perlovich, G.L.: Physicochemical characteristics of the inclusion complexes of biologically active compounds with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Thermochim. Acta* **639**, 1–9 (2016)
21. Loftsson, T., Brewster, M.E.: Pharmaceutical applications of cyclodextrins. I. Drug solubilization and stabilization. *J. Pharm. Sci.* **85**(10), 1017–1025 (1996)
22. Jambhekar, S.S., Breen, P.: Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. *Drug Discov. Today* **21**(2), 356–362 (2016)
23. Jelesarov, I., Bosshard, H.R.: Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J. Mol. Recognit.* **12**(1), 3–18 (1999)
24. Buckton, G., Beezer, A.E.: The applications of microcalorimetry in the field of physical pharmacy. *Int. J. Pharm.* **72**(3), 181–191 (1991)
25. Sun, D., Li, L., Qiu, X., Liu, M., Yin, B.: Cyclodextrins binding to paeonol and two of its isomers in aqueous solution. Isothermal titration calorimetry and ^1H NMR investigations of molecular recognition. *J. Solut. Chem.* **35**(11), 1537–1549 (2006)
26. Guzmán-Hernández, D.S., Ramírez-Silva, M.T., Rojas-Hernández, A., Corona-Avendaño, S., Romero-Romo, M., Palomar-Paradé, M.: Spectrophotometric and electrochemical quantification of the host–guest interaction of tenoxicam and β -CD in aqueous solution at different pH values. *J. Electroanal. Chem.* **738**, 20–26 (2015)
27. Kulkarni, S., Gupta, S.P., Upmanyu, N., Tonpay, S.D.: Solubility enhancement of water insoluble drug for ophthalmic formulation. *Int. J. Drug Deliv.* **3**(1), 141–148 (2011)
28. Rodríguez-Laguna, N., Reyes-García, L.I., Moya-Hernández, R., Rojas-Hernández, A., Gómez-Balderas, R.: Chemical speciation of the system Cu(II)–indomethacin in ethanol and water by UV–Vis spectrophotometry. *J. Chem.* **2016**, 1–12 (2016)
29. Leggett, D.J.: *Computational Methods for the Determination of Formation Constants*. Plenum Press, New York (1985)
30. Malvern Instruments Ltd.: *Microcal PEAQ-ITC Analysis Software*. Malvern, Worcestershire (2014)
31. Iohara, D., Hirayama, F., Ishiguro, T., Arima, H., Uekama, K.: Preparation of amorphous indomethacin from aqueous 2,6-di-*O*-methyl- β -cyclodextrin solution. *Int. J. Pharm.* **354**(1–2), 70–76 (2008)
32. Todorova, N.A., Schwarz, F.P.: The role of water in the thermodynamics of drug binding to cyclodextrin. *J. Chem. Thermodyn.* **39**(7), 1038–1048 (2007)
33. Didi, M.A., Medjahed, B., Benaouda, W.: Adsorption by liquid–liquid extraction of Hg(II) from aqueous solutions using the 2-butyl-imidazolium di-(2-ethylhexyl) phosphate as ionic liquid. *Am. J. Anal. Chem.* **04**(07), 40–47 (2013)
34. Eriksson, G.: An algorithm for the computation of aqueous multi-component, multiphase equilibria. *Anal. Chim. Acta* **112**(4), 375–383 (1979)
35. Ingri, N., Kakolowicz, W., Sillén, L.G., Warnqvist, B.: High-speed computers as a supplement to graphical methods—V¹: Haltafall, a general program for calculating the composition of equilibrium mixtures. *Talanta* **14**(11), 1261–1286 (1967)
36. Yalkowsky, S.H., He, Y., Jain, P.: *Handbook of Aqueous Solubility Data*. CRC Press, Boca Raton (2010)

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

1 Thermodynamics of the inclusion of M(II)Indomethacin
2 complexes (M(II): Cu(II) or Zn(II)) within cyclodextrins in
3 aqueous solution.

4 *Adrián Ricardo Hipólito-Nájera*¹, *Alberto Rojas-Hernández*², *Norma Rodríguez-Laguna*¹, *Luis I. Reyes-*
5 *García*¹, *Virginia Gómez-Vidales*³, *Rodolfo Gómez-Balderas*^{1*}, *Rosario Moya-Hernández*^{1*}

6 ¹Laboratorio de Físicoquímica Analítica, Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Facultad de Estudios
7 Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli, C.P. 54700, Edo. Méx.,
8 México.

9 ²Departamento de Química, Área de Química Analítica, UAM-Iztapalapa, Apdo. Postal 55-534, 09340
10 Iztapalapa, Cd. Méx., México

11 ³Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito exterior, Ciudad Universitaria,
12 04510 Coyoacán, D.F., México.

13
14 *To whom correspondence should be addressed

15 Adrián Ricardo Hipólito-Nájera	ORCID: 0000-0002-9053-5011
16 Alberto Rojas-Hernández	ORCID: 0000-0001-9716-4762
17 Norma Rodríguez-Laguna	ORCID: 0000-0003-1340-3303
18 Luis I. Reyes-García	ORCID: 0000-0002-0705-1340
19 Virginia Gómez-Vidales	ORCID: 0000-0003-3070-7085
20 *Rodolfo Gómez-Balderas	ORCID: 0000-0002-3293-1841 rodolfo.gomez@unam.mx
21 *Rosario Moya-Hernández	ORCID: 0000-0001-8064-1008 rosariomoya@gmail.com
22	

23 **Tel.: (+5255) 5623 2014**

24 **KEYWORDS:** Non-steroidal anti-inflammatory drugs, Cu(II)-Indomethacin-Cyclodextrin ternary complexes,
25 Zn(II)-Indomethacin-Cyclodextrin ternary complexes, stability constants, Isothermal Titration Calorimetry.

1

26 **Abstract**

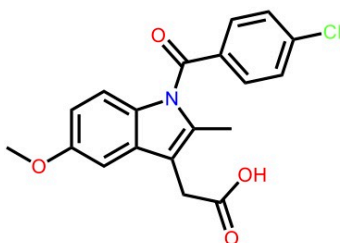
27 Metallocomplexes of indomethacin $M(\text{IMC})_2(\text{H}_2\text{O})_2$ ($M = \text{Cu}(\text{II}), \text{Zn}(\text{II})$) are recognized as
28 potential anti-inflammatory drugs; but their low solubility in water difficult their
29 bioavailability, participation in drug formulation and identification of therapeutically active
30 species. On the other side, cyclodextrins (CDs) are recognize for their capability to increase
31 the amount in solution of different guests by forming inclusion complexes. This contribution
32 presents a study of the thermodynamics of the interaction between water soluble MIMC_2
33 species with various CDs. The synthesis of initial and main $M(\text{IMC})_2(\text{H}_2\text{O})_2$ compounds are
34 presented, as well as their structural characterization by means of IR, XRPD and EPR, which
35 allows to discuss the existence of mononuclear species in the solid form of the
36 $M(\text{IMC})_2(\text{H}_2\text{O})_2$ complexes. Moreover, a UV-Vis study was performed, in order to confirm
37 that CDs assists the metallocomplex solubility in water. Once the increasing of solubility was
38 established, an EPR study on the $\text{Cu}(\text{II})$ systems demonstrates that mononuclear soluble
39 species of the type $\text{Cu}(\text{IMC})_2(\text{H}_2\text{O})_2$ is included in CDs, in water solution. Then, isothermal
40 titration calorimetry was performed to follow the $M(\text{IMC})_2(\text{H}_2\text{O})_2$ inclusion within various
41 CDs. The obtained heat response during titration was fit to a sequential independent binding
42 site model, besides the ΔH , ΔS and ΔG thermodynamic parameters, the inclusion constants
43 of MIMC with CDs are here reported for the first time. Main results show that inclusion is
44 exothermic, spontaneous and, depending on the metal center of the metallocomplex, will be
45 driven either by enthalpic or entropic contributions.

46

47

48 **1. Introduction**

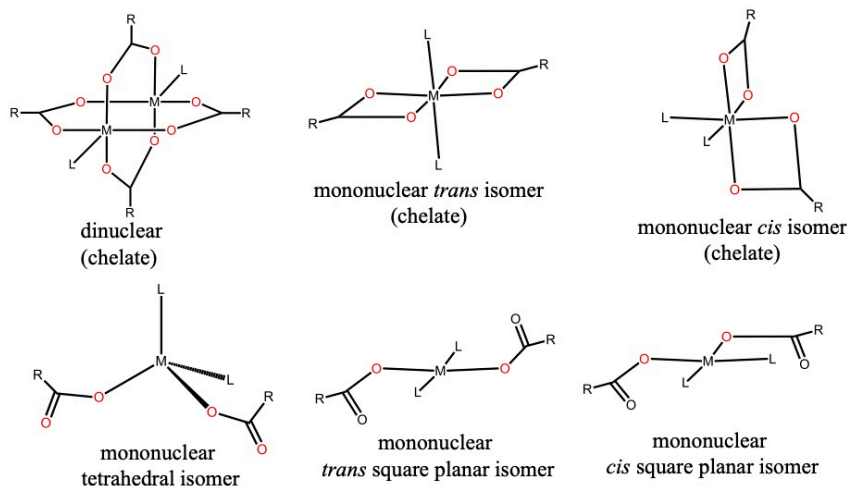
49 The worldwide use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) arises for its anti-
50 inflammatory, analgesic and antipyretic properties [Rainsford, 2007]. The NSAID
51 Indomethacin (IMC) of chemical name $C_{19}H_{16}ClNO_4$ 2-[1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-
52 methylindol-3-yl] acetic acid is classified as a member of the family of the arylalkanoic acids
53 (Fig. 1); it is prescribed for a great variety of sickness with possible anticancer activity
54 [Valentovic, 2007; Jain, 2008, Zhang, 2006; Maity, 2015]. IMC is a no selective inhibitor of
55 cyclooxygenase COX1 and COX2, that stops the prostaglandin synthesis, which are
56 responsible of the inflammatory response and the gastrointestinal (G. I.) covering. The last
57 explain the principal side effects produced by IMC: ulceration and G. I. bleeding [Valentovic,
58 2007; Jain, 2008; Williams, 2005; McNally, 2001; Vane, 1997; Moncada, 1979; Marnett,
59 1999; Weder, 2002; Zhou, 2000].



60
61 *Fig. 1. IMC structure*
62

63 A strategy to avoid G. I. adverse effects is the complexation of IMC with metal ions of the *d*
64 block, such as Cu(II) and Zn(II) [Zhou, 2000]. In spite of having the same mechanism of
65 action of AINES, some MNSAIDs complexes (M=Cu(II) or Zn(II)) improve the therapeutic
66 effect of the drug and decrease side effects [Sorenson, 1989; Tagliati, 1999; Dillon, 2004]. It
67 is known that in inflamed tissues there are high levels of copper and zinc ions [Fini, 2001].
68 The copper ion plays a role in the gastrointestinal damage prevention with NSAIDs [Morgan,
69 2001]. CuIMC complexes are important in veterinary medicine and marketed formulations
70 are already available [Weder, 2001]. On the other hand, zinc (II) ion has shown an
71 improvement in the ulceration heal rate and the complexes ZnNSAIDs are less irritating to
72 the gastric mucosa [Tagliati, 1999]. Complexes $[Zn_2(IMC)_4L_2]$ and *cis*- $[Zn(IMC)_2L_2]$ (L:
73 solvent) has been identified as anti-inflammatory drugs and 3 times more potent than IMC
74 [Dillon, 2003]. It is well known that the effectivity of MIMC complexes depends on species
75 formed in solution, and interaction with the site of action.

76



78

79 Fig. 2. Structures of MIMC with carboxylic acids ligands. R=IMC.

80

81 Molecular structures of complexes CuNSAID have been identified to exist as mononuclear
 82 or dinuclear species with carboxylic acids ligands (Fig. 2) [Baes, 1976; Dillon, 2004]. Most
 83 carboxylato-bound Cu(II) mononuclear exist in a configuration with unidentate o chelate
 84 carboxylate binding, with a coordination number ranging from four to six [Dillon, 2004].
 85 Meanwhile, CuNSAID dinuclear species appear to have a preference towards the *paddle*
 86 *wheel* copper acetate structure [Dillon, 2004]. In the same manner, carboxylate-bound to
 87 Zn(II) could occur in a mononuclear and dinuclear species too [Dillon, 2004]. There is
 88 evidence that MNSAID form mononuclear or polynuclear depending on the solvent used
 89 (acting like ligand) [Zhou, 20003], as well as the metal-ligand molar ratio in solution
 90 [Rodríguez-Laguna, 2016]. Many reports of the solid MIMC complexes, crystallized from
 91 diverse solvents, have been published [Weder, 1999]; however, few of them report speciation
 92 in aqueous solution.

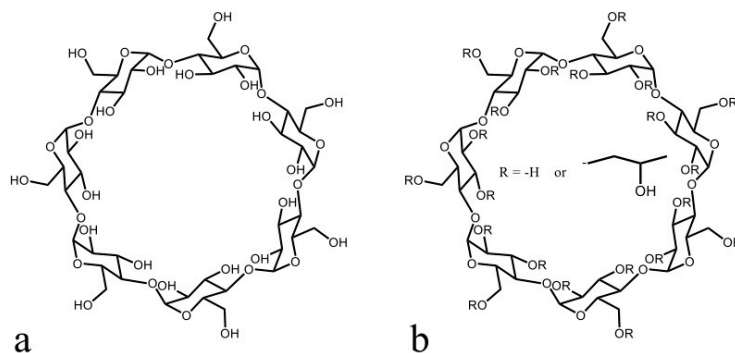
93 A critical parameter in the copper and zinc complexes with IMC is their poor water solubility,
 94 originating unsatisfactory identification of mononuclear or polinuclear soluble species in
 95 vivo and in vitro, hinders MIMC study on the enzymatic sites of action, diminishes
 96 bioavailability and makes difficult preparation of pharmaceuticals (Zhou, 2000; Fini, 2001;
 97 Olvera, 2017; Sanches, 2019).

98 It is well known that cyclodextrins are molecules used as excipient for the improvement of
 99 bioavailability in a great variety of drugs [Rekharsky, 1998]. The cyclodextrins (CDs) are
 100 rings of glucopyranose units with a toroidal shape, a hydrophobic cavity and a hydrophilic



101 surface (Fig. 3). The hydrophobic cavity can include or encapsulate a great number of organic
102 molecules [Rekharsky, 1998; Jambhekar, 2016]. This encapsulating property assists or
103 modifies the physical, chemical and/or biological characteristics of the included guest (Crini,
104 2014; Loftsson, 1996). Cyclodextrins names are related to the number of glucopyranose units
105 in their ring structure: α -cyclodextrin (α -CD) has 6 glucopyranose units, β -cyclodextrin (β -
106 CD) has 7 units and γ -cyclodextrins (γ -CD) has 8 units, and so on [Crini(2014); Szejtli(1997);
107 Szejtli(1998)]. Encapsulating potential and solubility of the CDs depends on the size of the
108 cavity and OH residues. OH groups have the potential to be replaced for different functional
109 groups and customize the CDs properties. A common group used to increase β -CD solubility
110 is 2-hydroxypropyl (HP-) to give HP- β -CD when OH- groups are substituted [Gould, 2005].
111 In the case of any substituted CD the substitution could be incomplete, and the degree of
112 substitution is given by the molar substitution (M.S.).

113



114

115 Fig. 3. a) β -Cyclodextrin and b) HP- β -Cyclodextrin structure

116

117 The interaction CD-guest is weak, attributed to van der Waals forces, hydrogen bonds and
118 the interchange between solvent molecules inside the cavity for the guest molecule. [Crini,
119 2014]; however, the detailed picture of inclusion continues in discussion. The interaction
120 between IMC and CDs has been broad studied [Hamada, 1975; Backensfeld, 1990; Casella,
121 1998; Jambhekar, 2004; Hipólito-Nájera, 2019); an interesting approach of ternary metal-
122 NSAID-CD system is the study by Hamdan in 2016 where Diclofenac with HP- β -CD and
123 Zn(II) interactions are researched. However, as far as we know, neither the MIMC water
124 soluble species with CDs nor the thermodynamics of the MIMCCD inclusion complexes
125 have been known or studied yet.

126 This contribution aims to study the thermodynamics of the interaction between MIMC with
127 various CDs. Consequently, MIMC (M: Cu(II) or Zn(II)) were prepared in their solid form
128 in aqueous solutions. Characterization, performed by XRPD, IR and EPR technics, permitted
129 to determine some key structural features and the stoichiometry of the solid complexes. Then,

5

130 different CDs were employed to increase MIMC solubility in aqueous solution, by forming
131 the corresponding inclusion complexes. This enhancement of solubility allowed to identify
132 the CuIMC species included within the CDs. The increment of solubility of MIMC was
133 evaluated quantifying the total amount of metals in solution, by UV-Vis spectroscopy. In
134 order to identify the CuIMC₂ soluble species electron paramagnetic resonance (EPR)
135 spectroscopy was applied. Finally, the thermodynamics of the MIMC water-soluble species
136 with CDs were follow by isothermal titration calorimetry (ITC).

6



137 **2. Methodology**

138 *2.1. Reagents.*

139 Indomethacin (HIMC), α -CD, β -CD, γ -CD, 2-HP- β -CD (M.S.: 0.6), 2-HP- γ -CD (M.S.: 0.6)
140 and $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ($\text{Cu}(\text{OAc})_2$) were purchased at Sigma Aldrich. NaOH (98%) was
141 purchased at Mallinckrodt. ZnCl_2 (granular USP), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (99%), ethyl alcohol absolute
142 (99.91%) and methanol anhydrous (99.99%) was purchased at J. T. Baker and Merck,
143 respectively. Deionized water 18.2 M Ω was used to prepare all solutions.

144 *2.2. Instrumental.*

145 Lambda 35 UV-Vis spectrophotometer, Perkin Elmer. Frontier FT-IR, Perkin Elmer. VP-
146 ITC, General Electric. EPR spectrometer JES-TE300, Jeol. X-ray powder diffractometer, D8
147 Advance, Bruker. RMN spectrometer, AVANCE DMX500, Bruker. Stirring hot plate, Cole
148 Parmer stabletemp. Filter paper #42, Whatman. Common glassware.

149 *2.3. Experimental*

150 *2.3.1. CuIMC and ZnIMC synthesis and characterization*

151 Prior to MIMC synthesis, indomethacin sodium salt $\text{NaIMC} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (NaIMC) was prepared
152 from HIMC and characterized by IR according Kulkarni, 2011 and ^1H NMR (in D_2O and
153 trimethylsilylpropanoic acid as reference).

154 The solid forms of $\text{CuIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ (CuIMC) and $\text{ZnIMC}_4(\text{H}_2\text{O})_2$ (ZnIMC) were prepared
155 with NaIMC and $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in water according Weder, 1999, products were confirmed by
156 IR, XRPD and EPR.

157 *2.3.2. Phase Solubility Diagrams*

158 A set of vials containing a same amount of the solid form of the MIMC complex in water
159 (pH = 6-7) with different concentrations of CD (0-0.08 M) were stirred for 3 days. After this
160 time, the samples were filtrated and analyzed for quantification of Cu(II) and Zn(II) with
161 EDTA and PAR, respectively, by UV-Vis [Ringbom, A., Montuenga, C., 1979, (Aguirre,
162 2016)].

163 *2.3.3. EPR studies of CuIMC soluble species*

164 A set of vials containing a sample of the non-soluble CuIMC complex in water (pH = 6-7)
165 with CD ($-\log[\beta\text{-CD}] = 1.77$, otherwise $-\log[\text{CD}] = 1.10$) remained in stirring for 3 days.
166 After this time, samples were filtered, and filtrates were used for EPR spectra.

167 EPR spectrometer, operated in the X-Band mode at a modulation frequency of 100 KHz,
168 with a cylindrical cavity (TE011 mode). The individual samples were placed in a quartz flat
169 cell (synthetic quartz, Wilmad Glass Company) with a path length of 0.2 mm. The external
170 calibration of the magnetic field was carried out using a JEOL ES-FC5 precision gaussmeter.

7

171 EPR measurements were made in a quartz tube at room temperature with a JEOL JES-TE300
172 spectrometer operating at X-band frequency (near 9.4 GHz) at 100 KHz field modulation,
173 with a cylindrical cavity (TE₀₁₁ mode). The external measurement of the static magnetic field
174 was made with a precision JEOL ES-FC5 gaussmeter. The low-temperature measurements
175 were made at 77 K using quartz tube (synthetic quartz, Wilmad Glass Company) of 5 mm
176 i.d. Spectral acquisition and manipulations were performed using the program ES-PRITS/TE.

177

178 2.3.4. Isothermal Titration Calorimetry

179 A set of vials with water were saturated with MIMC complexes, after stirring 3 days, samples
180 were filtrated, and the filtrate was used to quantify the soluble MIMC₂ fraction by UV-Vis.

181 For the ITC experiments, the sample cell was filled with filtrate of CuIMC₂ or ZnIMC₂,
182 average concentrations of 2.28×10^{-5} M and 4.25×10^{-5} M, the syringe was filled with a
183 concentrated solution of CD of 1.45×10^{-2} M, for titration experiments. For controls or
184 dilution experiments, the reaction cell was filled with water and CD solution was injected
185 from the syringe. Both experiments were programmed to make 28 additions of 10 μ L each
186 20 s, followed by 360 s between additions, at 25 °C.

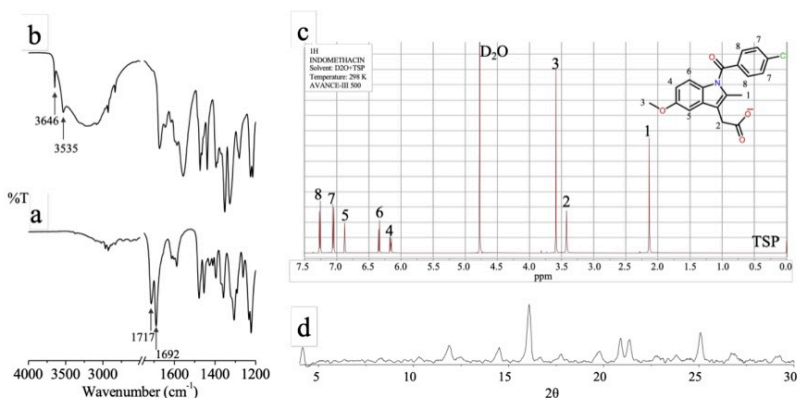
187 Experimental data were fitted to the binding model using Affinimeter software
188 [AFFINImeter- The software for molecular interactions [WWW Document], n.d. URL
189 <https://www.affinimeter.com/site/> (accessed 1.21.20).]. From the determined inclusion
190 constants distribution species diagrams were constructed applying MEDUSA program [I.
191 Puigdomenech, MEDUSA (Making equilibrium diagrams using sophisticated algorithms),
192 Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden].



193 **3. Results and Discussion**

194 *3.1. CuIMC and ZnIMC solid complexes, synthesis and characterization*

195 In Fig. 4 the IR of a) HIMC and b) NaIMC·3H₂O are shown. NaIMC can be differentiated
196 from the HIMC reagent (γ -isoform) because the salt has characteristic signals of a hydrate at
197 3646 and 3535 cm⁻¹[Kulkarni, 2011; Chen, 2005]. ¹H NMR (500 MHz, D₂O, TSP) (Fig. 4c)
198 δ 7.29–7.23 (m, 2H), 7.09–7.03 (m, 2H), 6.88 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 6.34 (d, J = 9.0 Hz, 1H),
199 6.16 (dd, J = 9.0, 2.6 Hz, 1H), 3.59 (s, 3H), 3.42 (s, 2H), 2.14 (s, 3H). In addition, the XRPD
200 diffractogram of NaIMC in Fig. 4d shows agreement with the XRPD pattern of Chen, 2005,
201 confirming the formation of the hydrate of IMC sodium salt. Finally, NaIMC shows better
202 solubility in water and methanol than HIMC.



203

204

205

Fig. 4. IR spectra of a) HIMC, b) NaIMC, c) XRPD y d) RMN of NaIMC.

206 IR spectra of the prepared solid complexes are displayed in Fig. 5 a) CuIMC and b) ZnIMC
207 present the characteristic signals of the amida carbonyl vibration at $\nu_{\text{amide}} = 1673$ cm⁻¹ and
208 $\nu_{\text{amide}} = 1679$ cm⁻¹, respectively; as in NaIMC $\nu_{\text{amide}} = 1674$ cm⁻¹ (Fig. 5c), this fact shows that
209 the N-amide does not participate in the metal ion coordination sphere. In contrast, the
210 asymmetric vibration signal that corresponds to the IMC carbonyl goes from $\nu_{\text{asym}} = 1557$
211 cm⁻¹ in NaIMC to $\nu_{\text{asym}} = 1589$ cm⁻¹ and $\nu_{\text{asym}} = 1567$ cm⁻¹ for CuIMC and ZnIMC,
212 respectively, making evident the binding of M(II) with IMC through the carbonyl moiety
213 [Dillon, 2004; Singla 1995].

214 On the other hand, symmetric carboxyl stretching ν_{sym} at 1400 and 1440 cm⁻¹ have been used
215 to differentiate mononuclear from dinuclear carboxylato metal species (Zhou, 2000, 2003;
216 Dillon, 2004); the absence of the 1400 cm⁻¹ band is associated with bridging dinuclear species
217 (Zhou, 2000; Morgan, 2001). In the case of the complexes synthesized in this work, ν_{sym}
218 bands appear at 1420 and 1437 cm⁻¹ for CuIMC and at 1400 and 1435 cm⁻¹ for ZnIMC. The
219 separation (Δ) between ν_{asym} and ν_{sym} is also indicative of dinuclear symmetrical bridging:

9

220 values of $\Delta > 200 \text{ cm}^{-1}$, while values of $\Delta < 200 \text{ cm}^{-1}$ are typical for chelation in monomeric
 221 species (Zhou, 2000). In this work Δ is 169 cm^{-1} and 167 cm^{-1} for CuIMC and ZnIMC,
 222 respectively, suggesting that chelating geometry of mononuclear species prevails as solid.

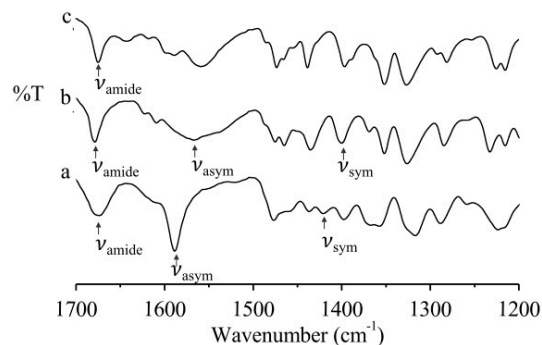


Fig. 5. IR spectra of a) CuIMC b) ZnIMC y c) NaIMC.

223
 224
 225

226 To carry out a comparative analysis, the EPR spectra of a) dinuclear CuAcO and b) CuIMC
 227 at 298 K, both in solid state, are shown in Fig. 7. The a) spectrum has a typical answer for
 228 two near Cu(II) atoms giving a well resolved triplet state ($S = 1$) with axial symmetry ($D \neq 0$
 229 y $E=0$), $H_{z1} = 49.88 \text{ mT}$, $H_{z2} = 572.53 \text{ mT}$ and $H_{\perp 2} = 436.4 \text{ mT}$ (Dillon, 2004; Olguin, 2009).
 230 In the spectrum b a central field signal in axial symmetry was observed, corresponding to S
 231 $= 1/2$, assigned to mononuclear species and characterized by $g_{\parallel} = 2.35$ and $g_{\perp} = 2.0786$, no
 232 hyperfine coupling was detected, the $[\text{CuIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ species might be responsible of those
 233 signals. Additionally, a weak signal was detected at 470 mT , which may correspond to the
 234 signal $H_{\perp 2}$ in axial symmetry ($D \neq 0$ y $E=0$), from the complex $[\text{Cu}_2\text{IMC}_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ in triplet
 235 state ($S = 1$) found as impurity. These results point out the predominance of the mononuclear
 236 specie of $[\text{CuIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ in solid state. It seems that synthesis of CuIMC complexes using
 237 NaIMC assists the predominance of mononuclear species, if water is used as solvent.

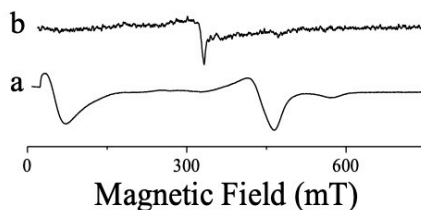


Fig. 6. a) CuAcO, b) CuIMC

238
 239
 240

241 The determined XRPD of ZnIMC (Fig. 7a) has strong similarities with the XRPD reported
242 by Zhou, 2003 specifically for mononuclear $[\text{Zn}(\text{IMC})_2(\text{MeOH})_2]$ (Fig. 7b), suggesting
243 isostructurality and a possible structure $[\text{Zn}(\text{IMC})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$. CuIMC diffractogram was not
244 obtained because low crystallinity. Zhou et al. 2003 have established, from XRD evidence,
245 that synthesis of ZnIMC in polar solvents (MeOH and EtOH) produce mononuclear species.
246 They also concluded that the best model that adjust to their XAFS data in powder samples is
247 obtained for a tetrahedral mononuclear complex with two monodentate IMC (Zhou, 2003).
248 Given the similarity between XRD of ZnIMC here reported, and that of Zhou et al.; a
249 $[\text{ZnIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ tetrahedral species is proposed to exist in solid form.

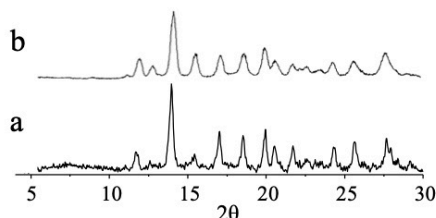


Fig. 7. XRPD. a) $\text{ZnIMC}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ (This work) b) $\text{ZnIMC}_2(\text{MeOH})_2$ (Zhou, 2003)

250

251

252

253 3.2. Solubility Studies

254 CuIMC and ZnIMC are solids scarcely soluble in water, it is well known that CDs increase
255 the solubility of many poor soluble molecules. Here, the effect of CDs on increasing the
256 solubility of the prepared complexes is demonstrated. To differentiate the species in solution
257 from their solids, the MIMC_2 (CuIMC_2 and ZnIMC_2) notation is defined. Figure 8 shows that
258 the amount of MIMC_2 complexes in solution is proportional to the CDs concentration, all the
259 curves have positive slopes (Higuchi, 1965). Table 1 compiles the slope and the percentage
260 increase of solubility; correlation coefficients (R_2) are also report. By assuming solely
261 mononuclear species present in solution, the solubility of CuIMC_2 and ZnIMC_2 are $S_0 = (3.14$
262 $\pm 2.35) \times 10^{-5}$ and $S_0 = (2.49 \pm 1.90) \times 10^{-5}$ M, respectively. These values are in concordance
263 with those reported by Dillon in 2004 and Fini in 2001.

264 In the case of CuIMC_2 (Fig. 8a), the highest solubility increment is produced by β -CD;
265 unfortunately, this CD has the lowest solubility in water limiting the increase of solubility of
266 CuIMC_2 . HP- β -CD has better water solubility than β -CD, favoring greater amounts of
267 MIMC_2 in solution than β -CD. Besides CDs solubility there exist other factors that affect the
268 rate of increment of MIMC_2 concentration in solution. For instance, the HP residues in HP-
269 β -CD reduce the rate of increment of CuIMC_2 solubility compared to β -CD; a similar effect
270 of the HP residues in HP- γ -CD compared to γ -CD is observed. Additionally, although α -CD
271 and γ -CD have higher solubility than β -CD, the rate of increasing of MIMC concentration in
272 solution is small as CD is added.

11



273 On the other hand, for ZnIMC₂ the β-CD and HP-β-CD perform the best in solubilizing the
 274 solid complex. The other CDs shown similar solubilizing capacity, among them, with alike
 275 straight slopes (Fig. 8b). In contrast to CuIMC₂, it seems the HP residues of the CDs have no
 276 effect on the solubility of ZnIMC₂; this fact might be related with differences on the
 277 molecular structure of the complexes in solution.

278 As it has been established, the increase of solubility of the complexes is related to the amount
 279 of CD in solution. Table 1 shows that increase of solubility for both complexes follows the
 280 order HP-β-CD > α-CD > β-CD > γ-CD. Interestingly, this order is different to the CD
 281 solubility order (HP-β-CD > HP-γ-CD > γ-CD > α-CD > β-CD [Saokham, 2018]), revealing
 282 that apart from the CD solubility other factors influence the complexes and CDs in solution.

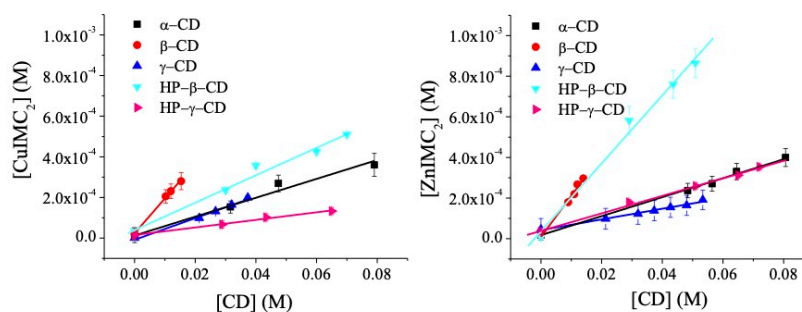


Fig. 8. Phase solubility diagrams for CuIMC₂ and ZnIMC₂ in presence of CDs

Table 1. Slope, correlation coefficients (R²) and percentage increase of solubility of CuIMC₂ and ZnIMC₂ in presence of CDs.

CuIMC ₂ (S ₀ =(3.14±2.35)×10 ⁻⁵ M)				
CD	Slope	% solubility increase	R ₂	CD solubility (g/100 mL water)
HP-β	(6.60 ± 0.95)×10 ⁻³	1624.37 ± 74.75	0.99	>120.0
α	(4.50 ± 2.10)×10 ⁻³	1146.62 ± 76.33	0.98	14.5
β	(16.10 ± 1.80)×10 ⁻³	780.34 ± 78.33	0.99	1.85
γ	(5.20 ± 0.90)×10 ⁻³	633.82 ± 74.87	0.99	23.2
HP-γ	(1.90 ± 0.50)×10 ⁻³	423.61 ± 75.86	0.99	80.0
ZnIMC ₂ (S ₀ =(2.49±1.90)×10 ⁻⁵ M)				
CD	Slope	% solubility increase	R ₂	CD solubility (g/100 mL water)
HP-β	(16.80 ± 0.54)×10 ⁻³	3474.07 ± 76.92	0.99	>120.0
α	(4.70 ± 0.50)×10 ⁻³	1608.36 ± 77.31	0.99	14.5
HP-γ	(4.30 ± 0.50)×10 ⁻³	1419.38 ± 76.62	0.99	80.0
β	(19.80 ± 2.30)×10 ⁻³	1190.19 ± 76.59	0.99	1.85
γ	(2.50 ± 0.20)×10 ⁻³	655.41 ± 82.24	0.99	23.2

288

289 3.3. EPR studies of CuIMC soluble species

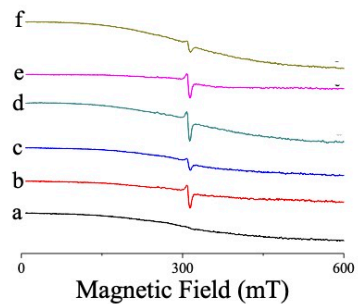
290 As CDs assisted the increase of MIMC₂ solubility in water, electronic paramagnetic
 291 resonance becomes a powerful technic to identify either mononuclear or polynuclear soluble
 292 CuIMC₂ species. Consequently, an EPR study was performed to elucidate the predominance
 293 of the mononuclear or dinuclear specie of copper in solution in presence of high
 294 concentration of CDs, this high concentration helps to reach concentrations of [CuIMC₂] ≈
 295 1×10⁻⁴M at pH =6-7 the results are shown in Fig. 9 and Table 2.

296 The spectra obtained shows the typical central field absorption corresponding to Cu(II) S =
 297 1/2, indicating the presence of the monomer in the frozen solution. In all cases an axial
 298 spectrum was determined showing the dependence $g_{\parallel} > g_{\perp} > g_e$ which is diagnostic for a $d_{x^2-y^2}$
 299 ground state for Cu(II), in the case of b) α-CD and e) HP-β-CD was possible to determine
 300 the value of the hyperfine coupling constant (A_i) resulting from the interaction between
 301 delocalized p electrons and the nuclear spin I_{Cu} = 3/2, A_i coupling was not distinguish in the
 302 other spectra due loss of base line principally by the solvent and the low solubility of the
 303 metallocomplex. Table 3 shows the spectroscopic parameters (g_∥, g_⊥ and A_i) for this series
 304 of compounds, which were corrected by simulation.

305 Additionally a mixture of CuCl₂ and NaIMC in a molar ratio 1:2 in ethanol to get a [Cu(II)]_{total}
 306 = 10⁻⁴ M, was prepared to obtain the EPR spectra in frozen solution, a mononuclear specie
 307 assigned to [CuIMC₂(EtOH)₂] was detected whose spectroscopic parameters are g_∥ = 2.3655
 308 and g_⊥ = 2.0740 shown an axial symmetry Fig. 10. The average g values for the complexes
 309 studied are in good agreement with another Cu(II) carboxylates complexes where g_∥ ≈ 2.3
 310 and g_⊥ ≈ 2.08 (Dillon, 2004). These values suggest an octahedral elongated structure with a
 311 ground state $d_{x^2-y^2}$. With these results is possible to propose a complex in aqueous solution,
 312 where carboxylates of IMC chelate copper ion in *trans* position lying on the x and y axes with
 313 two H₂O molecules coordinating along the z axe, which stoichiometry should be
 314 [CuIMC₂(H₂O)₂].

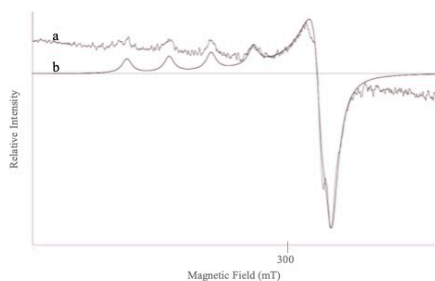
315 Table 2. EPR data obtained by the simulation of spectra of Fig. 9 y 10.

CD	A _i (mT)	g _∥	g _⊥
α	13.5	2.3880	2.0770
β	—	—	2.0775
γ	—	—	2.0784
HP-β	12.5	2.3880	2.0770
HP-γ	—	—	2.0676
[CuIMC ₂ (EtOH) ₂]	12.5	2.3655	2.0740



316
317
318

Fig. 9. EPR spectra of CuIMC_2 in a) H_2O , b) $\alpha\text{-CD}$, c) $\beta\text{-CD}$, d) $\gamma\text{-CD}$, e) $\text{HP-}\beta\text{-CD}$, f) $\text{HP-}\gamma\text{-CD}$



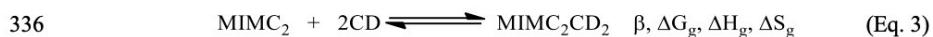
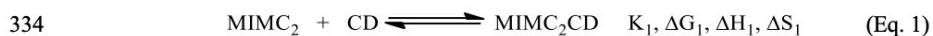
319
320

Fig. 10. EPR spectra of a) solution CuCl_2 and NaIMC in relation 1:2 with a $[\text{Cu}]_{\text{Total}}=10^{-4}\text{M}$. b) simulation.

321 3.4. Isothermal Titration Calorimetry

322 From the experimental evidence presented in section 3.1, this work proposes that the
323 complexes of CuIMC₂ and ZnIMC₂, in aqueous solution, are mononuclear species with two
324 IMC molecules binding the metal center.

325 When MIMC₂ complexes interact with CDs entities (considered as ligands), CDs have the
326 possibility to interact independently with any of the two equivalent IMC residues available
327 in the metal complex. Hence, to describe the inclusion phenomena, a two successive
328 independent sites model is proposed for fitting ITC experimental data (Fig. 11), as in Eq. 1
329 and Eq. 2 [Bouchemal, 2012]. The thermodynamic parameters logK₁, ΔG₁, ΔH₁, and ΔS₁ for
330 a first site, and logK₂, ΔG₂, ΔH₂, and ΔS₂ for a second site, as well as the global parameters
331 (Eq. 3) of the inclusion β, ΔG_g, ΔH_g and ΔS_g, are reported in Table 3 for CuIMC₂ and ZnIMC₂
332 interaction with CDs (the results of interaction IMC₂ with γ-CD and HP-γ-CD are not
333 evaluated for low heat signal in ITC).



337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

15

352

353

354

355

356

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

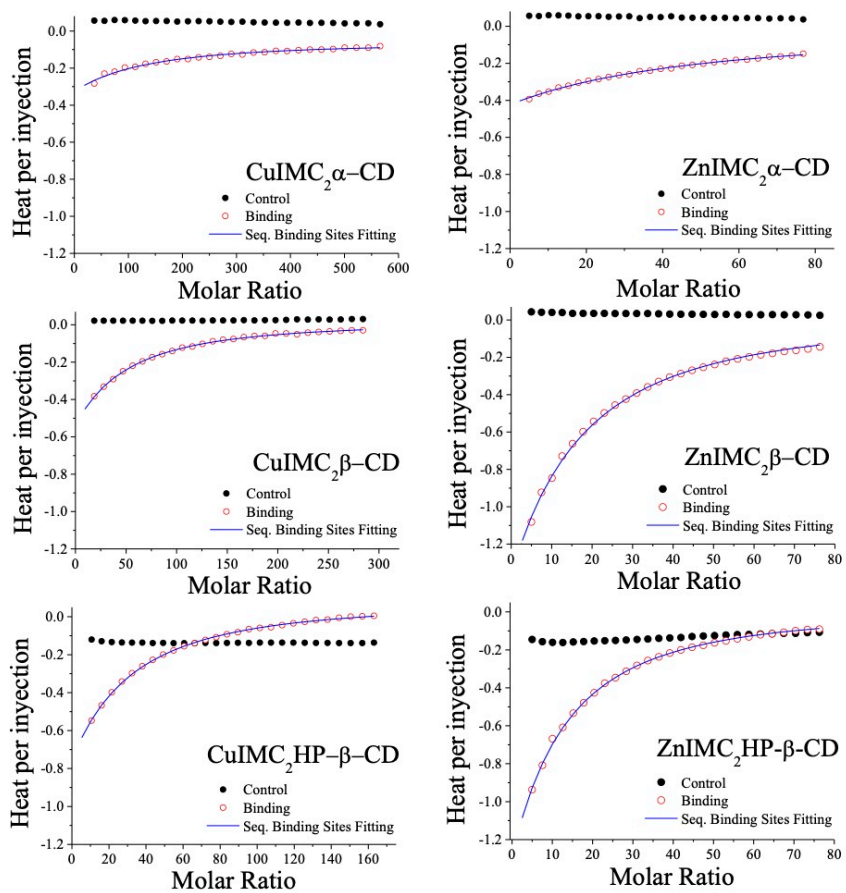


Fig. 11. Binding (\circ experimental) and control (\bullet dilution) isotherms of MIMC inclusion within CDs, fitting considered a two sequential independent binding sites (—). Binding isotherms take into account the control contribution.

381

382
383Table 3. CuIMC ITC results, ΔH , ΔG and $T\Delta S$ in kJ/mol; ΔS in J/molK. Subscripts 1, 2, refer to binding the sequential independent sites 1 and 2; g indicates the values of the global inclusion process.

CuIMC ₂					
CD(1 st site)	logK ₁	ΔG_1	ΔH_1	$-T\Delta S_1$	ΔS_1
α	3.35 ± 0.02	-19.093 ± 0.005	-24.41 ± 0.41	5.31 ± 0.41	-17.82 ± 1.38
β	3.27 ± 0.25	-18.67 ± 0.08	-4.40 ± 0.94	-14.26 ± 1.02	47.84 ± 3.42
HP- β	2.85 ± 0.01	-16.260 ± 0.004	-19.89 ± 0.45	3.63 ± 0.45	-12.18 ± 1.52
CD (2 nd site)	logK ₂	ΔG_2	ΔH_2	$-T\Delta S_2$	ΔS_2
α	2.11 ± 0.02	-12.07 ± 0.01	-152.32 ± 4.65	140.25 ± 4.66	-470.41 ± 15.62
β	2.70 ± 0.47	-15.40 ± 0.17	-5.10 ± 0.95	-10.30 ± 1.12	34.55 ± 3.77
HP- β	3.11 ± 0.03	-17.72 ± 0.01	9.47 ± 0.47	-27.19 ± 0.48	91.21 ± 1.60
CD (global)	log β	ΔG_g	ΔH_g	$-T\Delta S_g$	ΔS_g
α	5.46 ± 0.03	-31.16 ± 0.01	-176.73 ± 5.06	145.57 ± 17.00	-488.23 ± 17.00
β	5.97 ± 0.72	-34.06 ± 0.25	-9.50 ± 1.89	-24.57 ± 2.14	82.39 ± 7.18
HP- β	5.95 ± 0.04	-33.98 ± 0.01	-10.42 ± 0.92	-23.56 ± 0.93	79.03 ± 3.12
ZnIMC ₂					
CD (1 st site)	logK ₁	ΔG_1	ΔH_1	$-T\Delta S_1$	ΔS_1
α	3.41 ± 0.13	-19.44 ± 0.04	-3.67 ± 0.54	-15.77 ± 0.58	52.90 ± 1.96
β	2.99 ± 0.02	-17.09 ± 0.01	-26.22 ± 1.16	9.13 ± 1.17	-30.63 ± 3.92
HP- β	3.39 ± 0.01	-19.371 ± 0.002	-10.44 ± 0.68	-8.93 ± 0.69	29.94 ± 2.30
CD (2 nd site)	logK ₂	ΔG_2	ΔH_2	$-T\Delta S_2$	ΔS_2
α	2.02 ± 0.19	-11.55 ± 0.10	-62.86 ± 0.88	51.31 ± 0.98	-172.09 ± 3.29
β	2.46 ± 0.06	-14.05 ± 0.02	-7.02 ± 1.20	-7.03 ± 1.22	23.59 ± 4.09
HP- β	2.39 ± 0.01	-13.645 ± 0.003	-38.16 ± 3.48	24.52 ± 3.49	-82.24 ± 11.69
CD (global)	log β	ΔG_g	ΔH_g	$-T\Delta S_g$	ΔS_g
α	5.43 ± 0.32	-30.99 ± 0.13	-66.53 ± 1.43	35.54 ± 1.56	-119.19 ± 5.24
β	5.46 ± 0.08	-31.14 ± 0.03	-33.24 ± 2.36	2.10 ± 0.69	-7.04 ± 4.67
HP- β	5.78 ± 0.01	-33.64 ± 0.01	-48.61 ± 4.17	15.59 ± 4.17	-52.29 ± 13.99

384

385 From results in Table 3, it can be seen that inclusion of MICM into the CDs are spontaneous
386 processes regardless the site ($\Delta G_1 < 0$ and $\Delta G_2 < 0$). Comparing α -CD with β -CD and HP- β -
387 CD, the global inclusion for the former CD is slightly less spontaneous (this behavior is
388 appreciable in Fig. 11). In general, $\Delta G_1 < \Delta G_2$ except for CuIMC₂HP- β -CD. Now, comparing
389 between metallic center, CuIMC₂ inclusion in β -CD is more spontaneous than in HP- β -CD;
390 ZnIMC₂ behaves in opposite way, being interaction with HP- β -CD more spontaneous than
391 β -CD.

17

392 Inclusion phenomena are regularly discussed in terms of enthalpic and entropic contributions
393 to Gibbs energy [Bouchemal, 2012; Rekharsky, 1994, 1998, 2002, 2006; Liu, 2005; Crini,
394 2014; Cooper, 1999, 2001]. Entropic driven ($|\Delta H| < |T\Delta S|$) means that degrees of freedom
395 are increased in the interaction. Two competitive effects are notorious: the reduction of
396 entropy by effect of the restriction in MIMC₂ conformational changes after inclusion and the
397 increase of entropy due to release water from the cavity to contain the MIMC₂ complex
398 [Todorova, 2007]. Hydrophobic interactions are entropy-driven, where the entropy (ΔS) of
399 the interaction is large and positive and enthalpy is a low contribution [Bouchemal, 2012].
400 Increasing of entropy due to water release is higher as the cavity size grows. Enthalpic driven
401 means ($|\Delta H| > |T\Delta S|$) that Van der Waals interactions with unfavorable entropies of
402 interaction. MIMC complexes possess important hydrophobic fragments, the aromatic
403 residue of the IMC ligand, which are stabilized in the CD cavities realizing energy.
404 Furthermore, water molecules within the cavity are in higher energy states compared with
405 water molecules in the bulk, this energy is also released during MIMC inclusion.

406 By analyzing the enthalpic and entropic contributions to ΔG_g , it is observed that CuIMC₂
407 inclusion in α -CD is enthalpically driven, in contrast, inclusion in β -CD and HP- β -CD is
408 entropically controlled. It seems that water release from cavity is determinant on inclusion
409 of CuIMC₂ in β -CD and HP- β -CD vs α -CD, which would agree with water content in the
410 CDs cavity before inclusion. For ZnIMC₂, enthalpy guides inclusion for the three CDs.
411 Exothermicity favors inclusion in α -CD, sum of (more numerous) weak interactions in the α -
412 CD smaller cavity might explain larger enthalpy change (Brocos, 2011), compared with β -
413 CD and HP- β -CD, which having more spacious cavity are prone to present fewer interactions
414 [Wenz, 2008; Danil de Namor, 1990;; Bouchemal, 2012; Rekharsky, 2002].

415 Interactions of CDs with the first MIMC site are more exothermic processes than interactions
416 with the second MIMC site, except for CuIMC₂HP- β -CD, where the second site is more
417 exothermic than the first one. In both cases is clear that the two sites are no equivalent.

418 Regarding global exothermicity, interaction of CuIMC₂ with α -CD is more exothermic than
419 ZnIMC₂. In contrast, interaction of ZnIMC₂ is more exothermic than CuIMC₂ with β -CD and
420 HP- β -CD. This may be due to α -CD display a closer contact with the CuIMC₂ complex,
421 improving interactions as complex approaches the cavity; on the other hand, the ZnIMC₂
422 complex better interaction with a β -CD could be related to its structural features.

423 For ZnIMC₂ entropic contribution is negative for the tree CDs. Copper complex present a
424 differentiate behavior, entropy change is negative for α -CD but positive for β -CD and HP- β -
425 CD. Moreover, inclusion of ZnIMC₂ in α -CD results in a ΔS_g less negative than CuIMC₂.
426 Now, for β -CD and HP- β -CD, ΔS_g of ZnIMC₂ are negative while it is positive for CuIMC₂.
427 As it has been discussed, the entropic change due to the inclusion of CuIMC₂ and ZnIMC₂
428 can be rationalized in terms of two competitive contributions: the decrease of entropy
429 associated with the reduction of conformational freedom of the complex upon inclusion; and
430 the rise of entropy due to the exit of water from the cavity, as the hydrophobic part of the
431 complex occupies the CD cavity. Thus, the positive entropy for the inclusion of CuIMC₂

18

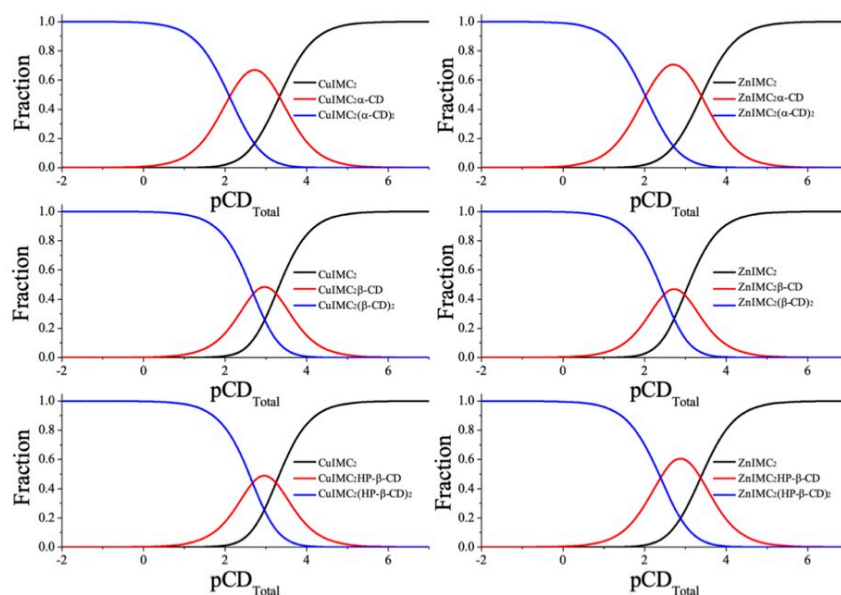
432 might indicate that the reduction in the degrees of conformational freedom of CuIMC₂ is
433 insufficient to overcome the entropy generated by the exit of water molecules. On the other
434 hand, the negative entropy, associated with the inclusion of ZnIMC₂, could be explained if
435 the decrease in the degrees of conformational freedom of ZnIMC₂ exceeds the increase in
436 entropy due to dehydration of the cavity. Therefore, results in Table 3 would point out that
437 CuIMC₂ display a more rigid molecular structure than ZnIMC₂ complexes.

438 In general, CDs interact with MIMC₂ spontaneously, the way that CDs interact with the sites
439 are independently and no equal, indication that an election of a correct model helped to
440 explain the experimental data. The relationship between ΔH y ΔS determine the feasibility
441 of form and inclusion complex. It is appreciable that CD size cavity it is important for the
442 relative values of ΔH y ΔS , but the guest molecule, and the number of released molecules of
443 water from the CD cavity, also will contributes to the MIMC₂ interaction with CDs.



444 From obtained values of $\log K_1$ and $\log K_2$ by ITC (Table 3), it is possible to construct
 445 diagrams of predominance (Fig. 12) for the inclusion of $MIMC_2$ (at their solubility
 446 concentration, S_0 in Table 1) in function of the added CD, expressed as pCD_{Total} ($-\log[CD]_{Total}$). It is noticeable that in all the diagrams the first species, $MIMC_2CD$, does not
 447 reach the 100% of formation, its highest predominance is found around $pCD_{Total} \approx 3$. The
 448 predominance of the $MIMC_2CD_2$ occurs when $pCD_{Total} < 1$. Some differences between
 449 $CuIMC_2$ and $ZnIMC_2$ can be pointed out. In case of α -CD there is no perceptible differences.
 450 To get a $MIMC_2$ complex fully included, slightly less amount of β -CD and HP- β -CD is
 451 necessary for $CuIMC_2$ than for $ZnIMC_2$. In the case of HP- β -CD; $ZnIMC_2$ HP- β -CD
 452 predominate higher than $CuIMC_2$ HP- β -CD.
 453

454 When CDs are compared, it is notorious that $CuIMC_2\alpha$ -CD predominate in a higher
 455 percentage than other $CuIMC_2CD$. In contrast, less amount of β -CD y HP- β -CD is necessary
 456 to reach 100% of formation of $CuIMC_2(CD)_2$. There is no differences between β -CD y HP-
 457 β -CD with $CuIMC_2$ complex. The $ZnIMC_2\alpha$ -CD acts as $CuIMC_2\alpha$ -CD and it has a higher
 458 predominance than other $ZnIMC_2CD$ complex. Less amount of β -CD y HP- β -CD is
 459 necessary to reach 100% of formation of $ZnIMC_2(CD)_2$ than α -CD.



460
 461 Fig. 12. Distribution species diagrams of $MIMC_2$ into CDs.
 462

463

464 **4. Concluding remarks**

465 It was possible to synthesize the solid complexes of MIMC, from the indomethacin salt. The
466 characterization by IR, of the prepared solids, provided signals of CuIMC and ZnIMC
467 mononuclear species, where the IMC coordinates the metal center through its carbonyl group.
468 The studies of CuIMC by EPR and ZnIMC by XRPD, allowed to identify the stoichiometers
469 $[\text{Cu}(\text{IMC})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ and $[\text{Zn}(\text{IMC})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$. The solubility of the complexes for CuIMC and
470 ZnIMC were determined which were $(3.14 \pm 2.35) \times 10^{-5}$ and $(2.49 \pm 1.90) \times 10^{-5}$ M,
471 respectively. This solubility is very low and does not allow the study of these complexes in
472 water. It was shown that the solubility of the Cu complexes increases $\approx 500\%$ with HP- γ -CD
473 and up to $\approx 1700\%$ with HP- β -CD, while the solubility of those of Zn increases $\approx 700\%$ with
474 γ -CD and up to $\approx 3500\%$ with HP- β -CD; The CD that best solubilized the MIMC complexes
475 was the HP- β -CD, the effect being greater for ZnIMC than for CuIMC. The order of
476 solubilizing power of MIMC complexes with CDs is: HP- β -CD > α -CD > β -CD > γ -CD. The
477 increase in solubility allowed to study the species present in solution of the copper complex
478 by EPR, confirming the presence of a mononuclear copper species, where 2 molecules of
479 IMC form a stoichiometry chelate complex $\text{Cu}(\text{IMC})_2(\text{H}_2\text{O})_2$. In analogy with this Cu
480 complex, it is proposed that the Zn complex has the stoichiometry $\text{Zn}(\text{IMC})_2(\text{H}_2\text{O})_2$, although
481 the presence of a chelate complex is debatable. With the stoichiometry in solution confirmed,
482 it was possible to study the thermodynamics of the interaction of MIMC₂ complexes with
483 CDs by ITC. A model of two sequential binding sites was proposed, with which the values
484 of ΔG , ΔH , ΔS were determined for each site and also the global value. Thermodynamics
485 with the proposed model indicates that the binding sites of the MIMC₂ complexes are
486 independent and not equivalent, with different values between them. The interaction of
487 MIMC₂ complexes with CDs is spontaneous. The first site is always more spontaneous than
488 the second site. The increase in the cavity between α -CD and β -CD improves spontaneity.
489 The spontaneity values will depend on the enthalpy-entropic balance that is generated due to
490 all the molecular driving forces in the inclusion. In this way it is observed that for α -CD the
491 enthalpy contribution will be the predominant one for both complexes, this due to a tighter
492 inclusion. In the case of β -CD and HP- β -CD with CuIMC₂, the entropic contribution will be
493 the one that dictates the way of inclusion, on the other hand the interaction of β -CD and HP-
494 β -CD with ZnIMC₂ is directed by the enthalpy contribution. The above behavior suggests a
495 structural difference between the MIMC₂ complexes, where the ZnIMC₂ complex presents
496 more conformational freedom. Species distribution diagrams confirm the need to use very
497 high amounts of CD (low total $p\text{CD}_{\text{Total}}$) for the predominance of a completely included
498 complex (MIMC₂CD₂).

499 **Author Contributions**

500 The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given
501 approval to the final version of the manuscript.

502 Adrián Ricardo Hipólito-Nájera, Alberto Rojas-Hernández, Norma Rodríguez-Laguna, Luis
503 I. Reyes-García, Virginia Gómez-Vidales, Rodolfo Gómez-Balderas, María del Rosario
504 Moya-Hernández.

505 **Declaration of Interest**

506 The authors declare that they have no known competing financial interests or personal
507 relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

508 **Financial Resources**

509 This work was supported by:

510 UNAM-PAPIIT IN218118 “Complejos de Cu(II) y Zn(II) con fármacos antiinflamatorios”.

511 UNAM-FESC-PIAPI 1846: “Complejos de inclusión de ciclodextrinas con moléculas
512 orgánicas de interés biológico”.

513 LANCAD-UNAM-DGTIC-058: “Complejación de fármacos antiinflamatorios no
514 esteroideos con iones Cu(II) y Zn(II)”.

515 **Acknowledgments**

516 To CONACYT for the scholarship with registration number 300687. To the A.R. H-N thanks
517 to Dr. Miguel Costas Basin for providing γ -CD and the support with ITC Data. To Dr. Atilano
518 Gutiérrez Carrillo for RMN support. To Dra. Katya Frank for the comments and suggestions
519 for this publication.

520



521 **References.**

- 522 AFFINImeter- The software for molecular interactions <https://www.affinimeter.com/site/>
523 (accessed Jan 21, 2020).
- 524 Aguirre, C.; Goto, Y.; Costas, M. Thermal and Chemical Unfolding Pathways of PaSdsA1
525 Sulfatase, a Homo-Dimer with Topologically Interlinked Chains. *FEBS Lett.* **2016**,
526 *590* (2), 202–214. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12041>.
- 527 Backensfeld, T.; Müller, B. W.; Wiese, M.; Seydel, J. K. Effect of Cyclodextrin Derivatives
528 on Indomethacin Stability in Aqueous Solution. *Pharm. Res. An Off. J. Am. Assoc.*
529 *Pharm. Sci.* **1990**, *7* (5), 484–490. <https://doi.org/10.1023/A:1015860531565>.
- 530 Baes, C. F.; Mesmer, R. F. *The Hydrolysis of Cations*; John Wiley-Interscience: New York,
531 **1976**.
- 532 Bouchemal, K.; Mazzaferro, S. How to Conduct and Interpret ITC Experiments Accurately
533 for Cyclodextrin-Guest Interactions. *Drug Discov. Today* **2012**, *17* (11–12), 623–629.
534 <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.01.023>.
- 535 Brocos, P.; Banquy, X.; Díaz-Vergara, N.; Pérez-Casas, S.; Piñeiro, Á.; Costas, M. A Critical
536 Approach to the Thermodynamic Characterization of Inclusion Complexes: Multiple-
537 Temperature Isothermal Titration Calorimetric Studies of Native Cyclodextrins with
538 Sodium Dodecyl Sulfate. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115* (49), 14381–14396.
539 <https://doi.org/10.1021/jp208740b>.
- 540 Casella, R.; Williams, D. .; Jambhekar, S. . Solid-State β -Cyclodextrin Complexes
541 Containing Indomethacin, Ammonia and Water. I. Formation Studies. *Int. J. Pharm.*
542 **1998**, *165* (1), 1–14. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(97\)00330-X](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(97)00330-X).
- 543 Chen, X.; Griesser, U. J.; Te, R. L.; Pfeiffer, R. R.; Morris, K. R.; Stowell, J. G.; Byrn, S. R.
544 Analysis of the Acid–Base Reaction between Solid Indomethacin and Sodium
545 Bicarbonate Using Infrared Spectroscopy, X-Ray Powder Diffraction, and Solid-State
546 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *38* (4),
547 670–677. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.02.017>.
- 548 Cooper, A. Thermodynamic Analysis of Biomolecular Interactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.*
549 **1999**, *3* (5), 557–563. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(99\)00008-3](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(99)00008-3).
- 550 Cooper, A.; Johnson, C. M.; Lakey, J. H.; Nöllmann, M. Heat Does Not Come in Different
551 Colours: Entropy–Enthalpy Compensation, Free Energy Windows, Quantum
552 Confinement, Pressure Perturbation Calorimetry, Solvation and the Multiple Causes
553 of Heat Capacity Effects in Biomolecular Interactions. *Biophys. Chem.* **2001**, *93* (2–
554 3), 215–230. [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(01\)00222-8](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(01)00222-8).

-
- 555 Corona-Avenidaño, S.; Alarcón-Angeles, G.; Rosquete-Pina, G. a; Rojas-Hernández, A.;
556 Gutierrez, A.; Ramírez-Silva, M. T.; Romero-Romo, M.; Palomar-Pardavé, M. New
557 Insights on the Nature of the Chemical Species Involved during the Process of
558 Dopamine Deprotonation in Aqueous Solution: Theoretical and Experimental Study.
559 *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111* (7), 1640–1647. <https://doi.org/10.1021/jp0637227>.
- 560 Crini, G. Review: A History of Cyclodextrins. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (21), 10940–10975.
561 <https://doi.org/10.1021/cr500081p>.
- 562 Danil de Namor, A. F.; Traboulssi, R.; Lewis, D. F. V. Host Properties of Cyclodextrins
563 toward Anion Constituents of Antigenic Determinants. A Thermodynamic Study in
564 Water and in N, N-Dimethylformamide. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (23), 8442–
565 8447. <https://doi.org/10.1021/ja00179a031>.
- 566 Dillon, C. T.; Hambley, T. W.; Kennedy, B. J.; Lay, P. A.; Weder, J. E.; Zhou, Q. Copper
567 And Zinc Complexes as Antiinflammatory Drugs. In *Metal ions in biological systems*;
568 Sigel, A., Sigel, H., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, **2004**; Vol. 41 Metal i.
- 569 Dillon, C. T.; Hambley, T. W.; Kennedy, B. J.; Lay, P. a; Zhou, Q.; Davies, N. M.; Biffin, J.
570 R.; Regtop, H. L. Gastrointestinal Toxicity, Antiinflammatory Activity, and
571 Superoxide Dismutase Activity of Copper and Zinc Complexes of the
572 Antiinflammatory Drug Indomethacin. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16* (1), 28–37.
573 <https://doi.org/10.1021/tx020078o>.
- 574 Fini, A.; Feroci, G.; Fazio, G. Interaction between Indomethacin and Heavy Metal Ions in
575 Aqueous Solution. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *13* (2), 213–217.
576 [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00097-5](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00097-5).
- 577 Gould, S.; Scott, R. C. 2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin (HP-β-CD): A Toxicology Review.
578 *Food Chem. Toxicol.* **2005**, *43* (10), 1451–1459.
579 <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.03.007>.
- 580 Hamada, Y.; Nambu, N.; Nagai, T. Interactions of .ALPHA.- and .BETA.-Cyclodextrin with
581 Several Non-Steroidal Antiinflammatory Drugs in Aqueous Solution. *Chem. Pharm.*
582 *Bull. (Tokyo)*. **1975**, *23* (6), 1205–1211. <https://doi.org/10.1248/cpb.23.1205>.
- 583 Hamdan, I. I.; El-Sabawi, D.; Abdel Jalil, M. Potential Interaction between Zinc Ions and a
584 Cyclodextrin-Based Diclofenac Formulation. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2016**, *42* (3),
585 418–428. <https://doi.org/10.3109/03639045.2015.1071834>.
- 586 Higuchi, T.; Connors, K. A. Phase Solubility Techniques. In *Advances in Analytical*
587 *Chemistry and Instrumentation*; **1965**; pp 117–212.
- 588 Hipólito-Nájera, A. R.; del Rosario Moya-Hernández, M.; Rojas-Hernández, A.; Gómez-
589 Balderas, R. Interaction of Indomethacin–Cyclodextrins in Water by UV–Vis and

-
- 590 ITC. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2019**, *95* (1), 55–62.
591 <https://doi.org/10.1007/s10847-019-00915-9>.
- 592 Jain, A. Solubilization of Indomethacin Using Hydrotropes for Aqueous Injection. *Eur. J.*
593 *Pharm. Biopharm.* **2008**, *68* (3), 701–714. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.06.013>.
- 594 Jambhekar, S.; Breen, P. Cyclodextrins in Pharmaceutical Formulations II: Solubilization,
595 Binding Constant, and Complexation Efficiency. *Drug Discov. Today* **2016**, *21* (2),
596 363–368. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.11.016>.
- 597 Jambhekar, S.; Casella, R.; Maher, T. The Physicochemical Characteristics and
598 Bioavailability of Indomethacin from β -Cyclodextrin, Hydroxyethyl- β -Cyclodextrin,
599 and Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Complexes. *Int. J. Pharm.* **2004**, *270* (1–2), 149–
600 166. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.10.012>.
- 601 Kulkarni, S.; Gupta, S. P.; Upmanyu, N.; Tonpay, S. D. Solubility Enhancement of Water
602 Insoluble Drug for Ophthalmic Formulation. *Int. J. Drug Deliv.* **2011**, *3* (1), 141–148.
603 <https://doi.org/10.5138/ijdd.2010.0975.0215.03064>.
- 604 Liu, Y.; Li, L.; Chen, Y.; Yu, L.; Fan, Z.; Ding, F. Molecular Recognition Thermodynamics
605 of Bile Salts by β -Cyclodextrin Dimers: Factors Governing the Cooperative Binding
606 of Cyclodextrin Dimers. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (9), 4129–4134.
607 <https://doi.org/10.1021/jp045332v>.
- 608 Loftsson, T.; Brewster, M. E. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 1. Drug
609 Solubilization and Stabilization. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85* (10), 1017–1025.
610 <https://doi.org/10.1021/js950534b>.
- 611 Maity, B.; Chatterjee, A.; Ahmed, S. A.; Seth, D. Interaction of the Nonsteroidal Anti-
612 Inflammatory Drug Indomethacin with Micelles and Its Release. *J. Phys. Chem. B*
613 **2015**, *119* (9), 3776–3785. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b00467>.
- 614 Marnett, L. J.; Kalgutkar, A. S. Cyclooxygenase 2 Inhibitors: Discovery, Selectivity and the
615 Future. *Trends Pharmacol. Sci.* **1999**, *20* (11), 465–469.
616 [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(99\)01385-1](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(99)01385-1).
- 617 McNally, R. *Drug Information for Health Care Professional (USP-DI)*, 21st ed.; Noth
618 Olmsted, Ohio, USA, **2001**.
- 619 Moncada, S.; Vane, J. R. Mode of Action of Aspirin-like Drugs. In *Advances in internal*
620 *medicine*; Stollerman, G. H., Ed.; YearBook Medical Publishers: Chicago, **1979**; pp
621 1–22.
- 622 Morgan, Y. R.; Turner, P.; Kennedy, B. J.; Hambley, T. W.; Lay, P. A.; Ray Biffin, J.;
623 Regtop, H. L.; Warwick, B. Preparation and Characterization of Dinuclear Copper–

-
- 624 Indomethacin Anti-Inflammatory Drugs. *Inorganica Chim. Acta* **2001**, *324* (1–2),
625 150–161. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(01\)00570-9](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(01)00570-9).
- 626 Olguín, J.; Castillo, A.; Gómez-Vidales, V.; Hernández-Ortega, S.; Toscano, R. A.; Muñoz,
627 E.; Castillo, I. Construction of Acetate-Bridged Dicopper(II) Hybrid Organic–
628 Inorganic Networks with Calix[4]Arene-Derived Nitrogenous Ligands. *Supramol.*
629 *Chem.* **2009**, *21* (6), 502–509. <https://doi.org/10.1080/10610270802406561>.
- 630 Olvera, Á.; Pérez-Casas, S.; Costas, M. Heat Capacity Contributions to the Formation of
631 Inclusion Complexes. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111* (39), 11497–11505.
632 <https://doi.org/10.1021/jp072098a>.
- 633 Puigdomenech, I. MEDUSA (Making Equilibrium Diagrams Using Sophisticated
634 Algorithms). Royal Institute of Technology: Stockholm, Sweden.
- 635 Rainsford, K. Anti-Inflammatory Drugs in the 21st Century. In *Inflammation in the*
636 *Pathogenesis of Chronic Diseases*; Harris, R. E., Bittman, R., Dasgupta, D.,
637 Engelhardt, H., Wyss, M., Rottem, S., Nasheuer, H.-P., Flohe, L., Herrmann, H.,
638 Holzenburg, A., Zwickl, P., Eds.; Springer, Dordrecht, 2007; pp 3–27.
639 https://doi.org/10.1007/1-4020-5688-5_1.
- 640 Rekharsky, M. V.; Inoue, Y. Complexation and Chiral Recognition Thermodynamics of 6-
641 Amino-6-Deoxy- β -Cyclodextrin with Anionic, Cationic, and Neutral Chiral Guests:
642 Counterbalance between van Der Waals and Coulombic Interactions. *J. Am. Chem.*
643 *Soc.* **2002**, *124* (5), 813–826. <https://doi.org/10.1021/ja010889z>.
- 644 Rekharsky, M. V.; Inoue, Y. Microcalorimetry. In *Cyclodextrins and Their Complexes*;
645 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, FRG, 2006; pp 199–230.
646 <https://doi.org/10.1002/3527608982.ch8>.
- 647 Rekharsky, M. V.; Inoue, Y. Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins. *Chem. Rev.*
648 **1998**, *98* (5), 1875–1918. <https://doi.org/10.1021/cr970015o>.
- 649 Rekharsky, M. V.; Schwarz, F. P.; Tewari, Y. B.; Goldberg, R. N. A Thermodynamic Study
650 of the Reactions of Cyclodextrins with Primary and Secondary Aliphatic Alcohols,
651 with D- and L-Phenylalanine, and with L-Phenylalanineamide. *J. Phys. Chem.* **1994**,
652 *98* (40), 10282–10288. <https://doi.org/10.1021/j100091a051>.
- 653 Ringbom, A.; Montuenga, C. *Formación de Complejos En Química Analítica*; Alhambra:
654 Madrid, Spain, **1979**.
- 655 Rodríguez-Laguna, N.; Reyes-García, L. I.; Moya-Hernández, R.; Rojas-Hernández, A.;
656 Gómez-Balderas, R. Chemical Speciation of the System Cu(II)-Indomethacin in
657 Ethanol and Water by UV-Vis Spectrophotometry. *J. Chem.* **2016**, *2016*, 1–12.
658 <https://doi.org/10.1155/2016/9804162>.

-
-
- 659 Sanches, B. M. A.; Ferreira, E. I. Is Prodrug Design an Approach to Increase Water
660 Solubility? *Int. J. Pharm.* **2019**, *568* (May), 118498.
661 <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118498>.
- 662 Saokham, P.; Muankaew, C.; Jansook, P.; Loftsson, T. Solubility of Cyclodextrins and
663 Drug/Cyclodextrin Complexes. *Molecules*. MDPI AG **2018**.
664 <https://doi.org/10.3390/molecules23051161>.
- 665 Singla, A. Zinc-Indomethacin Complex: Synthesis, Physicochemical and Biological
666 Evaluation in the Rat. *Int. J. Pharm.* **1995**, *120* (2), 145–155.
667 [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(94\)00370-K](https://doi.org/10.1016/0378-5173(94)00370-K).
- 668 Sorenson, J. R. J. Copper Complexes Offer a Physiological Approach to Treatment of
669 Chronic Diseases. In *Progress in Medicinal Chemistry*; Ellis,
- 670 Szejtli, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev.* **1998**,
671 *98* (5), 1743–1754. <https://doi.org/10.1021/cr970022c>.
- 672 Szejtli, J. Utilization of Cyclodextrins in Industrial Products and Processes. *J. Mater. Chem.*
673 **1997**, *7* (4), 575–587. <https://doi.org/10.1039/a605235e>.
- 674 Tagliati, C. A.; Kimura, E.; Nothenberg, M. S.; Santos, S. R. J. ; Oga, S. Pharmacokinetic
675 Profile and Adverse Gastric Effect of Zinc-Piroxicam in Rats. *Gen. Pharmacol. Vasc.*
676 *Syst.* **1999**, *33* (1), 67–71. [https://doi.org/10.1016/S0306-3623\(98\)00267-5](https://doi.org/10.1016/S0306-3623(98)00267-5).
- 677 Todorova, N. A.; Schwarz, F. P. The Role of Water in the Thermodynamics of Drug Binding
678 to Cyclodextrin. *J. Chem. Thermodyn.* **2007**, *39* (7), 1038–1048.
679 <https://doi.org/10.1016/j.jct.2006.12.019>.
- 680 Valentovic, M. Indomethacin. In *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*;
681 Elsevier, **2007**; pp 1–5. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.61929-4>.
- 682 Vane, J. R.; Botting, R. M. Mechanism of Action of Aspirin-like Drugs. *Semin. Arthritis*
683 *Rheum.* **1997**, *26* (6 SUPPL. 1), 2–10. [https://doi.org/10.1016/S0049-0172\(97\)80046-](https://doi.org/10.1016/S0049-0172(97)80046-7)
684 [7](https://doi.org/10.1016/S0049-0172(97)80046-7).
- 685 Weder, J. E.; Dillon, C. T.; Hambley, T. W.; Kennedy, B. J.; Lay, P. A.; Biffin, J. R.; Regtop,
686 H. L.; Davies, N. M. Copper Complexes of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs:
687 An Opportunity yet to Be Realized. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *232* (1–2), 95–126.
688 [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(02\)00086-3](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(02)00086-3).
- 689 Weder, J. E.; Hambley, T. W.; Kennedy, B. J.; Lay, P. A.; Foran, G. J.; Rich, A. M.
690 Determination of the Structures of Antiinflammatory Copper(II) Dimers of
691 Indomethacin by Multiple-Scattering Analyses of X-Ray Absorption Fine Structure
692 Data. *Inorg. Chem.* **2001**, *40* (6), 1295–1302. <https://doi.org/10.1021/ic0007815>.

27

-
- 693 Weder, J. E.; Hambley, T. W.; Kennedy, B. J.; Lay, P. A.; MacLachlan, D.; Bramley, R.;
694 Delfs, C. D.; Murray, K. S.; Moubaraki, B.; Warwick, B.; Biffin, J. R.; Regtop, H. L.
695 Anti-Inflammatory Dinuclear Copper(II) Complexes with Indomethacin. Synthesis,
696 Magnetism and EPR Spectroscopy. Crystal Structure of the N , N -
697 Dimethylformamide Adduct. *Inorg. Chem.* **1999**, *38* (8), 1736–1744.
698 <https://doi.org/10.1021/ic981100x>.
- 699 Wenz, G.; Strassnig, C.; Thiele, C.; Engelke, A.; Morgenstern, B.; Hegetschweiler, K.
700 Recognition of Ionic Guests by Ionic β -Cyclodextrin Derivatives. *Chem. - A Eur. J.*
701 **2008**, *14* (24), 7202–7211. <https://doi.org/10.1002/chem.200800295>.
- 702 Williams, P. A. M.; Molinuevo, M. S.; Okulik, N.; Jubert, A. H.; Etcheverry, S. B. Synthesis,
703 Characterization and Biological Properties of Vanadyl(IV) Complexes of Diclofenac
704 and Indomethacin: An Experimental and Theoretical Study. *Appl. Organomet. Chem.*
705 **2005**, *19* (6), 711–718. <https://doi.org/10.1002/aoc.879>.
- 706 Zhang, J. X.; Li, X. J.; Qiu, L. Y.; Li, X. H.; Yan, M. Q.; Yi Jin; Zhu, K. J. Indomethacin-
707 Loaded Polymeric Nanocarriers Based on Amphiphilic Polyphosphazenes with Poly
708 (N-Isopropylacrylamide) and Ethyl Tryptophan as Side Groups: Preparation, in Vitro
709 and in Vivo Evaluation. *J. Control. Release* **2006**, *116* (3), 322–329.
710 <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.09.013>.
- 711 Zhou, Q.; Hambley, T. W.; Kennedy, B. J.; Lay, P. A. XAFS Studies of Anti-Inflammatory
712 Dinuclear and Mononuclear Zn(II) Complexes of Indomethacin. *Inorg. Chem.* **2003**,
713 *42* (25), 8557–8566. <https://doi.org/10.1021/ic034049s>.
- 714 Zhou, Q.; Hambley, T. W.; Kennedy, B. J.; Lay, P. A.; Turner, P.; Warwick, B.; Biffin, J. R.;
715 Regtop, H. L. Syntheses and Characterization of Anti-Inflammatory Dinuclear and
716 Mononuclear Zinc Indomethacin Complexes. Crystal Structures of [Zn 2
717 (Indomethacin) 4 (L) 2] (L = N,N -Dimethylacetamide, Pyridine, 1-Methyl-2-
718 Pyrrolidinone) and [Zn(Indomethacin) 2 (L) 1]. *Inorg. Chem.* **2000**, *39* (17), 3742–
719 3748. <https://doi.org/10.1021/ic991477i>.

Anexos.



A1. Técnica de espectrofotometría Ultravioleta-visible (UV-Vis)

Un equipo de Ultravioleta visible (UV-vis) se conoce como espectrofotómetro, el cual está conformado por (Fig. A1.1):

1. Fuente de radiación. Para emitir la radiación visible y ultravioleta la cual puede ser de:
 - a. Lámpara de deuterio (o hidrógeno) (160-400nm)
 - b. Lámpara de filamento de tungsteno (380-2500nm)
2. Monocromador. El encargado de seleccionar la longitud de onda que se requiera.
3. Compartimiento de muestra. La muestra se coloca en bases adaptadas para la colocación de celdas de cuarzo, generalmente de 1 cm de paso óptico.
4. Detector. Es el que recibe la energía transmitida por la muestra y la convierte en una señal eléctrica.

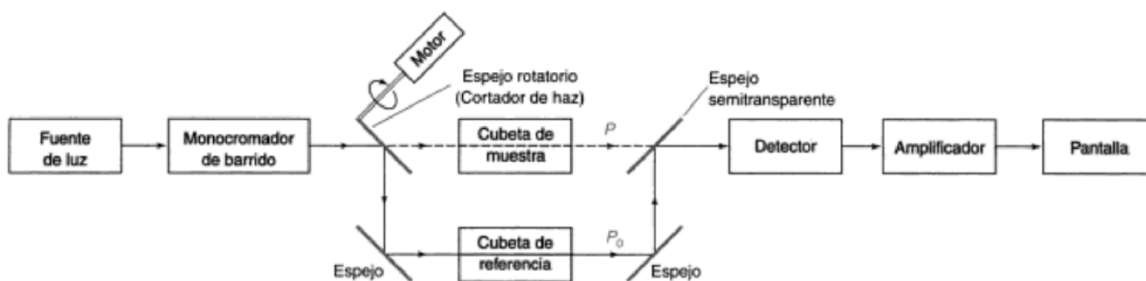


Fig. A1.1 Partes de un espectrofotómetro UV-vis de doble haz.

En la Fig. A1.1, es posible observar un espectrofotómetro de doble haz (Harris, 2007).

Ley de Lambert-Beer-Bouguer

Cuando se hace incidir radiación UV-Vis a una muestra, la energía de la radiación absorbida por los electrones de valencia, los cuales sufren una transición de un de estado menor energía (estado basal) a un estado de mayor energía (estado excitado). Cada molécula presenta estados excitados característicos. La emisión de radiación sucede cuando el electrón libera energía, ya sea en su forma de radiación electromagnética o calor, para pasar de un estado excitado a un estado de menor energía.

Una muestra, con especies capaces de absorber radiación, se le hace incidir una haz de luz, con una potencia inicial (P_0), tendrá la capacidad de cambiar la potencia del haz cuando atraviese la muestra, a una potencia menor (P), debido a que la solución absorbió radiación del haz original (Fig. A1.2).



Fig. A1.2 Fenómeno de absorción de radiación por una muestra

La transmitancia, T , es la fracción de potencia o radiación del haz de luz después de atravesar una muestra, a una longitud de onda específica:

$$T = \frac{P}{P_0} \quad \text{ó} \quad \%T = \frac{P}{P_0} \times 100 \quad (\text{Ec. A1.1})$$

Experimentalmente, se puede medir la absorbancia con un espectrofotómetro UV-Vis. La absorbancia se define como:

$$A = -\log_{10} \frac{P}{P_0} = \log_{10} \frac{P_0}{P} \quad (\text{Ec. A1.2})$$

La absorbancia es directamente proporcional a la concentración del analito absorbente en la solución:

$$A^\lambda = \epsilon^\lambda b C \quad (\text{Ec. A1.3})$$

donde; b es la longitud de paso óptico C es la concentración de la especie absorbente y ϵ^λ es el coeficiente de absorptividad la cual es específica para cada molécula e indica la intensidad con la cual una sustancia absorbe radiación a cierta longitud de onda. Cuando C está dado en molaridad, ϵ^λ se denomina coeficiente de absorptividad molar y sus unidades serán $\text{L cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$.

Esta ecuación es conocida como la Ley de Lambert-Beer-Bouguer o simplemente Ley de Beer. La ley de Beer se cumple para soluciones diluidas, ya que, en soluciones concentradas, las moléculas de analito están muy próximas entre sí generando una mayor interacción entre éstas y así modificando la absorptividad de las especies absorbentes.

Cuando en una solución se tiene más de una especie química que absorbe luz a la misma longitud de onda, la absorbancia queda definida por la suma de las absorbancias de cada una de las especies. A esto se le conoce como ley de las aditividades.

$$A^\lambda = \sum_i A_i^\lambda = \sum_i \epsilon_i^\lambda b C_i \quad (\text{Ec. A1.4})$$

Debido a que el coeficiente de absorptividad molar es específico para cierta longitud de onda, la absorbancia será dependiente, de la concentración de las especies absorbentes, de la longitud del paso óptico y también de la longitud de onda (Cedillo, 2017).

A2. Técnica de espectrofotometría de Infrarrojo (IR).

Un espectrofotómetro de IR (Fig. A2.1), tiene la siguiente instrumentación:

1. Fuente de radiación. Cuerpo negro que produce una radiación continua, en IR medio suele utilizarse una lámpara de filamento de tungsteno.
2. Interferómetro. En la mayoría de IR de transformada de Fourier comerciales, se utiliza un interferómetro de Michelson (Fig. A2.2), que incluye un divisor de haz, espejos, láser y en algunos casos apertura.
3. Accesorio para muestra. Dependiendo de la muestra puede ser para medir transmisión y absorción (discos de haluro de alcali, suspensiones y películas), reflectancia total atenuada (ATR, por sus siglas en inglés), reflectancia difusa, reflectancia especular.



4. Detector. Se pueden encontrar:

- a. Térmicos. Termopares, termopilas, etc.
- b. Piroeléctricos. TGS (sulfato de triglicina) y DTGS (TGS deuterado)
- c. Cuánticos. In(Ga)As, InSb y HgCdTe.

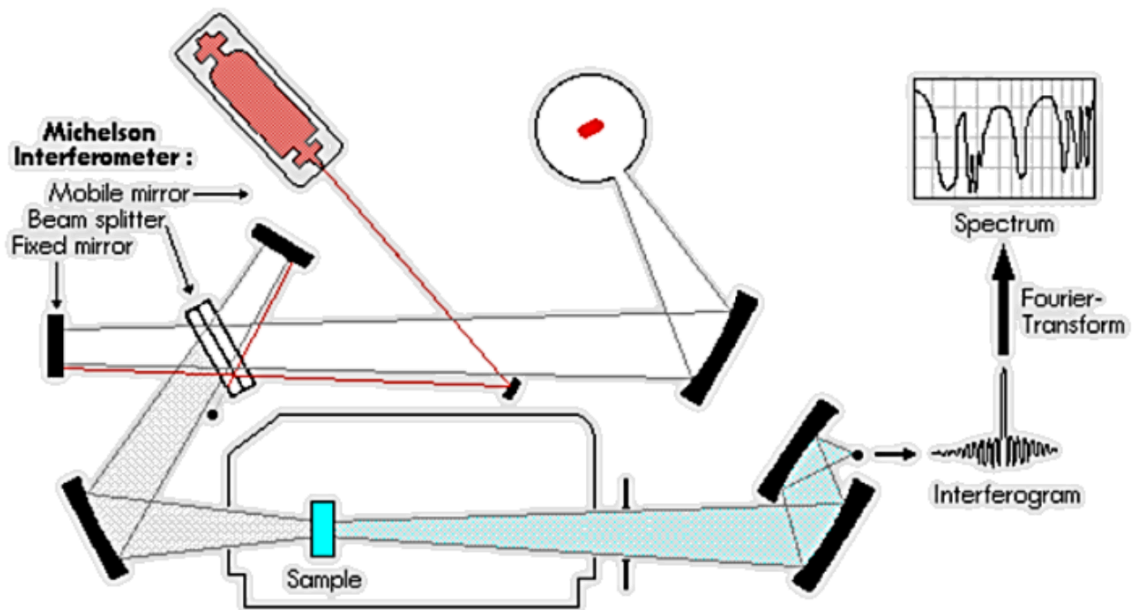


Fig. A2.1. Esquema del interior de una Espectrofotómetro de IR con transformada de Fourier y interferómetro de Michelson

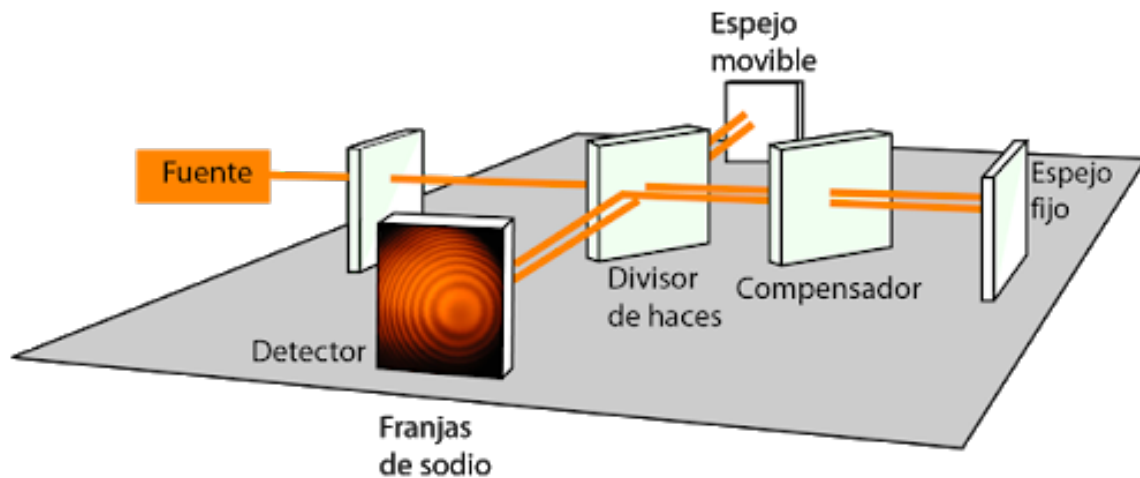


Fig. A2.2. Ejemplo de una interferómetro de Michelson.

Un espectrofotómetro de IR de emisión de banda ancha, emite todas las frecuencias de interés simultáneamente donde la región del IR cercano (NIR, por sus siglas en inglés) es de $14000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$, el IR medio (MIR, por sus siglas en inglés) es de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$, y el IR lejano (FIR, por sus siglas en inglés) es de $400\text{-}10\text{ cm}^{-1}$. La absorción del IR al igual que en UV-Vis está gobernada por la ley de Beer, que antes se ha descrito. El espectro de IR se obtiene al graficar la intensidad (absorbancia o transmitancia) contra el número de onda, el cual es proporcional a las diferencias de energía entre el estado basal y el excitado (Larkin, 2011). Dos componentes importantes en la absorción de IR son: la frecuencia de la radiación y el momento dipolar molecular.

La interacción de la radiación con las moléculas puede describirse en términos de una condición de resonancia donde la frecuencia de radiación oscilante específica coincide con la frecuencia natural de una modo particular de vibración. Para que la energía se transmita del fotón IR a la molécula por absorción, la vibración molecular debe causar un cambio en el momento dipolar de la molécula. Esta es la regla de selección para espectrofotometría IR. La Fig. A2.3, muestra un ejemplo de una molécula diatómica heteronuclear “IR activa”. Este momento dipolar de la molécula cambia conforme lo hace el enlace. Por comparación un ejemplo de una molécula “IR inactiva” es una molécula diatómica mononuclear debido a que su momento dipolar es cero sin importar que tan largo sea el enlace (Stuart, 2005).

Las vibraciones pueden ser cualquier cambio, en la longitud del enlace (estiramiento) o de de ángulo de enlace (flexión) (Fig. A2.4) Algunos enlaces pueden estirarse en fase (estiramiento simétrico) o fuera de fase (estiramiento asimétrico) (Fig. A2.5).

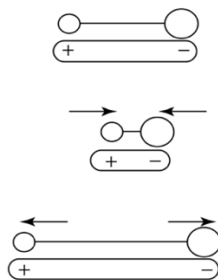


Fig. A2.3. Cambio en el momento dipolar de una molécula diatómica heteronuclear (imagen tomada de Stuart, 2005).

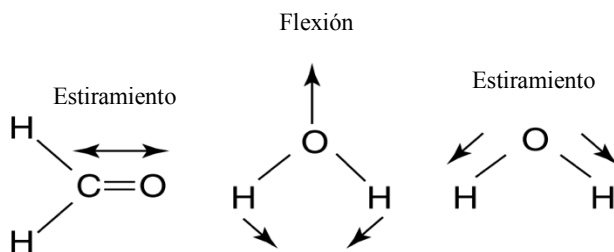


Fig. A2.4. Vibraciones de estiramiento y de flexión (imagen tomada de Stuart, 2005).





Fig. A2.5. Vibraciones simétricas y asimétricas(imagen tomada de Stuart, 2005).

Un espectro típico de IR es obtenido de 4000 a 400cm⁻¹. Dentro de este intervalo es posible diferenciar zonas en las que se pueden identificar grupos funcionales de moléculas orgánicas.

4000-2500cm⁻¹:

Absorción de enlaces simples de Hidrógeno (C-H, O-H ó N-H)

2500-2000 cm⁻¹:

Absorción de triples enlaces (C≡C y C≡N)

2000-1500 cm⁻¹:

Absorción de dobles enlaces (C=C, C=O)

1500-400cm⁻¹:

Huella digital. Absorción debida a otras deformaciones del enlace. Rotación, tijeras y algunas flexiones.

A3. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)

La calorimetría de titulación isotérmicas (ITC, por sus siglas en inglés) es una técnica basada en la medición del calor generado o absorbido cuando interaccionan dos moléculas. Los datos de ITC se usan en muchas áreas, desde química hasta biología celular. ITC es de las técnicas más sensibles para la determinación de la estequiometría de la interacción (N), la constante de afinidad (K) (también llamada estabilidad, constante de asociación o constante de inclusión) y el cambio de entalpía, el cual es el reflejo del calor ganado o pérdida durante la interacción. Además la entropía (ΔS) y la energía libre de Gibbs del proceso puede calcularse con los datos obtenidos por ITC.

Un modelo adecuado debe de aplicarse para el ajuste de las curvas de titulación y los resultados obtenidos por ITC deben ser interpretados cuidadosamente.

El experimento de ITC consiste en adiciones del ligante (L), que es colocado en la jeringa de inyección, al metal o macromolécula (M), que está contenido en la celda de reacción, la celda de referencia se llena con agua (Fig. A3.1). Las celdas de reacción y referencia, idénticas en forma y volumen, están colocadas en escudos de aislamiento térmico y son equilibradas a la temperatura deseada antes de comenzar el experimento.



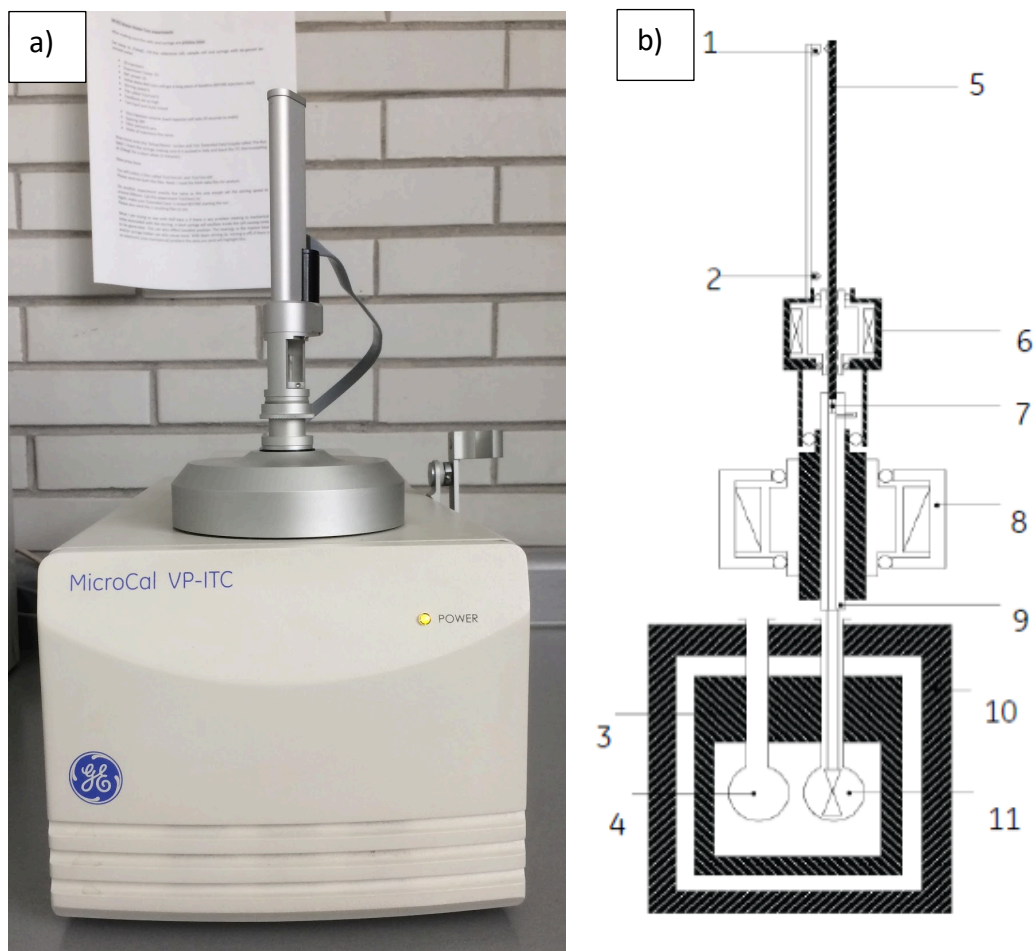


Fig. A3.1. a) Fotografía del equipo VP-ITC del laboratorio 10 de fisicoquímica analítica de FES Cuautitlán. B) Representación esquemática del interior de un VP-ITC (imagen tomada del instructivo del equipo [GE Healthcare]). 1 y 2 sensores, 3 escudo interior, 4 celda de referencia, 5 husillo, 6 inyector, 7 émbolo, 8 jeringa, 9 jeringa, 10 escudo exterior, 11 celda de muestra.

Las adiciones de L pueden ser continuas o por incremento. La adición continua del L se usa solamente para reacciones rápidas y las reacciones lentas pueden ser llevadas a cabo por ambas adiciones. La ventaja que tiene la inyección continua sobre la inyección por incremento es que con la primera se obtiene un número mayor de datos y la curva de valoración que se obtiene suele ser más definida, sobre todo cerca del punto de equivalencia. (Hansen, 2011). Cada inyección representa una reacción independiente que tiende al equilibrio bajo condiciones isobáricas, cuando la temperatura de ambas celdas se mantiene constante. El equipo detecta los cambios de temperatura en cada adición de valorante y compensa la ganancia o pérdida de calor, aplicando o sustrayendo potencia. Cuando una perturbación de la señal de potencia es considerable, por el cambio del ambiente, debido a una inyección, el sistema compensa la potencia hasta que las celdas vuelven a permanecer en equilibrio a la misma temperatura, este proceso gráficamente se observa como un pico, seguido de una línea base estable. Se obtiene un gráfico de la diferencia de calor asociada a la reacción química en función del tiempo (termograma) (Fig. A3.2a).

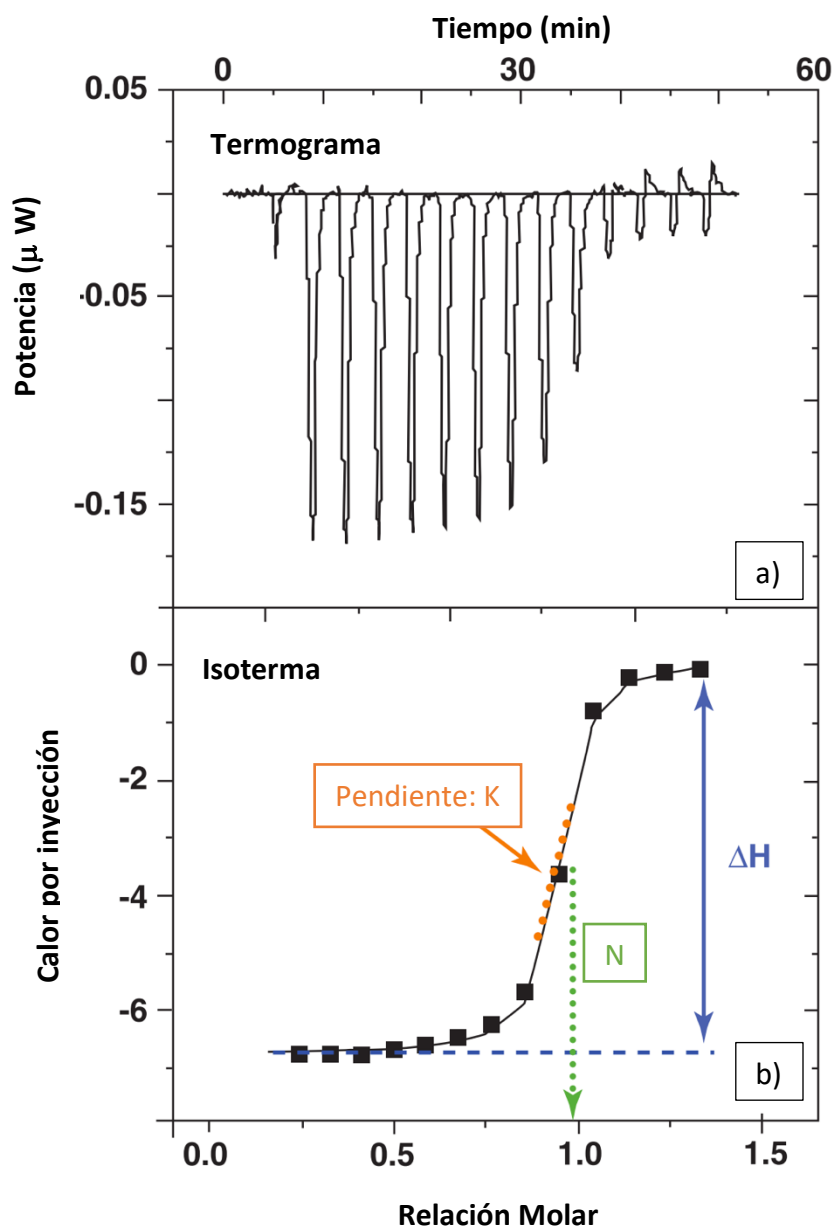


Fig. A3.2. Gráficos obtenidos por la técnica de ITC. En donde se muestra el termograma y la isoterma de la interacción en una interacción en donde $N = 1$.

A partir del termograma, los datos se integran para obtener una isoterma de enlace (Fig. A3.2b), que es la representación gráfica del calor asociado a la reacción en función de la relación molar entre M y L. En el punto de inflexión de la isoterma de enlace corresponde a la relación estequiométrica de la reacción, la diferencia de calor total corresponde a la entalpía de reacción (ΔH) y la pendiente a la constante de equilibrio (K). Esto se cumple si sólo se forma un solo complejo de estequiometría sencilla ó 1:1. [Martínez, 2015; Cedillo, 2019].

Una vez recolectados los datos por ITC se debe elegir un modelo químico que describa el sistema. Los modelos de interacción dependerán del sistema con el que se está trabajando.

A4. Técnica de resonancia paramagnética electrónica (EPR)

La espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR, por sus siglas en inglés) es una herramienta poderosa en el estudio de las estructuras y el entorno de las especies que contienen electrones desapareados, tales como iones metálicos de transición, radicales libres orgánicos y estados electronicamente excitados. EPR es una técnica muy útil para inferir detalles sobre la estructura de complejos formados por iones metálicos paramagnéticos [Garribba, 2006].

Los electrones tienen momentos dipolares magnéticos debido a su momento angular intrínseco (o espín). Para un momento angular de espín, S , el momento magnético asociado (μ_e) es:

$$\mu_e = -g_e \mu_B S$$

donde g es una cantidad adimensional llamada el factor g del electrón, μ_B es el magnetón de Bohr y es igual a $eh/4\pi mc = 9.2731 \times 10^{-24}$ J/T (e y m son la carga y masa del electrón, respectivamente, h es la constante de Planck y c es la velocidad de la luz) (Basu, 2001).

La interacción de un campo magnético aplicado \mathbf{B}_0 (usualmente a lo largo del eje z) con el momento magnético de un electrón, se puede describir por un Hamiltoniano, $\mathcal{H} = g_e \mu_B \mathbf{B}_0 \cdot \boldsymbol{\ell}$ donde $\boldsymbol{\ell}$ es el operador de momento angular. Para el momento de espín angular S , los estados de energía no degenerados $2S+1$, se pueden obtener con $M_s = -1/2$ y $M_s = +1/2$. Esta pérdida de degeneración en la aplicación del momento magnético es llamado el efecto Zeeman (Fig. A4.1).

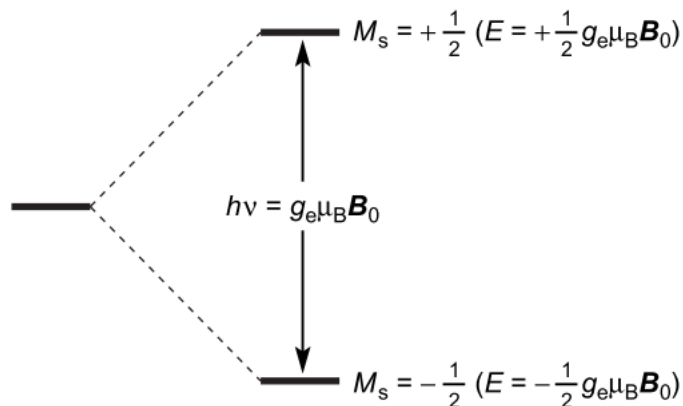


Fig. A4.1. Diagramas de niveles de energía para el efecto Zeeman de un espín desapareado y transiciones de EPR).

En la espectroscopía EPR, una transición es inducida entre los dos niveles M_s por la aplicación de radiación electromagnética adecuada ν (10-1000 J/mol en la región de microondas) que satisface la condición de resonancia $h\nu = g\mu_B B_0$ (Fig. A4.1). Para electrones libres g es 2.0023; sin embargo, en moléculas cuyo electrón desapareado no está libre, su valor varía considerablemente. El movimiento orbital, introducido como resultado del acoplamiento espín orbital lleva a una salida desde el valor g del orbital libre. Esto es particularmente importante para iones de transición metálicos. La energía debida a acoplamientos espín-orbital es comparativamente pequeña que la interacción del campo de



electrones. Por lo tanto, para metales de transición, el efecto del acoplamiento espín-orbital altera el valor de g del electrón libre.

Los núcleos que poseen momento angular de espín exhiben división debido al efecto nuclear Zeeman. Por lo tanto, un espín nuclear I , cuando interacciona con el espín electrónico, perturba la energía del sistema de tal manera que cada estado electrónico se divide en subniveles $2I+1$. Debido a que el magnetón nuclear es cerca de 1000 veces más pequeño que el magnetón de Bohr, las interacciones magnéticas nucleares son débiles, por lo que la separación de la energía entre los subniveles es pequeña. Las transiciones que involucran estos estados dan lugar a división hiperfina en un espectro bien resuelto y se designa como A .

Estructura de un espectrómetro EPR.

En la Fig. A4.2, se muestra un espectrómetro de onda continua convencional. El espectrómetro está compuesto de cuatro grupos: los componentes de la fuente, el sistema del magneto, el sistema de detección, y el sistema de modulación. La función del primer grupo, la fuente, es producir la radiación electromagnética y mantener la muestra en las ondas incidentes.

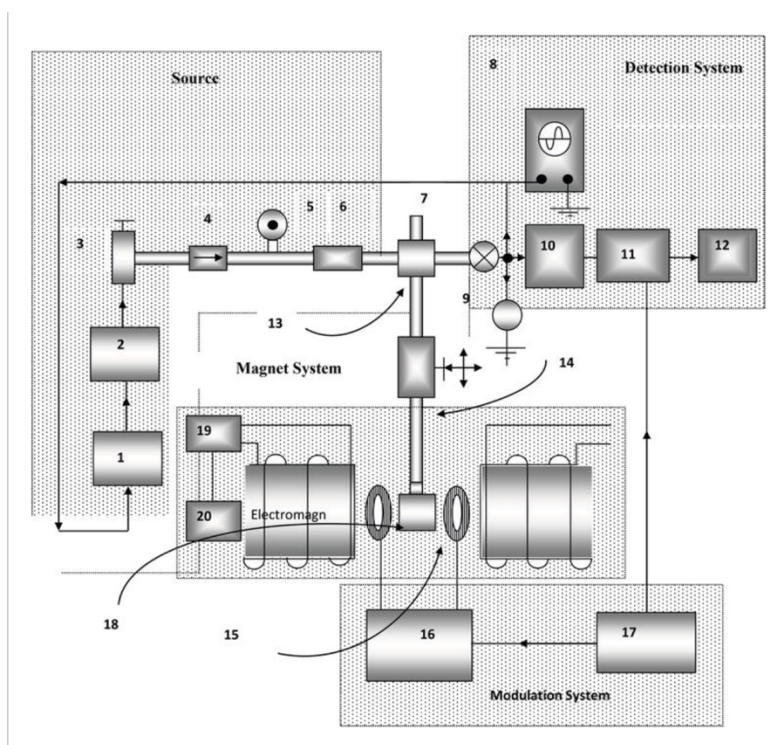


Fig.A4.2. Diagrama de una espectrómetro de EPR de banda X empleando 100kHz de fase sensible de detección. (1) Control de frecuencia automático. (2) Suministro de energía para la fuente de Microondas. (3)Fuente de microondas (klystron o pistola de diodo). (4) Aislador. (5)Contador de frecuencia. (6) Atenuador. (7) Carga final. (8) Osciloscopio. (9) Cristal detector. (10) Amplificador de señal de 100 kHz. (11) detector de señal de 100 kHz. (12) Computadora. (13) Soporte circular o híbrido. (14) Cavidad del sistema. (15) Bobinas de modulación de 100kHz. (16) Amplificador de potencia de 100kHz. (17) oscilador de 100kHz. (18) Cavidad de resonancia. (19) Suministro de energía del magneto. (20) Unidad de escaneo de campo.

La región de la fuente también controla y dirige las microondas incidentes. El sistema del magneto ayuda a proveer el campo magnético necesario para dividir los niveles de energía;

el campo debe ser homogéneo y estable sobre el intervalo deseado. Los sistemas de modulación y detección actúan para amplificar la señal recibida y registrarla (Maghraby, 2019).

Espectros de EPR del ión Cu(II).

En situaciones regulares (Fig A4.3), cuando el estado basal es el orbital $d_{x^2-y^2}$ ó d_{z^2} , el espectro EPR es axial, con ejes y y x equivalentes y dos valores $g_{//}$ (g_z) y g_{\perp} ($g_x = g_y$). Cuando la geometría es un octaédro elongado, una pirámide cuadrada o cuadrado plano, el estado basal es el orbital $d_{x^2-y^2}$:

$$g_{//} = g_z = 2.0023 \pm \frac{8\lambda}{E(d_{x^2-y^2})-E(d_{xy})} \quad (\text{Ec. A4.1})$$

$$g_{\perp} = g_x = g_y = 2.0023 \pm \frac{2\lambda}{E(d_{x^2-y^2})-E(d_{xz})} = 2.0023 \pm \frac{2\lambda}{E(d_{x^2-y^2})-E(d_{yz})} \quad (\text{Ec. A4.2})$$

donde λ es la constante de acoplamiento espin-orbital para el ión Cu(II) y E son las energías del orbital. En estos casos se espera una relación $g_{//} > g_{\perp} > 2.0023$ (*espectro normal*).

En los situaciones inversas (Fig. A4.4), el estado basal es el orbital d_{z^2} y las componentes perpendiculares y paralelas del tensor g pueden describirse por las siguientes ecuaciones:

$$g_{//} = g_z = 2.0023 \quad (\text{Ec. A4.3})$$

$$g_{\perp} = g_x = g_y = 2.0023 \pm \frac{6\lambda}{E(d_{z^2})-E(d_{xz})} = 2.0023 \pm \frac{6\lambda}{E(d_{z^2})-E(d_{yz})} \quad (\text{Ec. A4.4})$$

un espectro de este tipo se caracteriza por $g_{\perp} > g_{//} = 2.0023$.

En situaciones intermedias (Fig. A4.5), un espectro “rómboico” se puede esperar observándose 3 valores de g. Para estos complejos el parámetro R puede indicar el predominio del orbital d_{z^2} ó $d_{x^2-y^2}$ en el estado basal.

$$R = \frac{g_y - g_z}{g_x - g_y} \quad (\text{Ec. A4.5})$$

con $g_x > g_y > g_z$. Si $R > 1$, la contribución es más grande por el estado basal que surge del orbital d_{z^2} ; si $R < 1$, la contribución mayor se da por el estado basal $d_{x^2-y^2}$ (Garrriba, 2006).

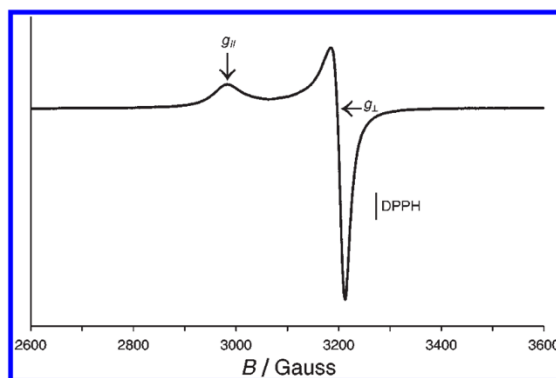


Fig. A4.3. Espectro de $[Cu(\text{etilendiamina})_2(\text{ClO})_4]_2$. Situación Regular.

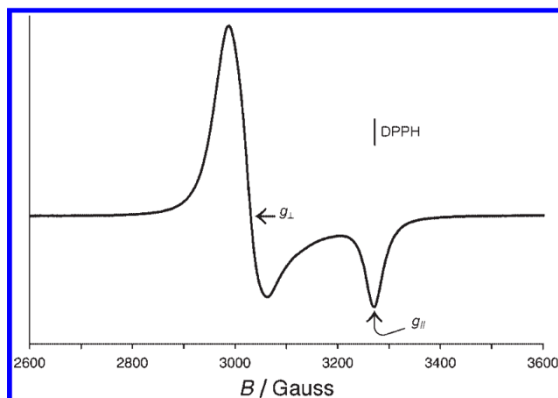


Fig. A4.4. Espectro de $[Cu(\text{fenantrolina})_2Cl]ClO_4$. Situación Inversa.

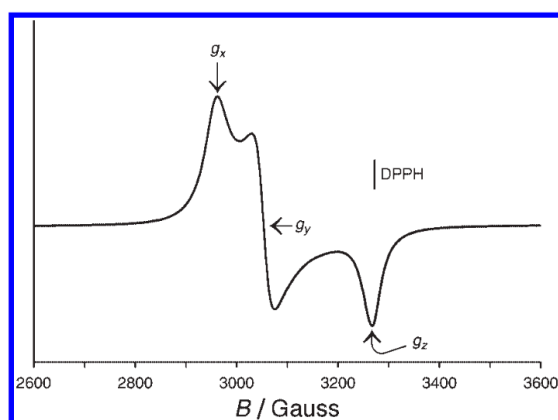


Fig. A4.5. Espectro de $[Cu(\text{fenantrolina})_2(H_2O)](NO_3)_2$. Situación intermedia.

A5. Programas computacionales utilizados.

SQUAD

Para el análisis de los experimentos de relaciones molares por UV-Vis, se utilizó el programa que calcula los cocientes de estabilidad a partir de datos de absorbancia (SQUAD, por sus siglas en inglés, Stability Quotients from Absorbance Data). SQUAD es un programa escrito en lenguaje FORTRAN (por sus siglas en inglés, Formula translation). Está diseñado para refinar constantes de equilibrio de un modelo químico propuesto, a partir de datos de absorbancia obtenidos a diferentes longitudes de onda y a diferente composición, empleando un enfoque no lineal de mínimos cuadrados. El programa tiene la capacidad de refinar constantes de equilibrio de complejos del tipo $M_m M_l' H_j L_n L_q'$, donde $m, l, n, q \geq 0$ y j es positivo (protones), negativo (iones hidróxido) o cero. También es útil para equilibrios ácido-base, además de protonados ó hidroxocomplejos.

Para el refinamiento de las constantes de equilibrio, el algoritmo se basa en la ley de aditividad y la ley de Beer, para calcular los coeficientes de absorptividad (ϵ). El programa trata datos de absorbancia, para un cierto número de longitudes de onda y un cierto número de soluciones. Para cada valor de absorbancia $A_{i,k}$ se puede definir la siguiente ecuación:

$$A_{i,k} = \sum_1^J [\textit{species}]_{i,j} \times \varepsilon_{j,k} \quad (\text{Ec. A5.1})$$

donde; la concentración de la j -ésima especie en la i -ésima solución (espectro) y $\varepsilon_{j,k}$ es la absorptividad molar de la j -ésima especies en la k -ésima longitud de onda. SQUAD computa los valores de la(s) constante(s) general(es) de formación las cuales minimizan la suma de los cuadrados residuales entre los valores observados y los calculados:

$$U = \sum_1^K \sum_1^I (A_{i,k}^{obs} - A_{i,k}^{calc})^2 \quad (\text{Ec. A5.2})$$

Los cálculos más básicos de SQUAD se basan en variar los parámetros a dos niveles. En el cual en un nivel superior, se varían las constantes de equilibrio para la formación de varias especies y para cada set de constantes de equilibrio, SQUAD calcula, para cada longitud de onda separadamente, los valores de las absorptividades molares que minimizan las contribuciones de U . Además del ajuste a dos niveles, SQUAD usa otras subrutinas de cálculo, que controlan el refinamiento y el cálculo numérico, usando enfoques clásicos como Gauss-Newton o Newton-Raphson. Los calculos se repiten (iteración) hasta tener diferencias entre las constantes calculadas menores del 0.1%, en este punto, se considera que el programa convergió.

Los siguientes parámetros estadísticos, que arroja SQUAD, ayudan a determinar si el modelo químico propuesto explica la información experimental (Martínez, 2015; Morales, 1993)

- Parámetro de correlación (matriz): determina la asociación entre las variables, su valor va de cero a uno, es una medida de la dependencia lineal entre las variables.
- La desviación estándar sobre los datos de absorbancia (σ): es un indicativo de la validez del modelo químico propuesto.
- La desviación estándar sobre las constantes: valores del 1 % son aceptables.
- La desviación estándar por espectro y desviación estándar sobre los coeficientes de absorptividad molar: dependen de las desviaciones estándar en los datos de absorbancia y de las constantes calculadas.
- Valores de U menores de 10^{-2}

MEDUSA

Otro programa utilizado, fue MEDUSA (Make Equilibrium Diagrams Using Sophisticated Algorithms), el cual es un software con el que es posible crear diversas representaciones gráficas del sistema químico estudiado, a partir de los valores refinados de las constantes de equilibrio. Se pueden crear diagramas de distribución de especies, logarítmicos y de zonas de predominio.

Para la construcción de dichos diagramas se tiene el apoyo de una base de datos llamada HYDRA (Hydrochemical Equilibrium Data Base), que contiene valores de constantes de formación a 25 °C, utiliza los datos de constantes de equilibrio desarrollada por el Department of Inorganic Chemistry, Royal Institute of Technology (KTH) en Estocolmo Suiza. Algunos de los elementos que constituyen el archivo de entrada son: el número de componentes del sistema, número de complejos formados y especies sólidas, tanto de complejos como de componentes, la estequiometría de cada uno de los complejos y los valores de sus constantes de equilibrio, la concentración de trabajo, la fuerza iónica y la

temperatura [Bernabé-Pineda, 2009; Gómez-Zaleta, 2006; Puigdomenech <https://www.kth.se/en/che/medusa>].

AFFINIMETER.

El programa utilizado para determinar la constante de inclusión y los parámetros termodinámicos, es Affinimeter, la versión utilizada fue la versión en línea. Este software se usa para el análisis de eventos enlazantes de medidas experimentales de diferentes orígenes. Affinimeter puede analizar datos, principalmente, de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) y resonancia magnética nuclear (RMN), pero también espectroscópicos.

Para ITC, durante un experimento típico, se obtiene la señal de la potencia aplicada en función del tiempo (Fig. A3.2a). Las señales de potencia aplicada se perturba debido a los pequeños cambios del sistema, que pueden ser debidas a la agitación o cambios de temperatura en el ambiente y también debido a perturbaciones grandes debido a inyecciones. La señal del periodo de inyección-recuperación se registra como un pico de potencia contra tiempo. La colección de los picos para una titulación completa debe ser integrada. Para esto Affinimeter genera una línea base para cada inyección, que se resta de la señal obtenida. Esto lo realiza usando funciones ortogonales de cominación lineal (polinomiales de Legendre de primero, segundo y tercer grado). Una vez que los picos se han integrado, se genera la isoterma de equilibrio o de enlace (Fig. A3.2b). La integral de cada pico representa el calor liberado o absorbido debido a la reacción de enlace que se llevó a cabo en la celda de reacción.

Existen diversos programas para el análisis de interacciones intermoleculares, como Origin ó PEAQ para ITC. Generalmente, estos programas computacionales pueden clasificarse como software que sólo ofrece una lista de modelos predeterminados o software que permite la implementación de nuevos modelos. La generación y validación de nuevos modelos no es algo sencillo debido a que no hay resultados de referencia disponibles, además de que se necesita experiencia y herramientas avanzadas.

Affinimeter ha resuelto este problema al adoptar diferentes estrategias -el uso de ecuaciones generalizadas para las dos familias principales de modelos de enlace, llamados *equilibrios estequiométricos* (SE, por sus siglas en inglés) y *sitios independiente* (IS, por su siglas en inglés). Debido a que las ecuaciones son generalizados, la cantidad de modelos disponibles para cada familia son virtualmente ilimitados.

Los modelos SE se basan en constantes de equilibrio estequiométrico (o macroscópico) y son típicamente aplicadas a interacciones de baja estequiometría, donde los diferentes sitios de enlace pueden acoplarse entre sí. Los modelos IS, se basan en constantes de equilibrio para sitios específicos (o microscópicos) donde los diferentes sitios de enlace no interactúan entre sí, aunque se pueden agrupar en conjuntos, donde los sitios tienen afinidades idénticas y entalpías de interacción con las especies involucradas.

Para los modelos SE se considera la interacción entre 3 componentes M , L y Z , formando complejos de cualquier estequiometría. Para escribir las ecuaciones es conveniente escribir las ecuaciones en términos de constantes de equilibrio globales:



$$\beta_{mly} = \frac{[M_xL_yZ_z]}{([M]^m \cdot [L]^x \cdot [Z]^z)} \quad (\text{Ec. A5.4})$$



La ecuación usada por afinimeter para el análisis de datos de ITC bajo el esquema estequiométrico SE es:

$$\Delta Q_i = \frac{\{-Q_{syr,i} + (Q_{i+1} - Q_i) + Q_{corr,i} + \Delta H_{dil} \cdot ([L_{syr}] - [L]_{T,i}) + Q_{db}\}}{([L_{syr}] \cdot v_{inj,i})} \quad (\text{Ec. A5.5})$$

donde; ΔQ_i es el calor absorbido o emitido por mol de L adicionado durante la inyección i. La presencia de M y Z es opcional en cualquier experimento. $Q_{syr,i}$ es el calor total requerido para formar todas las especies químicas presentes en el volumen inyectado ($v_{inj,i}$). Q_i es el calor requerido para formar todas las especies químicas presentes en la celda. $Q_{corr,i}$ es la contribución de calor asociado con la muestra que esta siendo desplazada (que no está en contacto con la sección de la celda en donde el sensor de temperatura) durante la inyección. $[L_{syr}]$ es la concentración de la jeringa, $[L]_{T,i}$ es la concentración en la celda de reacción después de cada adición. Q_{db} es una corrección por el desplazamiento de línea base debido a fenómenos físicos.

Bajo el esquema estequiométrico IS la ecuación utilizada es:

$$\Delta Q_i = \frac{\{(Q_{i+1} - Q_i) + Q_{corr,i} + \Delta H_{dil} \cdot ([L_{syr}] - [L]_{T,i}) + Q_{db}\}}{([L_{syr}] \cdot v_{inj,i})} \quad (\text{Ec. A5.6})$$

El término $Q_{syr,i}$ se remueve debido a que la macromolécula ó (M) no pueden estar en la jeringa.

Para los datos de ITC, los ajustes de los parámetros para cada modelo están numéricamente determinados por la minimización de la función objetivo:

$$\chi^2 = \frac{1}{p} \sum_1^p \frac{(\Delta Q_i^{exp} - \Delta Q_i)^2}{\sigma_i^2} \quad (\text{Ec. A5.7})$$

donde p es el número total de puntos, ΔQ_i^{exp} son los valores de la isoterma de equilibrio experimental, ΔQ_i está dado por las ecuaciones XXXX, y σ_i es la incertidumbre de cada punto. Para optimizar la convergencia, se usan los algoritmos de cristalización simulada (simulated annealing) y Levenberg-Marquardt, de manera secuencial. Además, durante el proceso iterativo se usó el algoritmo Newton-Raphson usando la regla de Armijo para obtener las concentraciones de las especies libres M, L y Z.

Lo que se busca en un experimento es obtener los valores χ^2 más pequeños posibles, para asignarlo a un mejor ajuste. Idealmente, para una combinación de medidas experimentales razonablemente buenas, los valores de χ^2 deben acercarse a la unidad, lo que significa que la diferencia entre ΔQ_i^{exp} y ΔQ_i se explica esencialmente por las incertidumbres σ_i . En práctica, los valores de χ^2 puede ser difícil para asignarlo a medidas informativas de la calidad del ajuste que guía al usuario en la selección del modelo correcto para analizar los datos. En general el valor cercano a la unidad corresponde a buen ajuste, pero el valor absoluto de este parámetro depende mucho de las incertidumbres de los puntos y su valor no está limitado, por lo que es difícil decir si un valor de χ^2 de 5, 10 ó 20 es aceptable. Affinimeter espera mejorar estos problemas en versiones más recientes (Piñeiro, 2019).



A6. Método de relaciones molares (RM).

Considerando la reacción:



Cuya constante de formación está dada por:

$$\beta = \frac{[M_xL_y]}{[M]^x[L]^y} \quad (\text{Ec. A6.2})$$

Es posible determinar la estequiometría para una reacción de complejación en el que está involucrada una macromolécula o un metal (M) con un ligante (L). En el método de relaciones molares (RM), se mantiene fija la concentración de alguno de los reactivos y la concentración del otro reactivo se varía. A cada cambio de concentración, del reactivo que se varía, se determina alguna propiedad fisicoquímica o respuesta (R) que esté relacionada con la concentración, ya se de alguno de los reactivos (M ó L), del complejo formado (M_xL_y) o ambos. Si sólo el complejo, M_xL_y , es el responsable de la propiedad fisicoquímica a medir, entonces R puede definirse como:

$$R = k_{M_xL_y} [M_xL_y] \quad (\text{Ec. A6.3})$$

donde $k_{M_xL_y}$ es el factor de respuesta.

La representación gráfica, de R en función de la RM, para reacciones cuantitativas, se obtiene una trayectoria recta y un cambio de pendiente, el cual corresponde a la RM estequiométrica. En la Fig. A6.1a, se presenta el gráfico típico de RM para una reacción cuantitativa en donde sólo el complejo formado da lugar a la respuesta. Otra ventaja de emplear el método de RM es que se pueden estudiar la formación de complejos sucesivos, siempre y cuando los valores de las constantes de formación sean considerablemente distintas y los factores de respuesta no sean iguales. (Fig. A6.1b).

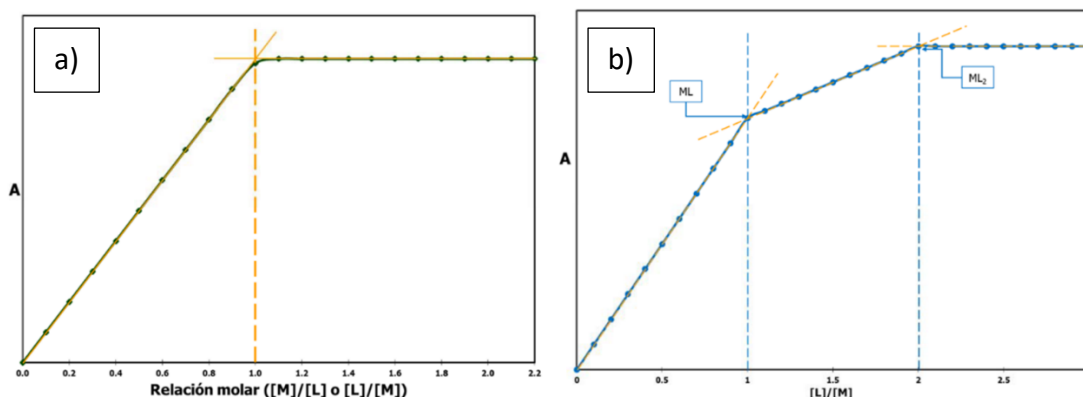


Fig. A6.1. Espectros típicos para experimento de RM de reacciones cuantitativas donde se observan los cambios de pendiente para a) complejos de relación 1:1 y b) complejos de la forma ML_n .



Para reacciones poco cuantitativas, es decir, que la constante de formación del complejo es menor de 10^3 , es el que se presenta en la gráfica como puede observarse en la Fig. A6.2.

Para reacciones poco cuantitativas no puede determinarse la relación estequiométrica entre ambos reactivos. Lo que si nos proporciona información es la representación gráfica de las respuestas en función del logaritmo negativo de la concentración del analito que varía en el método de relaciones molares o a la partícula (P) ($pP = -\log[P]$). A partir de la Fig. A6.3, se puede estimar el valor de la constante de formación en donde se presenta un cambio pronunciado en la pendiente de la curva que se obtiene.

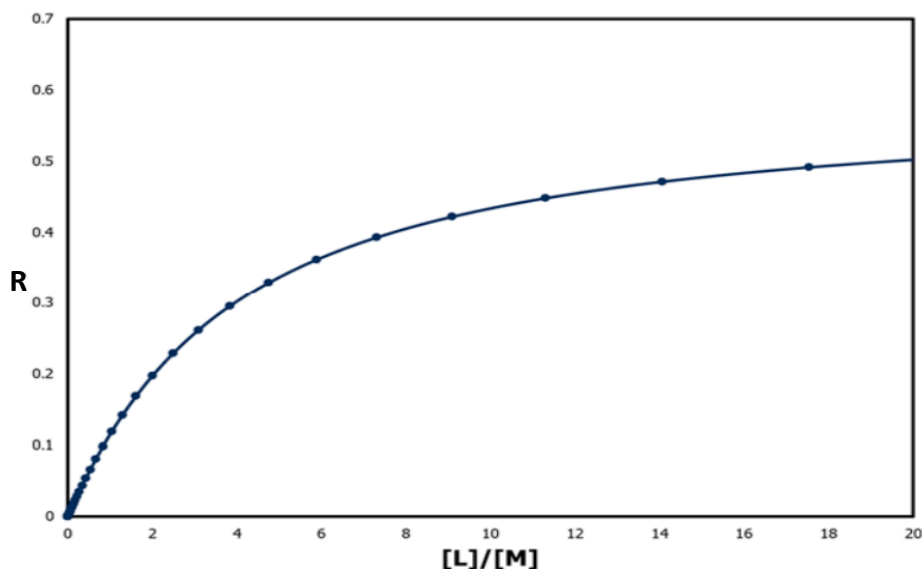


Fig. A6.2. Representación gráfica de R contra la relación molar ($[L]/[M]$) para la formación de un complejo M_xL_y , con un $\log \beta < 3$.

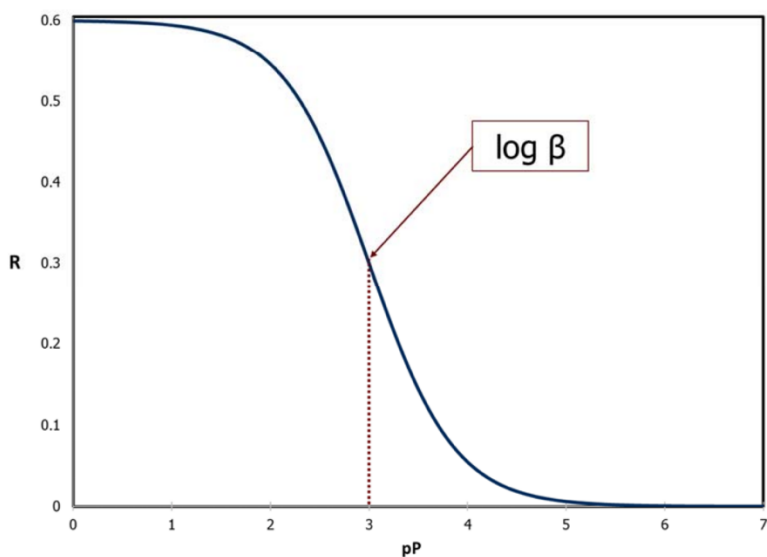


Fig. A6.3. Respuesta en función del pP

A7. Gráficos de absorbancia corregida a 229 nm contra el pCD, de la interacción IMC con CDs por UV-Vis a pH 5 y 7.

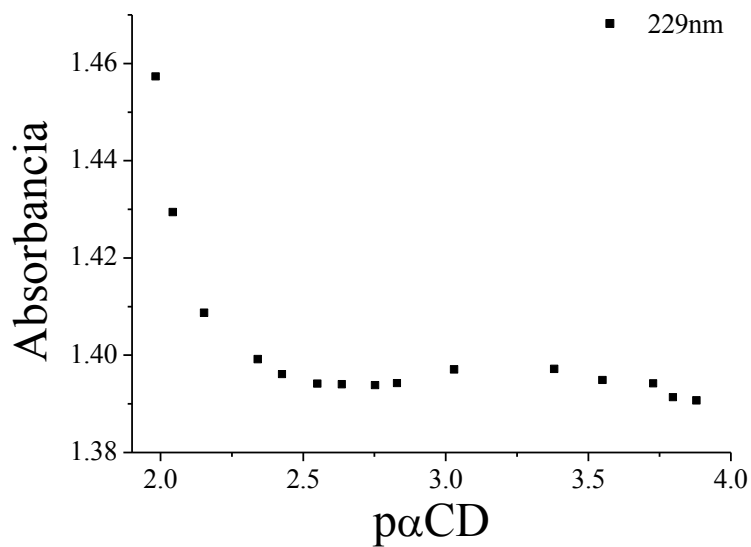


Fig. A7.1. Gráfico de Absorbancia corregida a 229 nm contra el pCD del experimento de interacción de IMC con α -CD a pH 5.

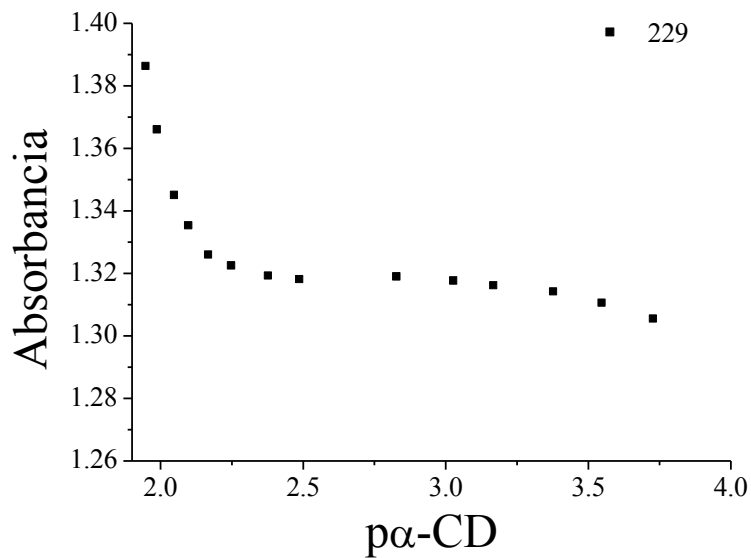


Fig. A7.2. Gráfico de Absorbancia corregida a 229 nm contra el pCD del experimento de interacción de IMC con α -CD a pH 7.

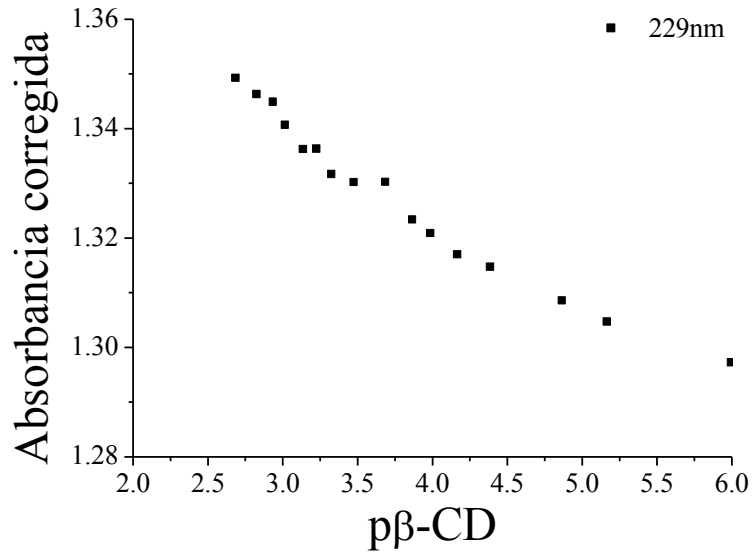


Fig. A7.3. Gráfico de Absorbancia corregida a 229 nm contra el pCD del experimento de interacción de IMC con β -CD a pH 5.

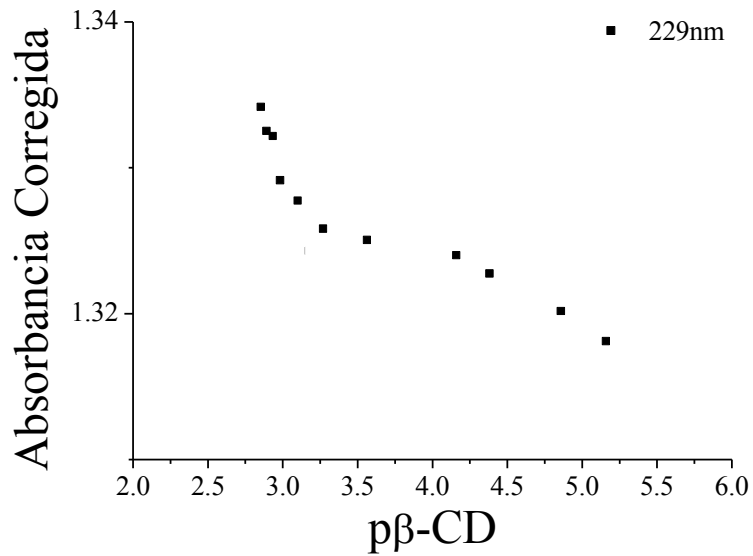


Fig. A7.4. Gráfico de Absorbancia corregida a 229 nm contra el pCD del experimento de interacción de IMC con β -CD a pH 7.



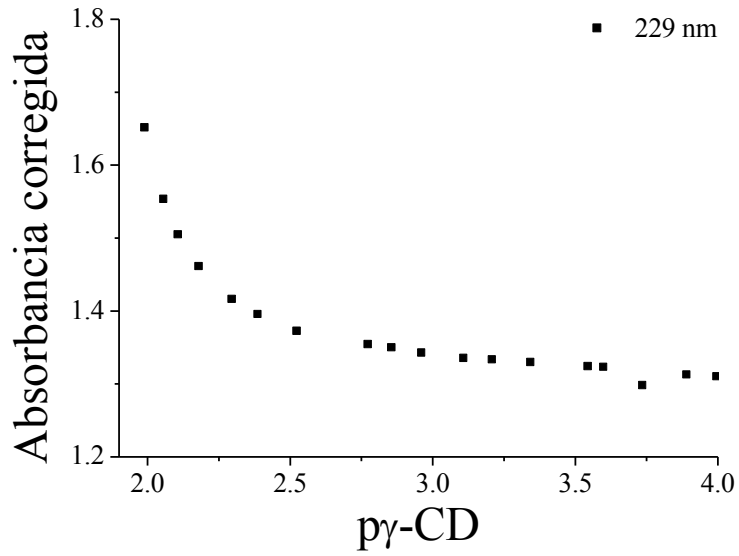


Fig. A7.5. Gráfico de Absorbancia corregida a 229 nm contra el pCD del experimento de interacción de IMC con γ -CD a pH 5.

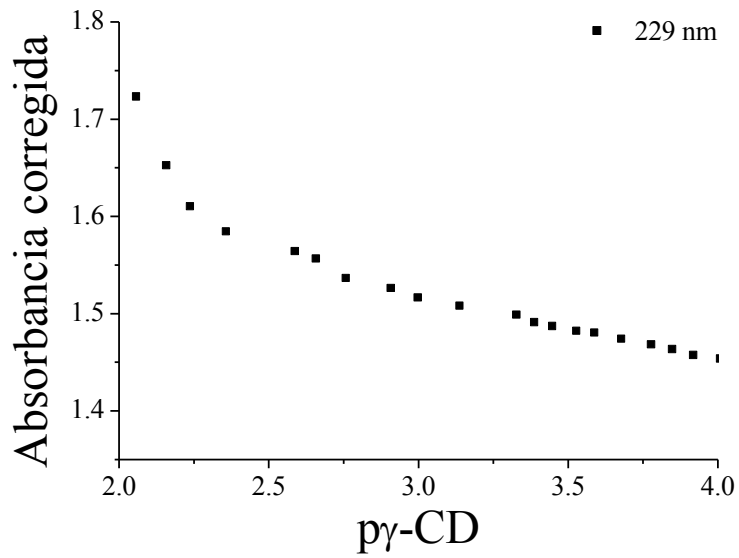


Fig. A7.6. Gráfico de Absorbancia corregida a 229 nm contra el pCD del experimento de interacción de IMC con γ -CD a pH 7.

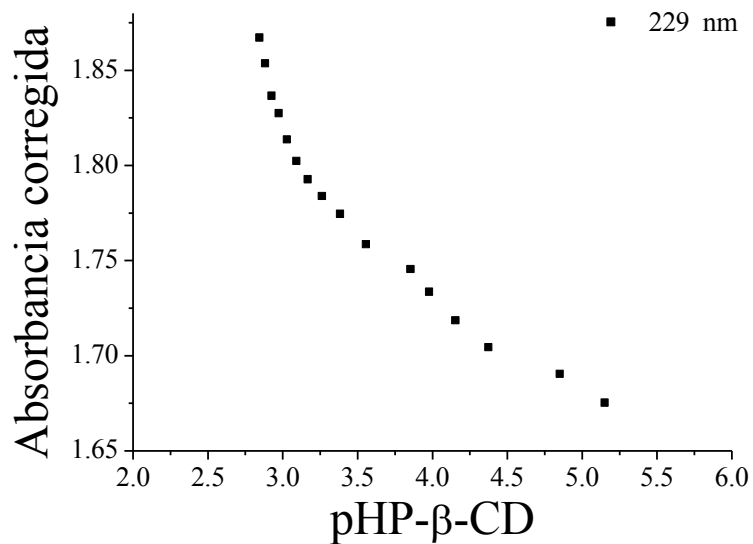


Fig. A7.7. Gráfico de Absorbancia corregida a 229 nm contra el pCD del experimento de interacción de IMC con HP-β-CD a pH 5.

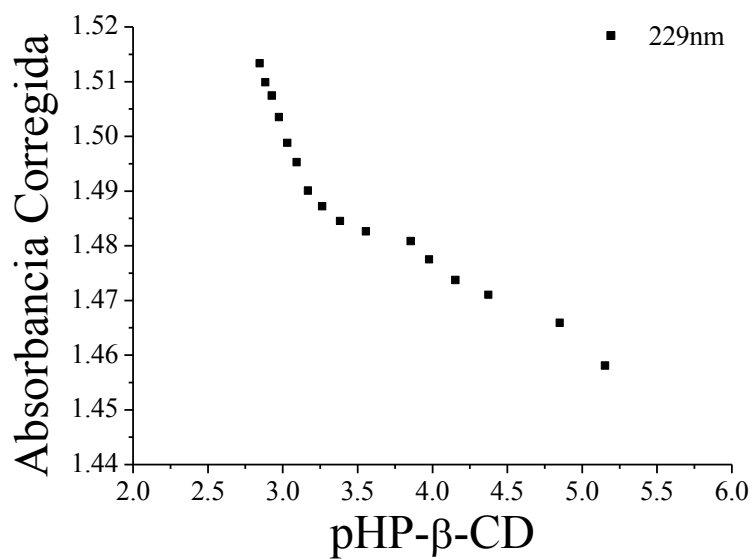


Fig. A7.8. Gráfico de Absorbancia corregida a 229 nm contra el pCD del experimento de interacción de IMC con HP-β-CD a pH 7.



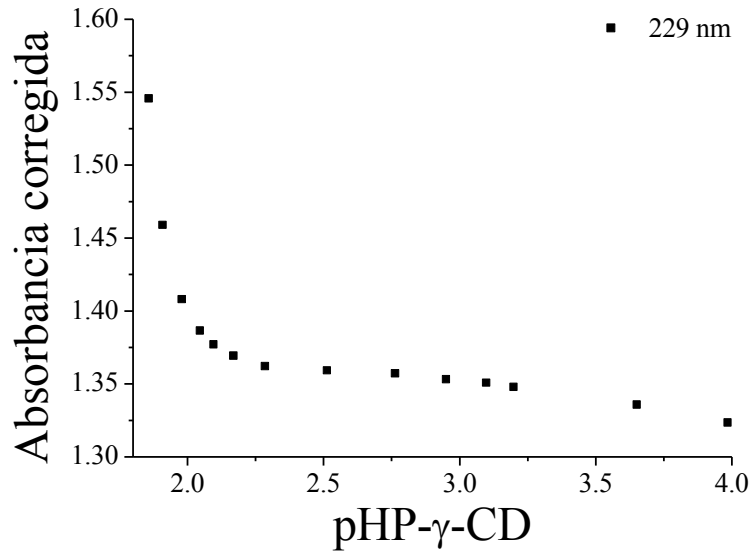


Fig. A7.9. Gráfico de Absorbancia corregida a 229 nm contra el pCD del experimento de interacción de IMC con HP- γ -CD a pH 5.

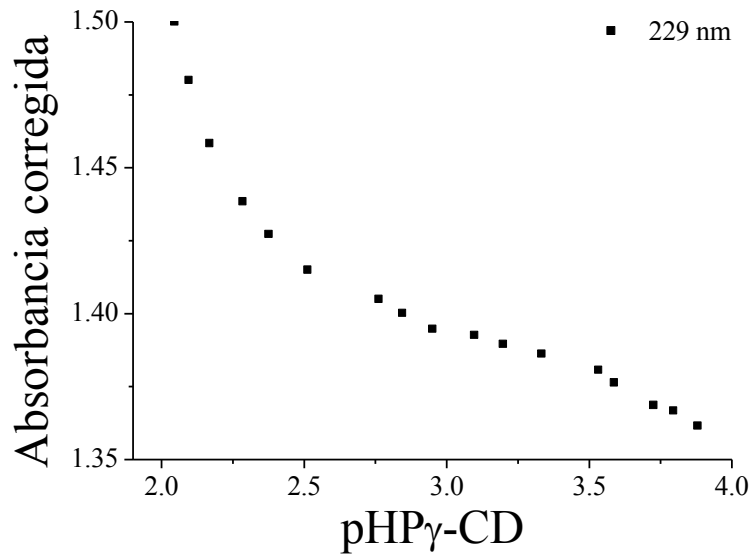


Fig. A7.10. Gráfico de Absorbancia corregida a 229 nm contra el pCD del experimento de interacción de IMC con HP- γ -CD a pH 7.



A8. Información obtenida por cada técnica.

Técnica	Información obtenida.	Uso de información.
UV-Vis	Información del espectro de UV-Vis de la IMC.	Para determinar los máximos y como varían los mismos en función del pH y en función a la inclusión con CD. Determinación de pKa de la IMC y $\log K_{1:1}$.
	Cuantificación de Cu(II) y Zn(II) en solución.	Se supo qué cantidad de iones estaban disueltos en solución acuosa cuando fueron incluidos en CDs.
IR	Espectro IR de la IMC.	Permitió observar las vibraciones asimétricas y simétricas del carboxilato de la IMC y diferenciarlo de la HIMC y la materia prima para su obtención.
	Información del espectro complejos Cu(IMC) ₂ (H ₂ O) ₂ y Zn(IMC) ₂ (H ₂ O) ₂ .	Se logró proponer la manera del enlace del ión metálico con IMC. Siendo las especies quelato o puente, las posibles estructuras en los sólidos Cu(IMC) ₂ (H ₂ O) ₂ y Zn(IMC) ₂ (H ₂ O) ₂ .
ITC	Información de los parámetros termodinámicos de interacción entre IMC con las diferentes CDs.	Ayudó a determinar las fuerzas moleculares, que se llevan a cabo, para que la IMC interactúe con la CD de tal manera que explique la inclusión. Proponiendo un modelo de enlace 1:1 de inclusión.
	Información de los parámetros termodinámicos de la interacción entre M(IMC) ₂ con las diferentes CDs	Ayudó a determinar las fuerzas moleculares, que se llevan a cabo, para que los complejos M(IMC) ₂ interactúen con CDs de tal manera que se lleva a cabo la inclusión. Proponiendo un modelo de enlace de inclusión independiente y sucesivo.
EPR	Un gráfico de los sólido de CuIMC.	El sólido presentó señales típicas para un complejo mononuclear, con ligeras impurezas de complejo dinuclear.
	Un gráfico de los complejos Cu(IMC) ₂ CD ₂ con las diferentes CDs en solución acuosa	Ayudó a determinar que las especies mononucleares de los complejos Cu(IMC) ₂ CD ₂ son especies mononucleares, con posible estructura octaédrica elongada o cuadrada plana.
XRPD	Difractogramas de la sal de IMC	Ayudó a identificar la sal de IMC y observar que era una especie distinta a la HIMC
	Complejo en sólido de Zn(IMC) ₂ (H ₂ O) ₂	Permitió comparar las señales con las comparadas con la literatura para identificar al complejo mononuclear Zn(IMC) ₂ (H ₂ O) ₂
RMN	Espectro de RMN de protón en agua deuterada de la sal de IMC.	Las respuestas de los protones de la molécula permitieron constatar la estructura de la sal de IMC.



Referencias.



-
- Abou-Mohamed, G., El-Kashef, H. A., Salem, H. A., & Elmazaf, M. M. (1995). Effect of Zinc on the Anti-Inflammatory and Ulcerogenic Activities of Indometacin and Diclofenac. *Pharmacology*, 50(4), 266–272. <https://doi.org/10.1159/000139292>
- AFFINImeter- The software for molecular interactions [WWW Document], n.d. URL <https://www.affinimeter.com/site/> (accessed 1.21.20).
- Aguirre, C., Goto, Y., Costas, M., 2016. Thermal and chemical unfolding pathways of PaSdsA1 sulfatase, a homo-dimer with topologically interlinked chains. *FEBS Lett.* 590, 202–214. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12041>
- Alsarra, I. A., Ahmed, M. O., Alanazi, F. K., Eltahir, K. E. H., Alsheikh, A. M., & Neau, S. H. (2010). Influence of cyclodextrin complexation with NSAIDs on NSAID/cold stress-induced gastric ulceration in rats. *International Journal of Medical Sciences*. <https://doi.org/10.7150/ijms.7.232>
- Andrade, T. C., Martins, R. M., & Freitas, L. A. P. (2015). Granulation of indomethacin and a hydrophilic carrier by fluidized hot melt method: The drug solubility enhancement. *Powder Technology*, 270(PB), 453–460. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2014.07.030>
- Backensfeld, T., Müller, B. W., & Kolter, K. (1991). Interaction of NSA with cyclodextrins and hydroxypropyl cyclodextrin derivatives. *International Journal of Pharmaceutics*, 74(2–3), 85–93. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(91\)90225-D](https://doi.org/10.1016/0378-5173(91)90225-D)
- Backensfeld, T., Müller, B.W., Wiese, M., Seydel, J.K., 1990. Effect of Cyclodextrin Derivatives on Indomethacin Stability in Aqueous Solution. *Pharm. Res. An Off. J. Am. Assoc. Pharm. Sci.* 7, 484–490. <https://doi.org/10.1023/A:1015860531565>
- Baes, Jr., C. F. and Mesmer, R. E. (1976). *The hydrolysis of cations*. J. Wiley & Sons, New York. Libro
- Basu, P. (2001). Use of EPR spectroscopy in elucidating electronic structures of paramagnetic transition metal complexes. *Journal of Chemical Education*, 78(5), 666–669. <https://doi.org/10.1021/ed078p666>
- Bender, M. L., & Komiyama, M. (1978). *Cyclodextrin Chemistry* (Vol. 6). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-66842-5>
- Bernabé-Pineda M.. Estudio de especiación química de los compuestos orgánicos diisopropiliminodiacetoamida y curcumina con iones de interés farmacéutico y clínico, Tesis Doctorado en Ciencias (Químicas). UAM. (2009). pp.: 101-104
- Botting, R. M. (2010). Vane’s discovery of the mechanism of action of aspirin changed our understanding of its clinical pharmacology. *Pharmacological Reports*, 62(3), 518–525. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(10\)70308-X](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(10)70308-X)



-
- Bouchemal, K., & Mazzaferro, S. (2012). How to conduct and interpret ITC experiments accurately for cyclodextrin-guest interactions. *Drug Discovery Today*, 17(11–12), 623–629. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.01.023>
- Breslow, R. (1982). Artificial enzymes. *Science*, 218(4572), 532–537. <https://doi.org/10.1126/science.7123255>
- Breslow, R., Bovy, P., & Hersh, C. L. (1980b). Reversing the Selectivity of Cyclodextrin Bisimidazole Ribonuclease Mimics by Changing the Catalyst Geometry. *Journal of the American Chemical Society*, 102(6), 2115–2117. <https://doi.org/10.1021/ja00526a072>
- Breslow, R., Hammond, M., & Lauer, M. (1980a). Selective transamination and optical induction by a .beta.-cyclodextrin-pyridoxamine artificial enzyme. *Journal of the American Chemical Society*, 102(1), 421–422. <https://doi.org/10.1021/ja00521a093>
- Broser, W., & Lautsch, W. (1953). Einschlußverbindungen und Verbindungen mit Einschlußbezirken in Lösung1. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section B Journal of Chemical Sciences*, 8(12), 711–722. <https://doi.org/10.1515/znb-1953-1203>
- Brune, K., & Hinz, B. (2004). The discovery and development of antiinflammatory drugs. *Arthritis and Rheumatism*, 50(8), 2391–2399. <https://doi.org/10.1002/art.20424>
- Budavari, S. (1989). *The merck index: Vol. II*. Merck & Co., Rahway.
- Buer, J. K. (2014). Origins and impact of the term ‘NSAID.’ *Inflammopharmacology*, 22(5), 263–267. <https://doi.org/10.1007/s10787-014-0211-2>
- Burgess, J., & Prince, R. H. (2011). Zinc: Inorganic & Coordination ChemistryBased in part on the article Zinc: Inorganic & Coordination Chemistry by Reg H. Prince which appeared in the Encyclopedia of Inorganic Chemistry, First Edition . . *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*. <https://doi.org/10.1002/9781119951438.eibc0242>
- Buvári, A., & Barcza, L. (1988). Complex formation of phenol, aniline, and their nitro derivatives with β -cyclodextrin. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 4, 543–545. <https://doi.org/10.1039/P29880000543>
- Cantillo, E. A., Delgado, D. R., & Martinez, F. (2013). Solution thermodynamics of indomethacin in ethanol + propylene glycol mixtures. *Journal of Molecular Liquids*, 181, 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2013.02.008>
- Casella, R., Williams, D. ., & Jambhekar, S. (1998). Solid-state β -cyclodextrin complexes containing indomethacin, ammonia and water. II. Solubility studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 165(1), 15–22. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(98\)00003-9](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(98)00003-9)



-
- Casella, R., Williams, D., Jambhekar, S., (1998). Solid-state β -cyclodextrin complexes containing indomethacin, ammonia and water. I. Formation studies. *Int. J. Pharm.* 165, 1–14. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(97\)00330-X](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(97)00330-X)
- Casu, B., & Reggiani, M. (1966). Conformation of Amylose and its Derived Products. I. Infrared Spectra of Amylose and its Oligomers in the Amorphous Solid Phase and in Solution. *Starch - Stärke*, 18(7), 218–229. <https://doi.org/10.1002/star.19660180704>
- Chakraborty, S., Sehanobish, E., & Sarkar, M. (2010). A traditional painkiller as a probe for microheterogeneity in 1-propanol-water mixtures. *Chemical Physics Letters*, 501(1–3), 118–122. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2010.10.050>
- Chen, X., Griesser, U. J., Te, R. L., Pfeiffer, R. R., Morris, K. R., Stowell, J. G., & Byrn, S. R. (2005). Analysis of the acid–base reaction between solid indomethacin and sodium bicarbonate using infrared spectroscopy, X-ray powder diffraction, and solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 38(4), 670–677. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.02.017>
- Comer, J., Judge, S., Matthews, D., Towers, L., Falcone, B., Goodman, J., & Dearden, J. (2014). The intrinsic aqueous solubility of indomethacin. *Admet & Dmpk*, 2(1), 18–32. <https://doi.org/10.5599/admet.2.1.33>
- Cooper, A., 1999. Thermodynamic analysis of biomolecular interactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3, 557–563. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(99\)00008-3](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(99)00008-3)
- Cooper, A., Johnson, C.M., Lakey, J.H., Nöllmann, M., (2001). Heat does not come in different colours: entropy–enthalpy compensation, free energy windows, quantum confinement, pressure perturbation calorimetry, solvation and the multiple causes of heat capacity effects in biomolecular interactions. *Biophys. Chem.* 93, 215–230. [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(01\)00222-8](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(01)00222-8)
- Costas Basin, M. (2015). Calor y proteínas. *Revista Digital Universitaria*, 16, 1–11. <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num1/art02/>
- Costas, M., Kronberg, B., & Silveston, R. (1994). General thermodynamic analysis of the dissolution of non-polar molecules into water. Origin of hydrophobicity. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 90(11), 1513. <https://doi.org/10.1039/ft9949001513>
- Cramer, F. (1956). Einschlußverbindungen. *Angewandte Chemie*, 68(3), 115–120. <https://doi.org/10.1002/ange.19560680306>
- Cramer, F., & Henglein, F. M. (1957). Über Einschlußverbindungen, XI. Gesetzmässigkeiten bei der Bildung von Addukten der Cyclodextrine. *Chemische Berichte*, 90(11), 2561–2571. <https://doi.org/10.1002/cber.19570901122>



-
- Cramer, F., & Hettler, H. (1967). Inclusion compounds of cyclodextrins. *Die Naturwissenschaften*, 54(24), 625–632. <https://doi.org/10.1007/BF01142413>
- Cedillo Flores, O. E. (2017). *Determinación de las constantes de disociación ácida del 2,6-bis(morfolin-4-ilmetil)-4-nitrofenol y de las constantes de formación de complejos con Cu(II)*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cedillo Flores, O. E. (2019). *Determinación de las constantes de formación de complejos de inclusión de los componentes principales del aceite esencial de orégano (Carvacrol y Timol) en β -ciclodextrina*. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Crini, G. (2014). Review: A History of Cyclodextrins. *Chemical Reviews*, 114(21), 10940–10975. <https://doi.org/10.1021/cr500081p>
- Danil de Namor, A.F., Traboulssi, R., Lewis, D.F.V., 1990. Host Properties of Cyclodextrins toward Anion Constituents of Antigenic Determinants. A Thermodynamic Study in Water and in N, N-Dimethylformamide. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 8442–8447. <https://doi.org/10.1021/ja00179a031>
- Dillon, C. T., Hambley, T. W., Kennedy, B. J., Lay, P. a, Zhou, Q., Davies, N. M., Biffin, J. R., & Regtop, H. L. (2003). Gastrointestinal Toxicity, Antiinflammatory Activity, and Superoxide Dismutase Activity of Copper and Zinc Complexes of the Antiinflammatory Drug Indomethacin. *Chemical Research in Toxicology*, 16(1), 28–37. <https://doi.org/10.1021/tx020078o>
- Dillon, C.T., Hambley, T.W., Kennedy, B.J., Lay, P.A., Weder, J.E., Zhou, Q., 2004. Copper And Zinc Complexes as Antiinflammatory Drugs, in: Sigel, A., Sigel, H. (Eds.), *Metal Ions in Biological Systems*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Docherty, J. C., & Wilson, T. W. (1987). Indomethacin increases the formation of lipoxygenase products in calcium ionophore stimulated human neutrophils. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 148(2), 534–538. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(87\)90909-0](https://doi.org/10.1016/0006-291X(87)90909-0)
- Dubach, U. C., Rosner, B., & Pfister, E. (1983). Epidemiologic Study of Abuse of Analgesics Containing Phenacetin. *New England Journal of Medicine*, 308(7), 357–362. <https://doi.org/10.1056/NEJM198302173080703>
- Dubbini, A., Censi, R., Martena, V., Hoti, E., Ricciutelli, M., Malaj, L., & Di Martino, P. (2014). Influence of pH and method of crystallization on the solid physical form of indomethacin. *International Journal of Pharmaceutics*, 473(1–2), 536–544. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.07.030>
- Duchêne, D. (2011). Chapter 1: Cyclodextrins and their inclusion complexes. In *Cyclodextrins in Pharmaceutics, cosmetics, and biomedicine*. (1st ed.). Bilensoy, E. (Ed.). Wiley.



-
- Dunitz, J.D., 1995. Win some, lose some: enthalpy-entropy compensation in weak intermolecular interactions. *Chem. Biol.* 2, 709–712. [https://doi.org/10.1016/1074-5521\(95\)90097-7](https://doi.org/10.1016/1074-5521(95)90097-7)
- Endo, T., Nagase, H., Ueda, H., Kobayashi, S., & Nagai, T. (1997). Isolation, Purification, and Characterization of Cyclomaltodecaose (.EPSILON.-Cyclodextrin), Cyclomaltoundecaose (.ZETA.-Cyclodextrin) and Cyclomaltotridecaose (.THETA.-Cyclodextrin). *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*, 45(3), 532–536. <https://doi.org/10.1248/cpb.45.532>
- Fadhil Ali, K., Rasool Mahmood Albakaa, A., & Hussein Ali, Z. (2015). New assay method UV spectroscopy for determination of Indomethacin in pharmaceutical formulation. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(4), 1591–1596.
- Ferreira, S. H., Moncada, S., & Vane, J. R. (1971). Indomethacin and Aspirin abolish Prostaglandin Release from the Spleen. *Nature New Biology*, 231(25), 237–239. <https://doi.org/10.1038/newbio231237a0>
- Fini, A., Feroci, G., & Fazio, G. (2001). Interaction between indomethacin and heavy metal ions in aqueous solution. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(2), 213–217. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00097-5](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00097-5)
- Fischer, J., & Ganellin, C. R. (2010). Analogue-Based Drug Discovery II. In *Analogue-Based Drug Discovery II*. Wiley-VCH. <https://doi.org/10.1002/9783527630035>
- Fitzpatrick, F. (2004). Cyclooxygenase Enzymes: Regulation and Function. *Current Pharmaceutical Design*, 10(6), 577–588. <https://doi.org/10.2174/1381612043453144>
- French, D. (1957a). The Schardinger Dextrins. In *Advances in Carbohydrate Chemistry* (Vol. 12, Issue C, pp. 189–260). [https://doi.org/10.1016/S0096-5332\(08\)60209-X](https://doi.org/10.1016/S0096-5332(08)60209-X)
- French, D. (1957b). [3] Preparation of Schardinger dextrins. In *Enzyme* (Vol. 2900, Issue 1939, pp. 17–20). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(57\)03341-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(57)03341-8)
- French, D., & McIntire, R. L. (1950). Studies on the Schardinger Dextrins. V. Periodate Oxidation 1. *Journal of the American Chemical Society*, 72(11), 5148–5150. <https://doi.org/10.1021/ja01167a095>
- French, D., & Rundle, R. E. (1942). The Molecular Weights of the Schardinger Alpha and Beta Dextrins. *Journal of the American Chemical Society*, 64(7), 1651–1653. <https://doi.org/10.1021/ja01259a050>
- French, D., Levine, M. L., Norberg, E., Nordin, P., Pazur, J. H., & Wild, G. M. (1954). Studies on the Schardinger Dextrins. VII. Co-substrate Specificity in Coupling Reactions of Macerans Amylase 1,2. *Journal of the American Chemical Society*, 76(9), 2387–2390. <https://doi.org/10.1021/ja01638a027>
-



-
- French, D., Pazur, J. H., Norberg, E., & Levine, M. L. (1949a). Studies on the Schardinger Dextrins. The Preparation and Solubility Characteristics of Alpha, Beta and Gamma Dextrins1. *Journal of the American Chemical Society*, 71(1), 353–356. <https://doi.org/10.1021/ja01169a100>
- French, D., Pazur, J. H., Norberg, E., & Levine, M. L. (1949b). Studies on the Schardinger Dextrins. The Preparation and Solubility Characteristics of Alpha, Beta and Gamma Dextrins1. *Journal of the American Chemical Society*, 71(1), 353–356. <https://doi.org/10.1021/ja01169a100>
- Freudenberg K., Cramer F., Plieninger H. Verfahren zur Herstellung von Einschlussverbindungen Physiologisch Wirksamer Organischer Verbindungen. DE895769C. German Patent. 1953 Nov 5.
- Freudenberg, K. (1939). Polysaccharides and Lignin. *Annual Review of Biochemistry*, 8(1), 81–112. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.08.070139.000501>
- Freudenberg, K. (1943). Beiträge zur Chemie der Kohlenhydrate. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, 76(8), A71–A96. <https://doi.org/10.1002/cber.19430760815>
- Freudenberg, K., & Cramer, F. (1948). *Die Konstitution der Schardinger-Dextrine a, b und g*. 3b, 464.
- Freudenberg, K., & Cramer, F. (1950). Über die Schardinger Dextrine aus Stärke. *Chemische Berichte*, 83(3), 296–304. <https://doi.org/10.1002/cber.19500830319>
- Freudenberg, K., & Jacobi, R. (1935). Über Schardingers Dextrine aus Stärke. *Justus Liebig's Annalen Der Chemie*, 518(1), 102–108. <https://doi.org/10.1002/jlac.19355180107>
- Freudenberg, K., & Meyer-delius, M. (1938). *Karl Freudenberg und Margot Meyer-Delius: Über die Schardinger-Dextrine aus Stärke*. 71, 1596–1600.
- Freudenberg, K., & Rapp, W. (1936b). Zur Kenntnis der Stärke und der Schardinger-Dextrine. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, 69(9), 2041–2045. <https://doi.org/10.1002/cber.19360690908>
- Freudenberg, K., Blomqvist, G., Ewald, L., & Soff, K. (1936a). Hydrolyse und Acetolyse der Stärke und der Schardinger-Dextrine. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, 69(6), 1258–1266. <https://doi.org/10.1002/cber.19360690606>
- Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A. V.; Bloino, J.; Janesko, B. G.; Gomperts, R.; Mennucci, B.; Hratchian, H. P.; Ortiz, J. V.; Izmaylov, A. F.; Sonnenberg, J. L.; Williams-Young, D.; Ding, F.;



Lipparini, F.; Egidi, F.; Goings, J.; Peng, B.; Petrone, A.; Henderson, T.; Ranasinghe, D.; Zakrzewski, V. G.; Gao, J.; Rega, N.; Zheng, G.; Liang, W.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Throssell, K.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M. J.; Heyd, J. J.; Brothers, E. N.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Keith, T. A.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A. P.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Millam, J. M.; Klene, M.; Adamo, C.; Cammi, R.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Fox, D. J. Gaussian 16, Revision C.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.

Frömming, K.-H., & Szejtli, J. (1994). *Cyclodextrins in Pharmacy* (Vol. 5). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-015-8277-3>

Fujiwara, T., Tanaka, N., & Kobayashi, S. (1990). Structure of δ -Cyclodextrin 13.75H₂O. *Chemistry Letters*, 19(5), 739–742. <https://doi.org/10.1246/cl.1990.739>

Gaisford, S., & O'Neill, M. A. A. (2006). *Pharmaceutical Isothermal Calorimetry*. In *Pharmaceutical Isothermal Calorimetry*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420004779>

Garribba, E., & Micera, G. (2006). The determination of the geometry of Cu(II) complexes. An EPR spectroscopy experiment. *Journal of Chemical Education*, 83(8), 1229–1232. <https://doi.org/10.1021/ed083p1229>

GE Healthcare, (n.d.). *MicroCal™ VP-ITC system Instrucciones de funcionamiento 28-9639-79*.

Gómez-Zaleta B.. Determinación de las constantes de acidez de la mangiferina y su interacción con algunos iones metálicos en medio acuoso, Tesis Doctorado. UAM. (2006)

Gould, S., Scott, R.C., 2005. 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD): A toxicology review. *Food Chem. Toxicol.* 43, 1451–1459. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.03.007>

Grosser, T., Emer, S., & FitzGerald, G. A. (2012). Antiinflamatorios, antipiréticos y analgésicos; farmacoterapia de la gota. In L. L. Brunton, B. A. Chabner, & B. C. Knollmann (Eds.), *Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica* (12th ed.). McGraw-Hill.

Hale, W. S., & Rawlins, L. C. (1951). Amylase of *Bacillus macerans*. *Cereal Chem.*, 28, 49.

Hamada, Y., Nambu, N., & Nagai, T. (1975). Interactions of α - and β -Cyclodextrin with Several Non-Steroidal Antiinflammatory Drugs in Aqueous Solution. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 23(6), 1205–1211. <http://ci.nii.ac.jp/naid/110003622005/en/>



-
- Hamai, S., & Satoh, N. (1997). Inclusion effects of cyclomaltohexa- and heptaose (α - and β -cyclodextrins) on the acidities of several phenol derivatives. *Carbohydrate Research*, 304(3–4), 229–237. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(97\)00279-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(97)00279-6)
- Hamdan, I.I., El-Sabawi, D., Abdel Jalil, M. (2016). Potential interaction between zinc ions and a cyclodextrin-based diclofenac formulation. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 42, 418–428. <https://doi.org/10.3109/03639045.2015.1071834>
- Hansen, L. D., Fellingham, G. W., & Russell, D. J. (2011). Simultaneous determination of equilibrium constants and enthalpy changes by titration calorimetry: Methods, instruments, and uncertainties. *Analytical Biochemistry*, 409(2), 220–229. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.11.002>
- Harada, A. (2004). Construction and Functions of Supramolecular Polymers. *Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan*, 62(5), 464–470. <https://doi.org/10.5059/yukigoseikyokaishi.62.464>
- Harada, A., Takashima, Y., & Yamaguchi, H. (2009). Cyclodextrin-based supramolecular polymers. *Chemical Society Reviews*, 38(4), 875. <https://doi.org/10.1039/b705458k>
- Harris, D. C. (2007). *Análisis Químico Cuantitativo*. Barcelona, España: Reverté.
- Hart, F. D., & Boardman, P. L. (1963). Indomethacin: A New Non-Steroid Anti-Inflammatory Agent. *Br Med J*, 2(5363), 965–970. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.5363.965>
- Hennrich, N., & Cramer, F. (1965). Inclusion Compounds. XVIII. 1 The Catalysis of the Fission of Pyrophosphates by Cyclodextrin. A Model Reaction for the Mechanism of Enzymes. *Journal of the American Chemical Society*, 87(5), 1121–1126. <https://doi.org/10.1021/ja01083a032>
- Higuchi, T., Connors, K. A. (1965). Phase solubility techniques. In *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation* (pp. 117–212).
- Hipólito-Nájera, A.R., del Rosario Moya-Hernández, M., Rojas-Hernández, A., Gómez-Balderas, R., 2019. Interaction of indomethacin–cyclodextrins in water by UV–Vis and ITC. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 95, 55–62. <https://doi.org/10.1007/s10847-019-00915-9>
- Hirayama, K. (1967). *Handbook of Ultraviolet and Visible Absorption Spectra of Organic Compounds*. Plenum Press.
- Husain, M. A., Ishqi, H. M., Sarwar, T., Rehman, S. U., & Tabish, M. (2017). Interaction of indomethacin with calf thymus DNA: a multi-spectroscopic, thermodynamic and molecular modelling approach. *MedChemComm*, 8(6), 1283–1296. <https://doi.org/10.1039/C7MD00094D>
-



-
- Hybl, A., Rundle, R. E., & Williams, D. E. (1965). The Crystal and Molecular Structure of the Cyclohexaamylose-Potassium Acetate Complex 1. *Journal of the American Chemical Society*, 87(13), 2779–2788. <https://doi.org/10.1021/ja01091a001>
- Iohara, D., Hirayama, F., Ishiguro, T., Arima, H., & Uekama, K. (2008). Preparation of amorphous indomethacin from aqueous 2,6-di-O-methyl- β -cyclodextrin solution. *International Journal of Pharmaceutics*, 354(1–2), 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.11.010>
- Ishioka, T., Murata, A., Kitagawa, Y., & Nakamura, K. T. (1997). Zinc(II) Acetate Dihydrate. *Acta Crystallographica Section C Crystal Structure Communications*, 53(8), 1029–1031. <https://doi.org/10.1107/S0108270197004484>
- Jabali, B., & Abu Ali, H. (2016). New zinc(II) complexes of the Non-steroidal Anti-Inflammatory Drug (indomethacin) and various nitrogen donor ligands. Synthesis, characterization and biological activity. *Polyhedron*, 117, 249–258. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2016.06.003>
- Jain, A., 2008. Solubilization of indomethacin using hydrotropes for aqueous injection. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68, 701–714. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.06.013>
- Jambhekar, S., Casella, R., & Maher, T. (2004). The physicochemical characteristics and bioavailability of indomethacin from β -cyclodextrin, hydroxyethyl- β -cyclodextrin, and hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexes. *International Journal of Pharmaceutics*, 270(1–2), 149–166. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.10.012>
- Jambhekar, S.S., Breen, P., 2016. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations II: solubilization, binding constant, and complexation efficiency. *Drug Discov. Today* 21, 363–368. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.11.016>
- James, W. J., French, D., & Rundle, R. E. (1959). Studies on the Schardinger dextrans. IX. Structure of the cyclohexaamylose-iodine complex. *Acta Crystallographica*, 12(5), 385–389. <https://doi.org/10.1107/S0365110X59001141>
- Jeffreys, D. (2004). *Aspirin : the remarkable story of a wonder drug*. Bloomsbury.
- Jelesarov, I., & Bosshard, H. R. (1999). Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *Journal of Molecular Recognition*, 12(1), 3–18. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1352\(199901/02\)12:1<3::AID-JMR441>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1352(199901/02)12:1<3::AID-JMR441>3.0.CO;2-6)
- Jennifer, S. J., & Muthiah, P. T. (2013). Synthesis, characterization and X-ray structural studies of four copper (II) complexes containing dinuclear paddle wheel structures. *Chemistry Central Journal*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-35>



Kainuma, K. Starch oligosaccharides: Linear, branches and cycli. In *Starch. Chemistry and Technology*, 2nd ed., Whistler, R. L. BeMiller, J. N., Paschall, E.F., Eds., Academic Press Ltd.: London, 1984; Chapter V, p 125.

Kalsi, P. S. (2006). *Spectroscopy of organic compounds*. New Age International.

Karmwar, P., Graeser, K., Gordon, K. C., Strachan, C. J., & Rades, T. (2012). Effect of different preparation methods on the dissolution behaviour of amorphous indomethacin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 80(2), 459–464. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.10.006>

König, W., Brom, J., Schönfeld, W., Knöller, J., & Stüning, M. (1987). Effect of tenoxicam and indomethacin on the release of histamine, prostaglandin E2 and leukotrienes from various cells. *Arzneimittel-Forschung*, 37(3), 296–299. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2439092>

Kulkarni, S., Gupta, S. P., Upmanyu, N., & Tonpay, S. D. (2011). Solubility enhancement of water insoluble drug for ophthalmic formulation. *International Journal of Drug Delivery*, 3(1), 141–148. <https://doi.org/10.5138/ijdd.2010.0975.0215.03064>

Kurkov, S. V., & Loftsson, T. (2013). Cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*, 453(1), 167–180. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.055>

Larkin, P. (2011). *Infrared and Raman Spectroscopy*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2010-0-68479-3>

Larsen, K. L.; Ueda, H.; Zimmermann. (1997) *8th European congress on biotechnology, Budapest 17-21 August 1997 : book of abstracts*. Hungarian Biochemical Society.

Leggett, D.J., 1985. SQUAD, in: *Computational Methods for the Determination of Formation Constants*. Springer US, Boston, MA, pp. 159–220. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4934-1_6

Lindner, K., & Saenger, W. (1978). β -Cyclodextrin Dodecahydrate: Crowding of Water Molecules within a Hydrophobic Cavity. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 17(9), 694–695. <https://doi.org/10.1002/anie.197806941>

Lindner, K., & Saenger, W. (1982). Crystal and molecular structure of cyclohepta-amylose dodecahydrate. *Carbohydrate Research*, 99(2), 103–115. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)81901-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)81901-1)

Liu, Y., Cao, R., Chen, Y., & He, J. Y. (2008). Effect of β -cyclodextrin charge type on the molecular recognition thermodynamics of reactions with (ferrocenylmethyl)dimethylaminium derivatives. *Journal of Physical Chemistry B*, 112(5), 1445–1450. <https://doi.org/10.1021/jp0760206>



-
- Loftsson, T., & Brewster, M. E. (1996). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(10), 1017–1025. <https://doi.org/10.1021/js950534b>
- Lucas, S. (2016). The Pharmacology of Indomethacin. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 56(2), 436–446. <https://doi.org/10.1111/head.12769>
- Maghraby, M. A. (2019). Introductory Chapter: Electron Paramagnetic Resonance. In *Topics From EPR Research*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.83028>
- Mahmud, S., & Rosen, N. (2019). History of NSAID Use in the Treatment of Headaches Pre and Post-industrial Revolution in the United States: the Rise and Fall of Antipyrine, Salicylic Acid, and Acetanilide. *Current Pain and Headache Reports*, 23(1), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s11916-019-0744-6>
- Mann, C. C., & Plummer, M. L. (1991). *The aspirin wars : money, medicine, and 100 years of rampant competition*. Knopp. pp. 42–49.
- Mansouri, A., Lurie, A.A., 1993. Methemoglobinemia. *Am. J. Hematol.* 42, 7–12. <https://doi.org/10.1002/ajh.2830420104>
- Marnett, L. J., & Kalgutkar, A. S. (1999b). Cyclooxygenase 2 inhibitors: discovery, selectivity and the future. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20(11), 465–469. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(99\)01385-1](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(99)01385-1)
- Marnett, L. J., Rowlinson, S. W., Goodwin, D. C., Kalgutkar, A. S., & Lanzo, C. A. (1999a). Arachidonic Acid Oxygenation by COX-1 and COX-2. *Journal of Biological Chemistry*, 274(33), 22903–22906. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.33.22903>
- Martínez Mendoza, D. L. (2015). *Estudio de especiación química del compuesto LQM 314 con el catión Cu(II) en su sal de Acetato*. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México.
- McNally, R. Drug Information for Health Care Professional (USP-DI), vol. 1, Medical Economics Company, North Olmsted, Ohio, USA, 21st edition, 2001.
- McPhail, D., Cooper, A., 1997. Thermodynamics and kinetics of dissociation of ligand-induced dimers of vancomycin antibiotics. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 93, 2283–2289. <https://doi.org/10.1039/a701327b>
- Mele, A., Mendichi, R., & Selva, A. (1998). Non-covalent associations of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) with trans- β -carotene in water: evidence for the formation of large aggregates by light scattering and NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 310(4), 261–267. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(98\)00193-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(98)00193-1)



-
- Miyazawa, I., Ueda, H., Nagase, H., Endo, T., Kobayashi, S., & Nagai, T. (1995). Physicochemical properties and inclusion complex formation of δ -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(3), 153–162. [https://doi.org/10.1016/0928-0987\(95\)00006-Y](https://doi.org/10.1016/0928-0987(95)00006-Y)
- Moncada, S. Vane J.R. 1979. Mode of Action of aspirin-like drugs. In: Stollerman G.H. (ed). *Advances in internal medicine*. Year Book Medical Publisher, Chicago, p 1-22.
- Morales-Pérez A.. Estudio de sistemas químicos multirreaccionantes en soluciones acuosas por métodos espectrofotométricos con el programa SQUAD y otros métodos computacionales, Tesis Maestro en Ciencias Fisicoquímica. UNAM. (1993). pp.: 6-28.
- Morgan, Y. R., Turner, P., Kennedy, B. J., Hambley, T. W., Lay, P. A., Ray Biffin, J., Regtop, H. L., & Warwick, B. (2001). Preparation and characterization of dinuclear copper–indomethacin anti-inflammatory drugs. *Inorganica Chimica Acta*, 324(1–2), 150–161. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(01\)00570-9](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(01)00570-9)
- Mosca, F., Bray, M., Lattanzio, M., Fumagalli, M., & Tosetto, C. (1997). Comparative evaluation of the effects of indomethacin and ibuprofen on cerebral perfusion and oxygenation in preterm infants with patent ductus arteriosus. *Journal of Pediatrics*, 131(4), 549–554. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(97\)70060-X](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(97)70060-X)
- Nalamachu, S., & Wortmann, R. (2014). Role of Indomethacin in Acute Pain and Inflammation Management: A Review of the Literature. *Postgraduate Medicine*, 126(4), 92–97. <https://doi.org/10.3810/pgm.2014.07.2787>
- Nepogodiev, S. A., & Stoddart, J. F. (1998). Cyclodextrin-Based Catenanes and Rotaxanes †. *Chemical Reviews*, 98(5), 1959–1976. <https://doi.org/10.1021/cr970049w>
- Nijkamp, F. P., & Parnham, M. J. (Eds.). (2005). *Principles of Immunopharmacology* (2nd ed.). Birkhäuser. pp. 505
- Nishijo, J., Yasuda, M., & Nagai, M. (1991). Interaction of 8-anilino-naphthalene-1-sulfonate with .ALPHA.-cyclodextrin. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*, 39(1), 5–9. <https://doi.org/10.1248/cpb.39.5>
- Nishijo, J., Yasuda, M., Nagai, M & Ohno, E. (1992). Interaction of 6-p-Toluidinylnaphthalene-2-sulfonate with .ALPHA.-Cyclodextrin. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*, 40(10), 2591–2596. <https://doi.org/10.1248/cpb.40.2591>
- Palepu, R., & Reinsborough, V. C. (1988). Surfactant–cyclodextrin interactions by conductance measurements. *Canadian Journal of Chemistry*, 66(2), 325–328. <https://doi.org/10.1139/v88-056>



-
- Pande, G. S., & Shangraw, R. F. (1995). Characterization of β -cyclodextrin for direct compression tableting: II. The role of moisture in the compactibility of β -cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics*, 124(2), 231–239. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(95\)00093-X](https://doi.org/10.1016/0378-5173(95)00093-X)
- Piñeiro, Á., Muñoz, E., Sabín, J., Costas, M., Bastos, M., Velázquez-Campoy, A., Garrido, P. F., Dumas, P., Ennifar, E., García-Río, L., Rial, J., Pérez, D., Fraga, P., Rodríguez, A., & Cotelo, C. (2019). AFFINImeter: A software to analyze molecular recognition processes from experimental data. *Analytical Biochemistry*, 577(March), 117–134. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.02.031>
- Piper, P. J., & Vane, J. R. (1969). Release of Additional Factors in Anaphylaxis and its Antagonism by Anti-inflammatory Drugs. *Nature*, 223(5201), 29–35. <https://doi.org/10.1038/223029a0>
- Pringsheim, H., & Beiser, A. (1924a). *Biochem. Z.*, 148, 336.
- Pringsheim, H., & Steingroever, F. (1924b). Über die Halogenverbindungen der Polyamylosen. (Beiträge zur Chemie der Stärke, XI.). *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 57, 1579.
- Puigdomenech, I. (2004). MEDUSA (Making equilibrium diagrams using sophisticated algorithms), Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden
- Pulley, A. O., & French, D. (1961). Studies on the Schardinger dextrans. XI. The isolation of new Schardinger dextrans. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 5(1), 11–15. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(61\)90071-7](https://doi.org/10.1016/0006-291X(61)90071-7)
- Rainsford, K. (2007). Anti-Inflammatory Drugs in the 21st Century. In R. E. Harris, R. Bittman, D. Dasgupta, H. Engelhardt, M. Wyss, S. Rottem, H.-P. Nasheuer, L. Flohe, H. Herrmann, A. Holzenburg, & P. Zwickl (Eds.), *Inflammation in the Pathogenesis of Chronic Diseases* (42nd ed., pp. 3–27). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/1-4020-5688-5_1
- Rainsford, K., 2007. Anti-Inflammatory Drugs in the 21st Century, in: Harris, R.E., Bittman, R., Dasgupta, D., Engelhardt, H., Wyss, M., Rottem, S., Nasheuer, H.-P., Flohe, L., Herrmann, H., Holzenburg, A., Zwickl, P. (Eds.), *Inflammation in the Pathogenesis of Chronic Diseases*. Springer, Dordrecht, pp. 3–27. https://doi.org/10.1007/1-4020-5688-5_1
- Rekharsky, M. V., & Inoue, Y. (1998). Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins. *Chemical Reviews*, 98(5), 1875–1918. <https://doi.org/10.1021/cr970015o>
- Rekharsky, M. V., Inoue, Y., 2002. Complexation and Chiral Recognition Thermodynamics of 6-Amino-6-deoxy- β -cyclodextrin with Anionic, Cationic, and Neutral Chiral Guests: Counterbalance between van der Waals and Coulombic Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 813–826. <https://doi.org/10.1021/ja010889z>



-
- Rekharsky, M. V., Inoue, Y., 2006. Microcalorimetry, in: *Cyclodextrins and Their Complexes*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG, pp. 199–230. <https://doi.org/10.1002/3527608982.ch8>
- Rekharsky, M. V., Schwarz, F.P., Tewari, Y.B., Goldberg, R.N., 1994. A thermodynamic study of the reactions of cyclodextrins with primary and secondary aliphatic alcohols, with D- and L-phenylalanine, and with L-phenylalanineamide. *J. Phys. Chem.* 98, 10282–10288. <https://doi.org/10.1021/j100091a051>
- Ringbom, A., Montuenga, C., 1979. *Formación de complejos en química analítica*. Alhambra, Madrid, Spain.
- Robyt, J. F., Ed. *Cyclodextrins. Essentials of Carbohydrate Chemistry*; Springer-Verlag: New York, 1998; Chapter 8, p 245
- Rodríguez-Laguna, N., Reyes-García, L.I., Moya-Hernández, R., Rojas-Hernández, A., Gómez-Balderas, R., 2016. Chemical Speciation of the System Cu(II)-Indomethacin in Ethanol and Water by UV-Vis Spectrophotometry. *J. Chem.* 2016, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/9804162>
- Rodríguez Orduño, F. Y. (2017). Determinación de las constantes de equilibrio de inclusión de los complejos isoxicam con 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Rudrangi, S. R. S., Bhomia, R., Trivedi, V., Vine, G. J., Mitchell, J. C., Alexander, B. D., & Wicks, S. R. (2015). Influence of the preparation method on the physicochemical properties of indomethacin and methyl- β -cyclodextrin complexes. *International Journal of Pharmaceutics*, 479(2), 381–390. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.01.010>
- Ruidiaz, M. A., Delgado, D. R., Martínez, F., & Marcus, Y. (2010). Solubility and preferential solvation of indomethacin in 1,4-dioxane+water solvent mixtures. *Fluid Phase Equilibria*, 299(2), 259–265. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2010.09.027>
- Saenger, W. (1979). Circular hydrogen bonds. *Nature*, 279(5711), 343–344. <https://doi.org/10.1038/279343a0>
- Saenger, W. (1982). Structure Aspects of Cyclodextrin Inclusion Compounds. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrins* (pp. 141–150). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-7855-3_18
- Salústio, P. J., Feio, G., Figueirinhas, J. L., Pinto, J. F., & Cabral Marques, H. M. (2009). The influence of the preparation methods on the inclusion of model drugs in a β -cyclodextrin cavity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(2), 377–386. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.09.027>



-
- Sanches, B.M.A., Ferreira, E.I., 2019. Is prodrug design an approach to increase water solubility? *Int. J. Pharm.* 568, 118498. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118498>
- Saokham, P., Muankaew, C., Jansook, P., Loftsson, T., 2018. Solubility of cyclodextrins and drug/cyclodextrin complexes. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules23051161>
- Sataraddi, S.R., Patil, S.M., Bagoji, A.M., Pattar, V.P., Nandibewoor, S.T., 2014. Electrooxidation of Indomethacin at Multiwalled Carbon Nanotubes-Modified GCE and Its Determination in Pharmaceutical Dosage Form and Human Biological Fluids. *ISRN Anal. Chem.* 2014, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/816012>
- Schlenk, B. Y. W. (n.d.). *The Fractionation of Ozokerites and the Separation of Optical Isomers*.
- Schlenk, W. (1950). Thioharnstoff-Einschlußverbindungen. *Experientia*, 6(8), 292–292. <https://doi.org/10.1007/BF02170898>
- Schönbeck, C., Westh, P., Madsen, J. C., Larsen, K. L., Städe, L. W., & Holm, R. (2010). Hydroxypropyl-Substituted β -Cyclodextrins: Influence of Degree of Substitution on the Thermodynamics of Complexation with Tauroconjugated and Glycoconjugated Bile Salts. *Langmuir*, 26(23), 17949–17957. <https://doi.org/10.1021/la103124n>
- Schönbeck, C., Westh, P., Madsen, J.C., Larsen, K.L., Städe, L.W., Holm, R., 2010. Hydroxypropyl-Substituted β -Cyclodextrins: Influence of Degree of Substitution on the Thermodynamics of Complexation with Tauroconjugated and Glycoconjugated Bile Salts. *Langmuir* 26, 17949–17957. <https://doi.org/10.1021/la103124n>
- Shen, T. Y. (1982). The discovery of indomethacin and the proliferation of NSAIDs. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 12(2), 89–93. [https://doi.org/10.1016/0049-0172\(82\)90004-X](https://doi.org/10.1016/0049-0172(82)90004-X)
- Shen, T. Y., Windholz, T. B., Rosegay, A., Witzel, B. E., Wilson, A. N., Willett, J. D., Holtz, W. J., Ellis, R. L., Matzuk, A. R., Lucas, S., Stammer, C. H., Holly, F. W., Sarett, L. H., Risley, E. A., Nuss, G. W., & Winter, C. A. (1963). Non-Steroid Anti-Inflammatory Agents. *Journal of the American Chemical Society*, 85(4), 488–489. <https://doi.org/10.1021/ja00887a038>
- Singla, A. (1995). Zinc-indomethacin complex: Synthesis, physicochemical and biological evaluation in the rat. *International Journal of Pharmaceutics*, 120(2), 145–155. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(94\)00370-K](https://doi.org/10.1016/0378-5173(94)00370-K)
- Sorenson, J.R.J., 1989. Copper Complexes Offer a Physiological Approach to Treatment of Chronic Diseases, in: Ellis, G.P., West, G.B. (Eds.), *Progress in Medicinal Chemistry*. Elsevier Science Publisher, pp. 437–568. [https://doi.org/10.1016/S0079-6468\(08\)70246-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6468(08)70246-7)



-
- Stella, V. (1999). Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 36(1), 3–16. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00052-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00052-0)
- Stella, V. J. (1996). *Proceedings of the Eighth International Symposium on Cyclodextrins Budapest, Hungary, March 31–April 2*, (J. Szejtli & L. Sente (Eds.)).
- Stuart, B. H. (2005). Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. In *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. <https://doi.org/10.1002/0470011149>
- Sundararajan, P. R., & Rao, V. S. R. (1970). Conformational studies on cycloamyloses. *Carbohydrate Research*, 13(3), 351–358. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)80592-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)80592-3)
- Suzuki, M., Kajtár, M., Szejtli, J., Vikmon, M., & Fenyvesi, E. (1992). Induced circular-dichroism spectra of complexes of cyclomalto-oligosaccharides and azo dyes containing naphthalene nuclei. *Carbohydrate Research*, 223(C), 71–80. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(92\)80007-N](https://doi.org/10.1016/0008-6215(92)80007-N)
- Szejtli, J. (1982) *Cyclodextrins and Their Inclusion Complexes*. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Szejtli, J. (1988). *Cyclodextrin Technology* (Vol. 1). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-015-7797-7>
- Szejtli, J. (1997). Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes. *J. Mater. Chem.* 7, 575–587. <https://doi.org/10.1039/a605235e>
- Szejtli, J. (1998). Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chemical Reviews*, 98(5), 1743–1754. <https://doi.org/10.1021/cr970022c>
- Szejtli, J. (Ed.). (1981). *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrins - Budapest, Hungary, 30 September–2 October*.
- Tagliati, C.A., Kimura, E., Nothenberg, M.S., Santos, S.R.J., Oga, S., 1999. Pharmacokinetic profile and adverse gastric effect of zinc-piroxicam in rats. *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* 33, 67–71. [https://doi.org/10.1016/S0306-3623\(98\)00267-5](https://doi.org/10.1016/S0306-3623(98)00267-5)
- Taira, H., Nagase, H., Endo, T., & Ueda, H. (2006). Isolation, Purification and Characterization of Large-Ring Cyclodextrins (CD36~ ~CD39). *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 56(1–2), 23–28. <https://doi.org/10.1007/s10847-006-9055-8>
- Takeo, K., & Kuge, T. (1969). Complexes of Starchy Materials with Organic Compounds. *Agricultural and Biological Chemistry*, 33(8), 1174–1180. <https://doi.org/10.1080/00021369.1969.10859434>



-
- Takeo, K., & Kuge, T. (1972). Complexes of Starch and its Related Materials with Organic Compounds. Part VII. Circular Dichroism of Inclusion Compounds of Cyclodextrins in Aqueous Solutions. *Starch - Stärke*, 24(9), 281–284. <https://doi.org/10.1002/star.19720240902>
- Takeru Higuchi, & Kenneth A. Connors. (1965). Phase solubility techniques. In *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation* (pp. 117–212).
- Thakkar, A. L., & Demarco, P. V. (1971). Cycloheptaamylose Inclusion Complexes of Barbiturates: Correlation between Proton Magnetic Resonance and Solubility Studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60(4), 652–653. <https://doi.org/10.1002/jps.2600600444>
- Tilden, E. B., & Hudson, C. S. (1939). The Conversion of Starch to Crystalline Dextrins by the Action of a New Type of Amylase Separated from Cultures of *Aerobacillus macerans*. *Journal of the American Chemical Society*, 61(10), 2900–2902. <https://doi.org/10.1021/ja01265a091>
- Tilden, E. B., & Hudson, C. S. (1942b). Preparation and Properties of the Amylases Produced by *Bacillus macerans* and *Bacillus polymyxa*. *Journal of Bacteriology*, 43(4), 527–52744.
- Tilden, E. B., Hudson, C. S., & Adams, M. (1942a). Purification of the Amylase of *Bacillus Macerans*. *Journal of the American Chemical Society*, 64(6), 1432–1433. <https://doi.org/10.1021/ja01258a052>
- Todorova, N.A., Schwarz, F.P., 2007. The role of water in the thermodynamics of drug binding to cyclodextrin. *J. Chem. Thermodyn.* 39, 1038–1048. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2006.12.019>
- Tong, P., & Zografi, G. (2001). A study of amorphous molecular dispersions of indomethacin and its sodium salt. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90(12), 1991–2004. <https://doi.org/10.1002/jps.1150>
- Valentovic, M. (2007). Indomethacin. In *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* (pp. 1–5). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.61929-4>
- Vane, J. R. (1971). Inhibition of Prostaglandin Synthesis as a Mechanism of Action for Aspirin-like Drugs. *Nature New Biology*, 231(25), 232–235. <https://doi.org/10.1038/newbio231232a0>
- Vane, J. R., & Botting, R. M. (1997). Mechanism of action of aspirin-like drugs. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 26(6 SUPPL. 1), 2–10. [https://doi.org/10.1016/S0049-0172\(97\)80046-7](https://doi.org/10.1016/S0049-0172(97)80046-7)



-
- Vane, J. R., & Botting, R. M. (1996). *Overview - mechanisms of action of anti-inflammatory drugs* En: Vane J., Botting J., Botting R. (eds) *Improved Non-Steroid Anti-Inflammatory Drugs: COX-2 Enzyme Inhibitors*. Springer, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-010-9029-2>
- Vane, J. R., & Botting, R. M. (1998). Mechanism of action of anti-inflammatory drugs: an overview. In *Selective COX-2 Inhibitors* (pp. 1–17). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4872-6_1
- Villiers, A. Bull. Soc. Chim. Paris 1891a, 46, 470
- Villiers, A. C. R. Acad. Sci. 1891b, CXII, 536
- Weber, G., 1995. Van't Hoff revisited: Enthalpy of association of protein subunits. *J. Phys. Chem.* 99, 1052–1059. <https://doi.org/10.1021/j100003a031>
- Weder, J. E., Dillon, C. T., Hambley, T. W., Kennedy, B. J., Lay, P. A., Biffin, J. R., Regtop, H. L., & Davies, N. M. (2002). Copper complexes of non-steroidal anti-inflammatory drugs: an opportunity yet to be realized. *Coordination Chemistry Reviews*, 232(1–2), 95–126. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(02\)00086-3](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(02)00086-3)
- Weder, J. E., Hambley, T. W., Kennedy, B. J., Lay, P. A., MacLachlan, D., Bramley, R., Delfs, C. D., Murray, K. S., Moubaraki, B., Warwick, B., Biffin, J. R., & Regtop, H. L. (1999). Anti-Inflammatory Dinuclear Copper(II) Complexes with Indomethacin. Synthesis, Magnetism and EPR Spectroscopy. Crystal Structure of the N, N - Dimethylformamide Adduct. *Inorganic Chemistry*, 38(8), 1736–1744. <https://doi.org/10.1021/ic981100x>
- Weder, J.E., Hambley, T.W., Kennedy, B.J., Lay, P.A., Foran, G.J., Rich, A.M., (2001). Determination of the Structures of Antiinflammatory Copper(II) Dimers of Indomethacin by Multiple-Scattering Analyses of X-ray Absorption Fine Structure Data. *Inorg. Chem.* 40, 1295–1302. <https://doi.org/10.1021/ic0007815>
- Wenz, G., Strassnig, C., Thiele, C., Engelke, A., Morgenstern, B., Hegetschweiler, K., (2008). Recognition of Ionic Guests by Ionic β -Cyclodextrin Derivatives. *Chem. - A Eur. J.* 14, 7202–7211. <https://doi.org/10.1002/chem.200800295>
- Weser, U., Sellinger, K.-H., Lengfelder, E., Werner, W., & Strähle, J. (1980). Structure of $\text{Cu}_2(\text{indomethacin})_4$ and the reaction with superoxide in aprotic systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 631(2), 232–245. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(80\)90298-6](https://doi.org/10.1016/0304-4165(80)90298-6)
- Whitehouse, M. W., & Lash, J. W. (1961). Effect of Cortisone and Related Compounds on the Biogenesis of Cartilage. *Nature*, 189(4758), 37–39. <https://doi.org/10.1038/189037a0>



-
- Williams, P.A.M., Molinuevo, M.S., Okulik, N., Jubert, A.H., Etcheverry, S.B., 2005. Synthesis, characterization and biological properties of vanadyl(IV) complexes of diclofenac and indomethacin: an experimental and theoretical study. *Appl. Organomet. Chem.* 19, 711–718. <https://doi.org/10.1002/aoc.879>
- Wong, E., Bayly, C., Waterman, H. L., Riendeau, D., & Mancini, J. A. (1997). Conversion of Prostaglandin G/H Synthase-1 into an Enzyme Sensitive to PGHS-2-selective Inhibitors by a Double His 513 → Arg and Ile 523 → Val Mutation. *Journal of Biological Chemistry*, 272(14), 9280–9286. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.14.9280>
- Wood, D. J., Hriiska, F. E., & Saenger, W. (1977). ¹H NMR Study of the Inclusion of Aromatic Molecules in α -Cyclodextrin. *Journal of the American Chemical Society*, 99(6), 1735–1740. <https://doi.org/10.1021/ja00448a009>
- Yalkowsky, S. H., He, Y., & Jain, P. (2010). *Handbook Of Aqueous Solubility Data*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Jiménez Alvarado, Y. A. (2011). *Material didáctico para la asignatura de Química Analítica Aplicada de las Licenciaturas en Farmacia y Bioquímica Diagnóstica*. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Zhang, J. X., Li, X. J., Qiu, L. Y., Li, X. H., Yan, M. Q., Yi Jin, & Zhu, K. J. (2006). Indomethacin-loaded polymeric nanocarriers based on amphiphilic polyphosphazenes with poly (N-isopropylacrylamide) and ethyl tryptophan as side groups: Preparation, in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Controlled Release*, 116(3), 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.09.013>
- Zhou, Q., Hambley, T. W., Kennedy, B. J., & Lay, P. A. (2003). XAFS Studies of Anti-Inflammatory Dinuclear and Mononuclear Zn(II) Complexes of Indomethacin. *Inorganic Chemistry*, 42(25), 8557–8566. <https://doi.org/10.1021/ic034049s>
- Zhou, Q., Hambley, T. W., Kennedy, B. J., Lay, P. A., Turner, P., Warwick, B., Biffin, J. R., & Regtop, H. L. (2000). Syntheses and Characterization of Anti-inflammatory Dinuclear and Mononuclear Zinc Indomethacin Complexes. Crystal Structures of [Zn 2 (Indomethacin) 4 (L) 2] (L = N,N -Dimethylacetamide, Pyridine, 1-Methyl-2-pyrrolidinone) and [Zn(Indomethacin) 2 (L 1)]. *Inorganic Chemistry*, 39(17), 3742–3748. <https://doi.org/10.1021/ic991477i>

