

## Estudio de la inclusión de diflunisal en 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina Study of the inclusion of diflunisal into 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin

R. Gómez-Balderas , L. D. Ponce-Pérez , J. González-Barbosa , N. Rodríguez-Laguna \*

Laboratorio de Físicoquímica Analítica, Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán Izcalli, 54714, Estado de México, México

### Resumen

El diflunisal (HDif) es un analgésico y antiinflamatorio no esterooidal, sus efectos terapéuticos resultan de la inhibición en la producción de prostaglandinas. Los complejos de inclusión de antiinflamatorios con 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (2HP- $\beta$ CD), incrementa la solubilidad del fármaco en agua y reducen efectos secundarios de medicamentos; por ejemplo, en el cyclodex® (piroxicam- $\beta$ CD). En este trabajo se estudió la formación del complejo de diflunisal aniónico (Dif) con 2HP- $\beta$ CD mediante titulación calorimétrica isotérmica, en agua a 30 °C y pH neutro. La inclusión es exotérmica ( $\Delta H^\circ = -3.13$  kcal/mol), genera entropía ( $T\Delta S^\circ = 2.20$  kcal/mol) y es espontánea ( $\Delta G^\circ = -5.24$  kcal/mol). Además, se realizó el modelado molecular del complejo de inclusión, encontrando que las interacciones tipo van der Waals y los puentes de hidrógeno son responsables de la estabilidad del complejo.

**Palabras Clave:** diflunisal, 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina, complejos de inclusión, ITC, DFT.

### Abstract

Diflunisal (HDif) is a non-steroidal analgesic and anti-inflammatory drug, whose therapeutic effects result from the inhibition of prostaglandin production. Anti-inflammatory drugs inclusion complexes within 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (2HP- $\beta$ CD), increase drug solubility in water and reduce drug side effects; for example, in cyclodex® (piroxicam- $\beta$ CD). In this work, the formation of the complex of anionic diflunisal (Dif) with 2HP- $\beta$ CD was studied by isothermal calorimetric titration, in water at 30 °C and neutral pH. The inclusion is exothermic ( $\Delta H^\circ = -3.13$  kcal/mol), generates entropy ( $T\Delta S^\circ = 2.20$  kcal/mol) and is spontaneous ( $\Delta G^\circ = -5.24$  kcal/mol). In addition, the molecular modeling of the inclusion complex was carried out, finding that van der Waals-type interactions and hydrogen bonds are responsible for the stability of the complex.

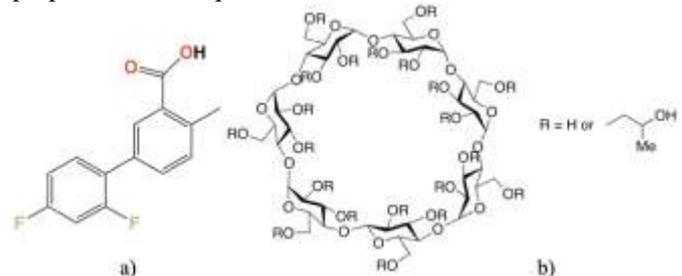
**Keywords:** diflunisal, 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin, inclusion complex, ITC, DFT.

### 1. Introducción

El diflunisal, ácido 5-(2,4-difluorfenil)-2-hidroxibenzóico, es un fármaco antiinflamatorio no esterooidal de la familia de los ácidos arilacéticos, Esquema 1a. Se utiliza para el tratamiento de la osteoartritis, artritis reumatoide y dolor leve o moderado. Además de sus efectos antiinflamatorios, el diflunisal es analgésico y antipirético; el mecanismo detallado de acción terapéutica es desconocido, aunque hay evidencia de que inhibe la acción de la prostaglandina sintetasa, producida como respuesta al dolor (Vardanyan & Hruby, 2006).

Por otro lado, las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos compuestos por un número variable de unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosas unidas por enlaces  $\alpha(1-4)$  glucosídico (Rekharsky & Inoue, 1998). Estas cadenas de glucopiranosas

constituyen una cavidad en forma de cono, en la que fármacos u otras moléculas hidrófobas pueden entrar y formar un complejo de inclusión soluble en agua cambiando las propiedades físicoquímicas del fármaco.



Esquema 1: Estructura molecular a) Diflunisal neutro (HDif).  
 b) 2HP- $\beta$ CD (R=2-hidroxiopropil).

\*Autor para la correspondencia: normarola@cuautitlan.unam.mx

Correo electrónico: gomezr@gmail.com (Rodolfo Gómez-Balderas), 418060977@cuautitlan.unam.mx (León Daniel Ponce-Pérez), normarola@cuautitlan.unam.mx (Norma Rodríguez-Laguna), barjeo@gmail.com (Jeovani González-Barbosa)

Entre las ciclodextrinas más comunes se encuentra la 2HP- $\beta$ CD, constituida por 7 unidades de glucopiranosas. Aquí, el grupo OH de la ciclodextrina nativa ( $\beta$ CD) se ha sustituido por fragmentos 2-hidroxipropil en una relación molar determinada, Esquema 1b (Crini, 2014).

Experimentalmente, la titulación calorimétrica isotérmica (ITC, por sus siglas en inglés) es una técnica que se utiliza en los estudios cuantitativos de interacciones supramoleculares. En esta técnica, se mide el calor que se libera o absorbe durante el proceso de la formación de un complejo estabilizado por interacciones intermoleculares, como en el caso de los complejos de inclusión. De hecho, ITC es la única técnica que puede determinar simultáneamente todos los parámetros de enlace en un solo experimento; a saber, la estequiometría de la reacción (N), la energía libre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ), la entalpía ( $\Delta H^\circ$ ), la entropía ( $\Delta S^\circ$ ) y la constante de formación del complejo, generalmente expresada como  $\log\beta$ . Mediante ITC se puede determinar el perfil termodinámico de la inclusión de un fármaco en la cavidad de una ciclodextrina. No obstante, las interacciones responsables de la estabilidad del complejo de inclusión quedan fuera del ámbito termodinámico.

En la literatura científica, existen numerosos estudios sobre el uso de ciclodextrinas con fármacos de administración oral (Shimpi et al., 2005). En el trabajo de Chatziathanasiadou et al., se estudiaron las propiedades termodinámicas de interacciones de losartán con 2HP- $\beta$ CD mediante ITC (Chatziathanasiadou et al., 2021). Los sistemas de indometacina con  $\beta$ CD y 2HP- $\beta$ CD han sido también estudiados por ITC y espectrofotometría UV-Visible para determinar las constantes de formación de estas interacciones (Hipólito-Nájera et al., 2019). También se ha estudiado la complejación del clorhidrato de metformina con hidroxipropil- $\alpha$ -ciclodextrina en estado sólido y líquido con el objetivo de mejorar la biodisponibilidad oral del fármaco (Roselet, 2020). En la mayoría de los estudios se reporta una estequiometría fármaco:CD de 1:1.

Desde hace varias décadas, la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) ha sido una herramienta de investigación con bastante poder para la exploración de moléculas a nivel teórico. Con frecuencia sus resultados son comparables, o incluso superiores, a varias técnicas experimentales. En particular, la descripción de interacciones intermoleculares del tipo puentes de hidrógeno, van der Waals e impedimentos estéricos se logra con buena precisión utilizando funcionales híbridos meta GGA (Mardirossian & Head-Gordon, 2017). Una vez encontrada la geometría de mínima energía de un complejo supramolecular, las interacciones no covalentes que lo estabilizan se pueden explorar cualitativamente mediante el modelo del gradiente independiente basado en la partición de Hirshfeld (IGMH) (Lu & Chen, 2022). Adicionalmente, el análisis de las características de la densidad electrónica mediante la teoría cuántica de átomos en moléculas (QAIM; Kumar et al., 2016), permite caracterizar cuantitativamente la intensidad de dichas interacciones supramoleculares, en particular los puentes de hidrógeno.

La finalidad de este trabajo es estudiar la termodinámica del fenómeno de inclusión de diflunisal en 2HP- $\beta$ CD, así como las interacciones moleculares responsables de la estabilidad de los complejos de inclusión en solución acuosa.

## 2. Metodología

### 2.1. Reactivos y equipo

En la parte experimental se usaron los reactivos analíticos sin algún tratamiento adicional 2HP- $\beta$ CD (MW~1 380, MS=0.6) de Sigma-Aldrich, diflunisal neutro (estándar analítico), fosfato dibásico de sodio (99.7 %) y fosfato monobásico de sodio (99.8%), de J. T. Baker; estas sales se emplearon para preparar una solución buffer de pH=7. Para todas las soluciones se utilizó agua desionizada obtenida de un equipo Purelab Classic ELGA ( $\rho = 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ), las sustancias se pesaron en una balanza analítica Ohaus PA214 Pioneer Balance ( $\pm 0.0002 \text{ g}$ ). La titulación calorimétrica isotérmica se realizó en un microcalorímetro MicroCal VP-ITC ( $<0.005 \mu\text{cal/s}$ ), GE. Previo a la titulación calorimétrica, todas las soluciones se desgasificaron en un equipo Microcal ThermoVac GE; todos los experimentos se realizaron a  $30^\circ\text{C}$ .

### 2.2. Experimental

En la titulación se agregaron 20 alícuotas de titulante (14  $\mu\text{L}$ ) durante 8 s cada una con 300 s entre inyecciones para permitir que la señal regrese a la línea base, la velocidad de agitación fue de 307 rpm. En la celda calorimétrica, de volumen 1.4303 mL, se colocó 2HP- $\beta$ CD (0.1334 mM) y se tituló con una solución de diflunisal 2 mM. Tanto la solución de CD como de diflunisal fueron preparadas con solución buffer de fosfatos a pH=7. El  $pK_a$  reportado del diflunisal es 3.0-3.3, por lo que, a pH neutro, la especie predominante del diflunisal es el anión. El calor generado por la dilución de la solución de Dif se registró titulando la solución buffer (sin CD) con solución de Dif. Los datos experimentales se ajustaron al modelo de equilibrio de inclusión 1:1 utilizando el programa MicroCal PEAQ-ITC que acompaña al equipo ITC.

### 2.3. Métodos teóricos

Para el estudio teórico las geometrías moleculares del Dif, y 2HP- $\beta$ CD y de los complejos de inclusión se optimizaron usando Gaussian 16 aplicando el funcional híbrido meta GGA M06-2X (Hohenstein et al., 2008), en combinación con la base gaussiana 6-311G(d, p). Para considerar el efecto del disolvente se utilizó la aproximación SMD (Marenich et al., 2009). La visualización de los resultados se realizó con el software GaussView 6.0.16. En todos los casos, se analizaron las frecuencias armónicas para verificar que las geometrías obtenidas corresponden con un mínimo de energía sobre la superficie de energía potencial correspondiente. Con el propósito de caracterizar las interacciones intermoleculares responsables de la estabilidad de los complejos de inclusión, la densidad electrónica de los puntos críticos de enlace asociados a puentes de hidrógeno intermoleculares se analizó en la estructura del complejo de inclusión calculada.

## 3. Resultados y discusión

### 3.1. Titulación calorimétrica isotérmica

En la Figura 1 se muestran el termograma y la curva de enlace para la titulación de la 2HP- $\beta$ CD con Dif. A partir del

termograma notamos que la formación del complejo de inclusión es exotérmica. Además, la forma de la curva de enlace corresponde a la de una interacción débil, como es de esperarse para los complejos de inclusión.

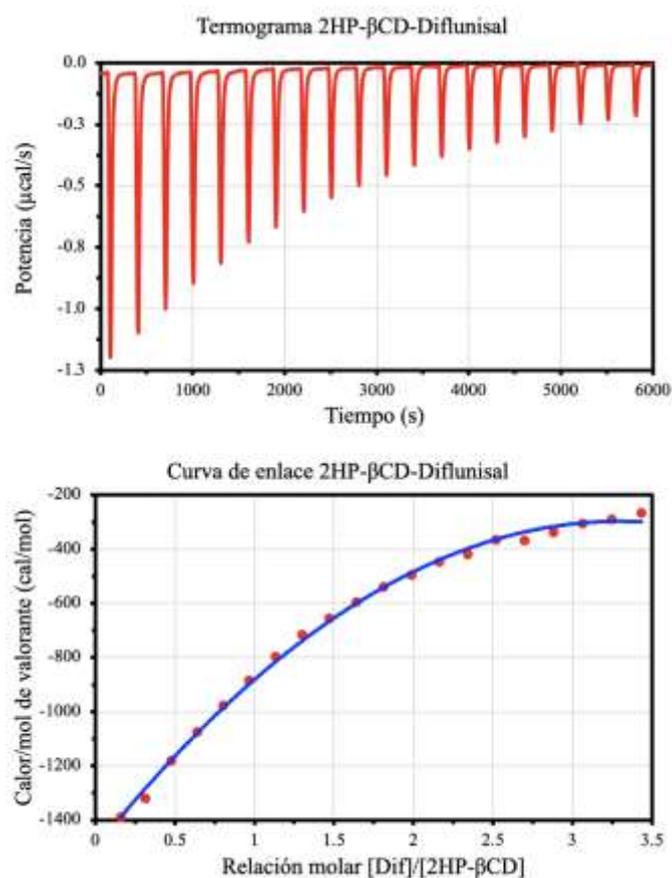


Figura 1: Valoración calorimétrica isotérmica de 2HP-βCD con Dif a pH=7.0.

Utilizando el software de análisis PEAQ-ITC, se ajusta la curva de enlace en función de la relación molar  $[Dif]/[2HP-\beta CD]$ , el calor de dilución de Dif en la solución buffer se restó punto a punto de los calores de titulación. El mejor ajuste se obtuvo para la estequiometría del complejo de inclusión 1:1 (Dif:CD). PEAQ-ITC calcula  $\Delta H^\circ = -3.13 \pm 0.02$  kcal/mol,  $-\Delta S^\circ = -2.20$  kcal/mol y  $\Delta G^\circ = -5.24$  kcal/mol, a partir de la energía de Gibbs es posible calcular la constante de inclusión para el equilibrio  $Dif + 2HP - \beta CD \rightleftharpoons [Dif - 2HP - \beta CD]$  obteniendo  $\log \beta = 3.839 \pm 0.008 M^{-1}$ . El valor negativo de la entalpía indica que el proceso de inclusión es exotérmico. La inclusión del Dif en la cavidad de la 2HP-βCD produce un aumento en la entropía, que se asocia al incremento en los grados de libertad del sistema generado por la mayor movilidad de las moléculas de agua que desalojan la cavidad de la 2HP-βCD para hacer lugar al fármaco, y de aquellas que formaban la esfera de solvatación del fármaco. El cambio en la energía de Gibbs es negativo, es decir, el proceso de inclusión ocurre de forma espontánea en las condiciones experimentales establecidas. La constante de estabilidad del complejo de inclusión es pequeña, como es de esperarse para este tipo de estructuras supramoleculares.

En cuanto a las interacciones moleculares responsables de la estabilidad del complejo de inclusión, en los cálculos

químico-cuánticos, hemos considerado que la especie predominante del diflunisal es el anión. Además, como los grupos ionizables suelen quedar fuera de la ciclodextrina cuando se forman los complejos de inclusión, se modeló la posibilidad de introducir la molécula de Dif con el grupo carboxilato hacia abajo entrando por el anillo mayor, o hacia arriba entrando por el anillo menor.

La optimización de la geometría del complejo en las configuraciones estudiadas, indican que para 2HP-βCD el complejo formado cuando el carboxilato entra por el anillo mayor apuntando hacia abajo es ligeramente más estable, la diferencia de energía no excede 5 kcal/mol, lo que indica que la orientación del carboxilato no es determinante para la estabilidad de los complejos de inclusión.

Las gráficas se pueden dividir en tres regiones: en el extremo izquierdo, las zonas azules corresponden a interacciones atractivas débiles, tipo puentes de hidrógeno. En el extremo derecho, las zonas rojas se asocian con repulsiones débiles, tipo impedimento estérico. Finalmente, en la zona intermedia de color verde encontramos las interacciones de van der Waals. Estas gráficas se pueden mapear en la estructura molecular, utilizando un corte de 0.005 u.a., para visualizar las interacciones que se dan entre la densidad electrónica del Dif y la densidad electrónica de la 2HP-βCD. Este mapeo se traduce en una isosuperficie que se muestran a la derecha de cada una de las gráficas. Claramente se observa que las regiones azules de dicha isosuperficie corresponden a puentes de hidrógeno entre el grupo carboxilato del Dif y alguno de los hidrógenos de la estructura de la 2HP-βCD. Las isosuperficies verdes permiten visualizar lo extenso de las interacciones de van der Waals, también asociadas con las interacciones hidrofóbicas entre el fármaco y la ciclodextrina.

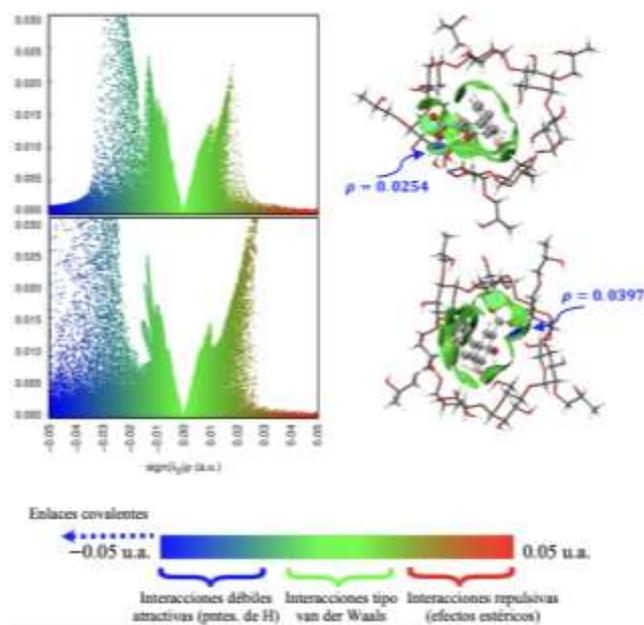


Figura 2: Evidencia de la formación de puentes de hidrógeno e interacciones de van der Waals en el complejo de inclusión de Dif en 2HP-βCD.

Si bien, la visualización por medio del IGMH nos ayuda cualitativamente a reconocer las interacciones que estabilizan los complejos de inclusión, el análisis de la densidad electrónica nos permite cuantificar la intensidad de la interacción, al menos para los puentes de hidrógeno. La

densidad electrónica en los puntos críticos de enlace se muestra en la Figura 2 para cada modelo molecular en estudio. Como se puede notar, el complejo formado con la 2HP- $\beta$ CD con el grupo carboxilato del Dif apuntando hacia abajo, la estructura más estable, establece un puente de hidrógeno cuya densidad electrónica es  $\rho = 0.0397$  u.a., mayor que la que se establece cuando el carboxilato apunta hacia arriba,  $\rho = 0.0254$  u.a., que corresponde con la estructura menos estable.

#### 4. Conclusiones

La formación de complejos de inclusión entre diflunisal aniónico y 2HP- $\beta$ CD es exotérmica, espontánea y poco cuantitativa. El proceso de inclusión genera entropía, que se origina por la deshidratación tanto de la cavidad de la 2HP- $\beta$ CD como del anión de diflunisal. Encontramos, a partir del modelado molecular, que la estabilidad del complejo de inclusión prácticamente no se afecta por la manera en que el diflunisal entra en el hueco de la 2HP- $\beta$ CD. Las interacciones intermoleculares responsables de la estabilidad del complejo de inclusión son los puentes de hidrógeno que se forman entre el anión carboxilato y algunos hidrógenos de los grupos hidroxilo de la CD. La aplicación del método IGMH en combinación con QTAIM, permiten caracterizar y cuantificar las interacciones intermoleculares que explican la estabilidad del complejo de inclusión. Es recomendable ampliar el estudio para investigar la formación del complejo de inclusión en condiciones de pH ácido, donde la especie predominante del diflunisal es HDif; se espera que los puentes de hidrógeno entre el HDif y la 2HP- $\beta$ CD sean menos intensos, pero que se incrementen las interacciones de van der Waals y que la constante de inclusión determinada experimentalmente sea mayor.

#### Agradecimientos

J. G.-B. agradece a CONACyT por la beca de doctorado. Los autores agradecen al programa UNAM PAPIIT por el apoyo para realizar la investigación a través de los proyectos IA208221, IN221621 e IA209123. Se agradece a los programas PIAPI y de Cátedras de Investigación, de la FES-

Cuautitlán, por apoyar los proyectos PIAPI2035 y CI2220, respectivamente.

#### Referencias

- Crini, G. (2014). Review: A History of Cyclodextrins. *Chem Rev*, 114(21), 10940-10975.  
DOI: 10.1021/cr500081p
- Chatziathanasiadou, M. V., Mavromoustakos, T., Tzakos, A. G. (2021). Unveiling the thermodynamic aspects of drug-cyclodextrin interactions through isothermal titration calorimetry. *Methods Mol Biol* 2207, 187–98.  
DOI: 10.1007/978-1-0716-0920-0\_15
- Hipólito-Nájera, A.R., del Rosario Moya-Hernández, M., Rojas-Hernández, A. Gómez-Balderas, R. Interaction of indomethacin-cyclodextrins in water by UV-Vis and ITC. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 95, 55–62 (2019).  
DOI: 10.1007/s10847-019-00915-9
- Hohenstein, E. G., Chill, S. T., & Sherrill, C. D. (2008). Assessment of the Performance of the M05-2X and M06-2X Exchange-Correlation Functionals for Noncovalent Interactions in Biomolecules. *J Chem Theory Comp*, 4(12), 1996-2000.  
DOI: 10.1021/ct800308k
- Kumar, P. S. V., Raghavendra, V., Subramanian, V. (2016). Bader's Theory of Atoms in Molecules (AIM) and its Applications to Chemical Bonding. *J Chem Sci*, 128(10), 1527-1536.  
DOI: 10.1007/s12039-016-1172-3
- Lu, T., & Chen, Q. (2022). Independent gradient model based on Hirshfeld partition: A new method for visual study of interactions in chemical systems. *J Comp Chem*, 43(8), 539-555.  
DOI: 10.1002/jcc.26812
- Mardirossian, N., Head-Gordon, M. (2017). Thirty years of density functional theory in computational chemistry: An overview and extensive assessment of 200 density functionals. *Mol Phys*, 115(19), 2315-2372.  
DOI: 10.1080/00268976.2017.1333644
- Marenich, A.V., Cramer, C.J., Truhlar, D.G. (2009) Universal solvation model based on solute electron density and a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions. *J Phys Chem B* 113, 6378–6396.  
DOI: 10.1021/jp810292n
- Rekharsky, M. V., Inoue, Y. (1998). Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins. *Chem Rev*, 98(5), 1875-1918.  
DOI: 10.1021/cr970015o
- Roselet, L. S., Kumari, P. J. (2020). An investigation on host-guest complexation of Metformin hydrochloride with hydroxypropyl- $\alpha$ -cyclodextrin for enhanced oral bioavailability. *Mater Today*, 21:514–518.  
DOI: 10.1016/j.matpr.2019.06.650
- Shimpi, S., Chauhan, B., Shimpi, P. (2005). Cyclodextrins: application in different routes of drug administration. *Acta Pharm*, 55(2):139-56. PMID: 16179128.
- Vardanyan, R. S., Hruby, V. J. (2006). Analgesics. En *Synthesis of Essential Drugs* (pp. 19-55). Elsevier.  
DOI: 10.1016/B978-044452166-8/50003-0