

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

Evaluación de ciclodextrinas como fijadores de metabolitos secundarios aromáticos (eugenol, timol y carvacrol), como alternativa en la industria de fragancias

Alba Elena Saraí Toledo Hernández

Química

Guatemala, noviembre de 2016

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

Evaluación de ciclodextrinas como fijadores de metabolitos secundarios aromáticos (eugenol, timol y carvacrol), como alternativa en la industria de fragancias

Informe de Tesis

Presentado por

Alba Elena Saraí Toledo Hernández

Para optar al título de

Química

Guatemala, noviembre de 2016

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
M.A. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Andreina Delia Irene López Hernández	Vocal IV
Br. Carol Andrea Betancourt Herrera	Vocal V

Agradecimientos

Muchísimas gracias la Universidad de San Carlos de Guatemala, a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y a la Escuela de Química, ya que en sus aulas pude adentrarme en el vasto universo de conocimientos del maravilloso mundo de la química.

Al Departamento de Química General, por el apoyo incondicional y ayuda brindada antes, durante y después de la realización de este trabajo de tesis.

A la Unidad de Química Computacional, sin su ayuda este trabajo no se hubiera podido realizar.

Al Departamento de Fisicoquímica, por brindarme lo necesario para la realización de la parte experimental.

Al Laboratorio de Investigación Química y Ambiental -LIQA- por abrirme las puertas y permitirme el uso de sus instalaciones.

A la Unidad de Análisis Instrumental -UAI- por facilitarme el uso de su equipo.

Al Lic. Omar Velásquez, por asesorarme en este trabajo de tesis.

A mis revisores, Licda. Marta del Cid y Dr. Francisco Pérez Sabino, por su apoyo, ayuda é interés mostrado en mi trabajo de tesis.

A Rony Letona, por brindarme desinteresadamente su ayuda y conocimientos, durante la parte experimental.

A la Licda. Patricia Navas, quién me brindo su conocimiento en cada paso desde el inicio de la tesis, aconsejándome y animándome. Gracias por su amistad.

Al Lic. Carlos Suhul, por su amistad y ayuda incondicional.

A Don Francisco (Panchito), muchas gracias por su ayuda durante toda la carrera, amabilidad, alegría y espíritu de servicio que le caracterizan.

Dedicatoria

A Dios, porque en El están escondidos los tesoros del conocimiento, y de El viene el conocimiento y la inteligencia.

A mi papá, Romeo Toledo, por estar a mi lado a cada momento, quien me ha brindado después de Dios, lo necesario para alcanzar esta meta con su esfuerzo incansable, dándome el mejor de los ejemplos.

A María Elena, Daniel y Josué por estar conmigo en todo momento. Los quiero mucho.

A mis tios y primos, gracias por su cariño. Especialmente a mi tío Fredy y tía Dorcas por su amor incondicional, y estar siempre conmigo. A mis primos, Gaby, Elizama y Alfredo por ser como mis hermanos y estar conmigo en los momentos de tristeza y alegría.

A mi sobrina Elieth Rachelle, porque has llenado de alegría nuestras vidas.

Hna. Rosy y Dhana por su cariño, oraciones y palabras de ánimo en todo momento

A mi novio Byron José, por su apoyo, comprensión, alegría y amor brindados durante estos años que hemos recorrido juntos, y por creer en mí, más de lo que yo lo hago.

A mis compañeros de trabajo, porque me presionaron, me animaron y estuvieron pendientes de mí en cada paso, dándome palabras de aliento y creyendo en mí. Muchas gracias por su cariño sincero.

A los amigos que Dios me ha puesto en el camino, en la iglesia, en la universidad, en el deporte, etc. sin su apoyo, oraciones y cariño nada de esto sería posible.

A mis compañeros químicos, porque sin ustedes, los días en la universidad no hubieran sido los mismos. Se les quiere!

A mis alumnos, porque en cada paso de mi carrera me alentaron, alegrándose de mis logros y avances.

I. ÍNDICE

I. RESUMEN.....	5
II. INTRODUCCIÓN.....	7
III. ANTECEDENTES	9
III.1 Marco Teórico	11
CAPITULO No. 1 ACEITES ESENCIALES.....	11
1.1 COMPOSICIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES	12
CAPITULO No. 2 METABOLITOS SECUNDARIOS FENÓLICOS EN ESTUDIO (EUGENOL, TIMOL Y CARVACROL)	13
2.1 EUGENOL.....	16
2.1.1 PROPIEDADES	16
2.1.2 USOS Y APLICACIONES	17
2.1.3 TOXICIDADES/CONTRAINDICACIONES	17
2.2 TIMOL.....	18
2.2.1 PROPIEDADES	18
2.2.2 USOS Y APLICACIONES	19
2.2.3 TOXICIDADES/CONTRAINDICACIONES	19
2.3 CARVACROL	20
2.3.1 PROPIEDADES	21
2.3.2 USOS Y APLICACIONES	21
2.3.3 TOXICIDADES/CONTRAINDICACIONES	22
CAPITULO No.3 CICLODEXTRINAS (CD) COMO FIJADORES.....	23
1.1 FIJADORES	23
3.1.2 FIJADORES ARTIFICIALES	24
3.2 CICLODEXTRINAS	26
3.2 CICLODEXTRINAS (CD) MADRE	26
3.3 CICLODEXTRINAS (CD) MODIFICADAS.....	28
3.4 CICLODEXTRINAS EN COMPUESTOS DE INCLUSIÓN	30
3.4.1 COMPLEJOS DE INCLUSIÓN.....	30
3.4.2 USOS DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN.....	31
CAPITULO No. 4 QUÍMICA COMPUTACIONAL	32
4.1 DISEÑO COMPUTACIONAL.....	32

4.2.1 CÁLCULO DE LA ENERGÍA MECÁNICA MOLECULAR	33
4.2.2 CÁLCULO DE LA ENERGÍA DINÁMICA MOLECULAR.....	33
CAPITULO No.5 EQUILIBRIO QUÍMICO DE LOS COMPUESTOS DE INCLUSIÓN	34
5.1 MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN	34
5.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS.....	34
IV. JUSTIFICACIÓN.....	37
V. OBJETIVOS	39
VI. HIPÓTESIS	40
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	41
VII.i Universo	41
VII.ii Población y muestra.....	41
VII.iii Materiales.....	42
VII.iv Métodos	44
Simulación computacional	44
VIII. RESULTADOS.....	47
IX. DISCUSION DE RESULTADOS	54
X. CONCLUSIONES	58
XI. RECOMENDACIONES	59
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
ANEXOS	65

INDICE DE TABLAS

Tabla No.1 Ejemplos de monoterpenos y diterpenos presentes en los aceites Esenciales	12
Tabla No.2 Ejemplos de aceites esenciales que poseen metabolitos secundarios fenólicos en su composición	15
Tabla No.3 Ejemplos de metabolitos secundarios fenólicos	15
Tabla No.4 Ejemplo de fijadores naturales.....	23
Tabla No.5 Propiedades fisicoquímicas de las alfa, beta y alfa ciclodextrinas.....	27
Tabla No. 6 Ejemplos de auxocromos y sus efectos en el espectro electromagnético.....	35

Tabla No. 7 Reactivos.....	42
Tabla No.8 Equipo.....	42
Tabla No.9 Cristalería.....	43
Tabla No.10 Energías (Kcal/mol) metabolito, ciclodextrina, complejo Metabolito-ciclodextrina y su diferencia energética obtenidas mediante la mecánica molecular.....	47
Tabla No.11 Energías (Kcal/mol) metabolito, ciclodextrina, complejo Metabolito-ciclodextrina y la energía de estabilización de los complejos obtenidos mediante la dinámica molecular.....	48
Tabla No.12 Contantes de asociación de los complejos de inclusión preparados en el laboratorio.....	53

INDICE DE FIGURAS

Figura No.1 Esquema de las rutas biosintéticas de los metabolitos secundarios fenólicos.....	13
Figura No.2 Esquema de las rutas biosintéticas de los terpenoides.....	14
Figura No.3 Estructura del Eugenol, componente principal del aceite de clavo...16	
Figura No. 4 Estructura del Timol, componente principal del aceite de tomillo....18	
Figura No.5 Estructura del carvacrol, componente principal del aceite de orégano	20
Figura No. 6 Representación esquemática de las α -, β - y γ -CD.....	28
Figura No.7 Ciclodextrinas simples y modificadas.....	29
Figura No.8 Formación de complejos de inclusión ciclodextrina-metabolito secundario (analito).....	31
Figura No.9 Conformación más estable del complejo 2-hidroxipropil-beta-carvacrol (HPBC).....	49
Figura No.10 Conformación más estable del complejo 2-hidroxipropil- β -carvacrol (HPBC) obtenido mediante dinámica molecular.....	49
Figura No.11 Conformación más estable del complejo beta-carvacrol (BETC)...50	
Figura No.12 Conformación más estable del complejo 2-hidroxipropil-beta-eugenol (HPBE).....	50

Figura No.13 Conformación más estable del complejo beta-eugenol (BETE).....	51
Figura No.14 Conformación más estable del complejo 2-hidroxiopropil-beta-timol (HPBT).....	51
Figura No.15 Conformación más estable del complejo beta-timol (BETT).....	52

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica No.1 Preparación del complejo Beta-Eugenol con el método de las proporciones múltiples.....	52
Gráfica No.2 Curva de calibración Eugenol (3 – 15 mM).....	53

GLOSARIO

CD: ciclodextrina

ALFA: α -ciclodextrina

BETA : β -ciclodextrina

BETC: β -ciclodextrina-carvacrol

BETE: β -ciclodextrina-eugenol

BETT: β -ciclodextrina-timol

MD: Molecular Dynamics (Dinámica Molecular)

GAMA: γ -ciclodextrina

HEBC: 2-hidroxietyl- β -ciclodextrina-carvacrol

HEBE: 2-hidroxietyl- β -ciclodextrina-eugenol

HEBT: 2-hidroxietyl- β -ciclodextrina-timol

HECD: 2-hidroxietyl- β -ciclodextrina

HPCD: 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina

MAP: Modified Atmosphere Packaging

MBCD: metil- β -ciclodextrina

MM: Molecular Mechanics (Mecánica molecular)

PBCD: propil- β -ciclodextrina

UV: Ultravioleta visible

I. RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se evaluaron 7 tipos de ciclodextrinas (CD) con el objeto de determinar la formación de complejos de inclusión, para ser utilizados como fijadores de aromas. Los fijadores de aromas que se utilizan comúnmente, disminuyen la tasa de evaporación de las fragancias presentando toxicidad crónica al ser utilizados, según Lamas (2011, p. 12). Las CD encapsulan los aromas para una posterior liberación controlada, sin presentar efectos secundarios a diferencia de los anteriores. Las CD elegidas para este fin fueron α -ciclodextrina, β -ciclodextrina (BETA), γ -ciclodextrina, 2-hidroxiethyl- β -ciclodextrina, 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, metil- β -ciclodextrina y propil- β -ciclodextrina y los metabolitos utilizados fueron eugenol, timol y carvacrol.

Para ello, se usó simulación computacional utilizando los programas Avogadro, SYBYL X y SYBYL 8, y el programa UCSF Chimera, calculando valores energéticos mediante la mecánica molecular (MM) y dinámica molecular (MD). Lo anterior se realizó con el fin de determinar cual(es) de las CD evaluadas presentaban mayor estabilidad para ser preparadas a nivel de laboratorio. Se eligieron los valores menores a 0 KJ/mol, los cual indicó que la formación de los complejos de inclusión se ve favorecida.

Según los resultados computacionales se eligió la 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (HPCD), así como con la β -ciclodextrina (BETA), para preparar los complejos de inclusión en el laboratorio, realizando una modificación al método de la variación de solubilidad, propuesto por Higuchi & Connors en el año 1965 realizando una modificación al método de Benesi-Hildebrand (Hernández, López, Lucas & Núñez, 2012).

Se determinó experimentalmente, que se formaron los complejos de inclusión β -ciclodextrina-eugenol (BETE), β -ciclodextrina-timol (BETT), β -ciclodextrina-carvacrol (BETC), 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina-carvacrol (HPBC), 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina-timol (HPBT), mediante las constantes de equilibrio de los 5 complejos preparados, obteniendo valores menores a 1.

Los datos obtenidos en la simulación fueron congruentes con los experimentales, ya que satisfactoriamente se formaron 5 de los 6 complejos preparados, según los valores de las constantes de equilibrio que se obtuvieron, con lo cual se determinó que sí es posible el uso de las CD para acomplejar eugenol, timol y carvacrol.

II. INTRODUCCIÓN

Los productos que poseen aromatizantes, tales como perfumes o productos de cuidado personal, son utilizados por las personas de manera frecuente. Para poder prolongar la duración de las fragancias se les agregan aditivos que evitan la evaporación de los aromas, y otros aditivos tales como preservantes, colorantes, entre otros.

Entre los fijadores que son utilizados se encuentran los de origen natural y sintético. Los fijadores naturales se pueden obtener de plantas y animales, mientras los sintéticos se obtienen en el laboratorio mediante síntesis o modificación de moléculas de origen natural. Estas sustancias disminuyen la velocidad de evaporación de las fragancias, las cuales están compuestas de aceites esenciales. La elección del fijador depende de varios factores, tales como el costo, la duración deseada de la fragancia y el tipo de producto que se formula.

Se ha determinado que muchas de estas sustancias fijadoras pueden causar diferentes efectos en los organismos de las personas que los utilizan con frecuencia, provocando desde alergias hasta daños severos, tales como esterilidad y daños en órganos, según lo menciona Lamas (2011), por lo que el uso de alternativas de fijadores que no causen ningún efecto representa una oportunidad en las industrias para disminuir o minimizar estos efectos nocivos. Una de las sustancias que se utiliza como agente fijador debido su capacidad para encapsular sustancias son las ciclodextrinas, las cuales son anillos formados por 6, 7 y hasta 8 moléculas de glucosa.

El presente trabajo de investigación se desarrolló utilizando la química computacional como herramienta para realizar simulaciones para la acción fijadora de ciclodextrinas en metabolitos secundarios aromáticos. Posteriormente se realizó la parte experimental en la cual se pretendió determinar la actividad fijadora de las ciclodextrinas y comparar los datos teóricos con los experimentales, preparando complejos ciclodextrina-metabolito secundario en el laboratorio.

Se espera que los resultados obtenidos sean de utilidad en la industria cosmética o farmacéutica a nivel nacional, para sustituir fijadores de aromas que

pueden ser perjudiciales, por las ciclodextrinas, lo cual podría contribuir a mejorar la calidad de vida de los usuarios de estos productos disminuyendo la probabilidad de sufrir problemas relacionados con el uso constante de estos.

En el primer capítulo se hablará brevemente sobre los aceites esenciales y los compuestos de los que están conformados, tipos y características de las fragancias.

En el segundo capítulo se describe la naturaleza de los metabolitos secundarios de interés, en este caso son eugenol, timol y carvacrol, los cuales por los grupos funcionales que poseen, son clasificados como metabolitos secundarios fenólicos. Así mismo se exponen generalidades, origen, usos, aplicaciones y toxicidad de estos.

En el tercer capítulo se describe todo lo concerniente a las ciclodextrinas, origen, tipos, características físicas y propiedades químicas, usos, aplicaciones, así como la formación de los complejos de inclusión ciclodextrina-metabolito secundario.

En el cuarto capítulo se trata de una breve descripción de la química computacional y de las herramientas que esta posee para simular la formación de complejos formados por diferentes tipos de ciclodextrinas y los metabolitos secundarios fenólicos eugenol, timol y carvacrol.

En el quinto capítulo se detalla el diseño de la investigación, la cual inició con el diseño computacional de los complejos ciclodextrina-metabolito, optimización de los mismos y la posterior determinación de las ciclodextrinas a utilizar en la parte experimental. Posterior a esto se prepararon en el laboratorio, en condiciones experimentales muy similares, los complejos de inclusión y se determinó, mediante análisis instrumental, la formación de los mismos.

Al llevar a cabo la metodología que en el presente trabajo se describe, se determinó la efectividad de las ciclodextrinas como agentes fijadores de aromas, para que puedan ser utilizadas como una alternativa en la industria de las fragancias, que no causa ningún efecto por su uso prolongado.

III. ANTECEDENTES

Los componentes de algunos productos utilizados para el cuidado personal de uso cotidiano, pueden provocar alergias en personas con sensibilidad a estas sustancias, y pueden provocar daños al organismo, debido a la acumulación por uso prolongado de dichos aditivos, los cuales son utilizados como disolventes y diluyentes sin olor, fijadores de perfumes (en aguas de colonia, entre otros). Algunos de estos compuestos están considerados como posibles agentes mutágenos, carcinógenos y tóxicos para la reproducción humana, refleja el estudio publicado por Lamas (2011).

Hernández (2011), utilizó ciclodextrinas para formar complejos de inclusión sólidos con el aceite de clavo para su utilización como preservante en la industria de alimentos, empleando para su formación diferentes métodos, y diversas fuentes de energía para la formación de los complejos, para determinar el costo de producción y el mejor rendimiento. El estudio fue realizado para la estabilidad de la formación de complejo ciclodextrina-aceite esencial de clavo.

Se han realizado varios trabajos de investigación formando complejos de inclusión, otro ejemplo de esto fue el trabajo realizado por Lou (2011), quien realizó un análisis de la mecánica molecular de la formación del complejo entre el α -naftalen carboxilato (NC) y el cucurbit[8]urilo (CB8) utilizando el programa de simulación SYBYL. El procedimiento fue llevado a cabo en medios no solvatado y solvatado, observando que no existe diferencia energética aparente entre las simulaciones en ambos sistemas. Las energías de estabilización en función del recorrido del sustrato presentan formas muy similares; ambos procesos demuestran que la formación del complejo de inclusión es termodinámicamente favorecida.

Lou (2011) evaluó la separación enantiomérica del acetato de 3-metil-5-metilpentilo mediante su interacción con diferentes ciclodextrinas, a través de cálculos utilizando mecánica molecular. Las ciclodextrinas evaluadas fueron α -ciclodextrina, β -ciclodextrina, metil- β -ciclodextrina, propil- β -ciclodextrina, 2-hidroxietil- β -ciclodextrina, 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina y la γ -ciclodextrina, las cuales formaron complejos de inclusión.

Torres (2014) realizó la evaluación de los datos de energía de la formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas para la separación enantiomérica del 3-metil-5-metilpentilo, contemplando los valores menores a 0 KJ/mol, lo cual indica que pueden formarse los complejos al prepararlos de forma experimental, analizándolo de forma entálpica. Se determinó que la 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina y la γ -ciclodextrina presentaron los perfiles de energía necesarios para la formación de los complejos de inclusión ciclodextrina-3-metil-5-metilpentilo.

III.1 Marco Teórico

CAPITULO No. 1 ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales son productos obtenidos a partir de material vegetal, utilizando diversos métodos, tales como arrastre con vapor, procedimientos mecánicos, entre otros. Son una mezcla de sustancias volátiles, las cuales son producto del metabolismo secundario de las plantas teniendo en su composición hidrocarburos de la serie polimetilénica pertenecientes al grupo de los terpenos, así como otros compuestos tales como alcoholes, compuestos fenólicos, ésteres, éteres y aldehídos (Flores, 2010).

Los componentes de los aceites esenciales se caracterizan por su origen biogenético: los terpenoides son biosintetizados a partir de los pirofosfatos de geranilo y farnesilo a través de la ruta del ácido mevalónico o del metileritritol fosfato; y el grupo de los compuestos aromáticos y fenólicos que son sintetizados a través de la ruta del Shikimato, dando como producto compuestos derivados del fenilpropano o del ácido malónico, la cual es menos frecuente (Mérida, 2012, p.14; Ávalos & Pérez-Urria, 2009, p. 12).

Son los responsables del aroma de algunas flores y semillas, algunos presentan actividad óptica, debido a la gran cantidad de compuestos que poseen centros quirales, siendo útil esta propiedad para determinar su pureza, ya que cada uno posee un índice de refracción único. Son propensos a reacciones fotolíticas y a oxidación, lo cual puede provocar cambio del aroma y de la coloración, por lo que al almacenarlo es necesario colocarlo fuera del alcance de la luz y en recipientes completamente cerrados para evitar estos cambios indeseados (Bauer, Garbe & Surburg, 1990; Bruneton, 2001; Mérida, 2012).

Los aceites esenciales poseen actividad antifúngica, antiviral, antimicrobiana e insecticida, su peso molecular es menor a 400 Da, la mayoría son líquidos transparentes a temperatura ambiente, aunque se pueden encontrar ligeramente coloreados, generalmente son menos densos que el agua, con excepciones tales como los aceites del ajo (*Allium sativum* L.), sasafrás (*Sassafras albidum*) y clavo (*Syzygium aromaticum*) según Mérida (2012).

1.1 COMPOSICIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales, son una mezcla compleja de variados componentes, pudiéndose encontrar en ellos de 60 a 200 sustancias diferentes, siendo algunas de estas los terpenos, las cuales son las sustancias más volátiles, y estos pueden clasificarse en monoterpenos, formando cadenas de diez carbonos, que pueden ser acíclicos, monocíclicos o bicíclicos, constituyendo más del 85% del aceite esencial. Así mismo están presentes los sesquiterpenos, conformados por 15 carbonos que pueden presentar variaciones estructurales iguales a los monoterpenos, siendo las más comunes, alcoholes, cetonas e hidrocarburos, según lo menciona Mérida (2012). En la siguiente tabla se pueden observar ejemplos de los monoterpenos y sesquiterpenos que conforman algunos aceites esenciales, así como los grupos funcionales que están presenten en estos.

TABLA No.1 Ejemplos de monoterpenos y diterpenos presentes en los aceites esenciales

SESQUITERPENOS			MONOTERPENOS		
Grupo funcional	Nombre de metabolito	Grupo funcional	Acíclicos	Monocíclicos	Bicíclicos
Hidrocarburos mono- o policíclicos	β -bisaboleno, β -cariofileno.	Alcoholes	Geraniol, citronelol	Mentol	Borneol
Alcoholes	Patchulol, farnesol	Aldehídos	Geranial, citronelal	---	---
Cetonas	β -vetivona, Nootkatona	Fenoles	----	Timol, carvacrol, eugenol.	----
Aldehídos	Sinensales	Cetonas	Tagetona	Carvona, mentona	Alcanfor
Ésteres	Acetato de cedrilo	Ésteres	Acetato de citronelilo	---	Acetato de isobornilo
		Éteres	1,8-cineol	Óxidos de rosa	---

Fuente: (Mérida, 2012).

CAPITULO No. 2 METABOLITOS SECUNDARIOS FENÓLICOS EN ESTUDIO (EUGENOL, TIMOL Y CARVACROL)

Los metabolitos secundarios fenólicos son compuestos biosintetizados a partir de la ruta del shikimato, obteniéndose compuestos derivados del fenilpropano, como lo es el eugenol, y las rutas del ácido mevalónico y metileritritolfosfato, donde pueden obtenerse el timol y el carvacrol. En la figura No.1 y No.2 se observan las rutas biosintéticas antes mencionadas.

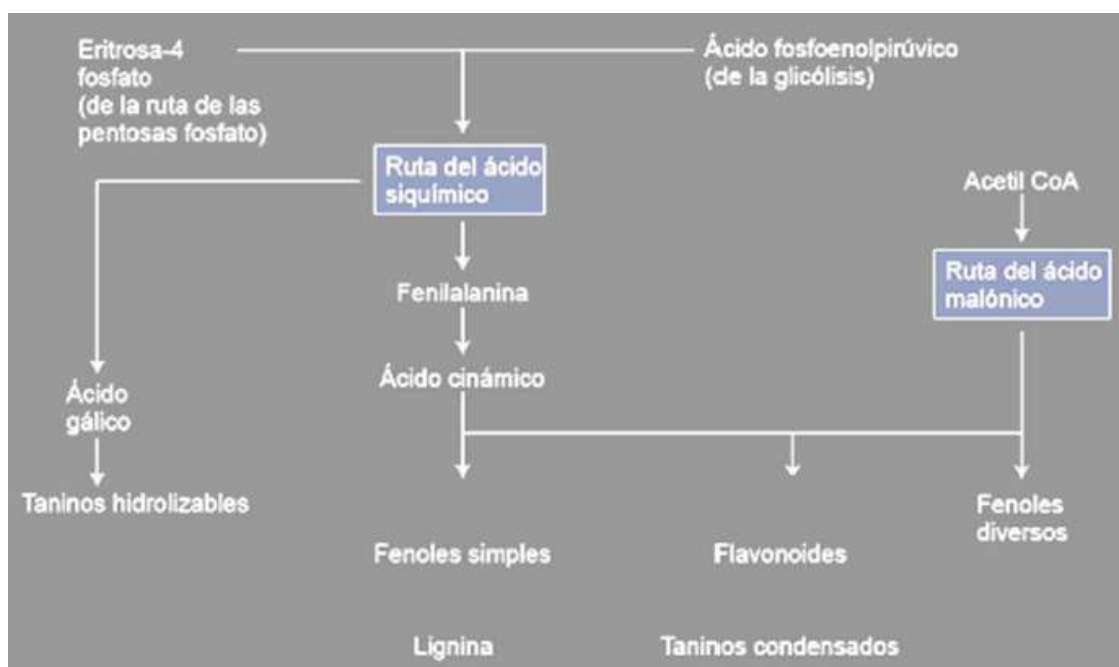


Figura No.1 Esquema de las rutas biosintéticas de los metabolitos secundarios fenólicos

Fuente: (Ávalos y Pérez-Urria, 2009)

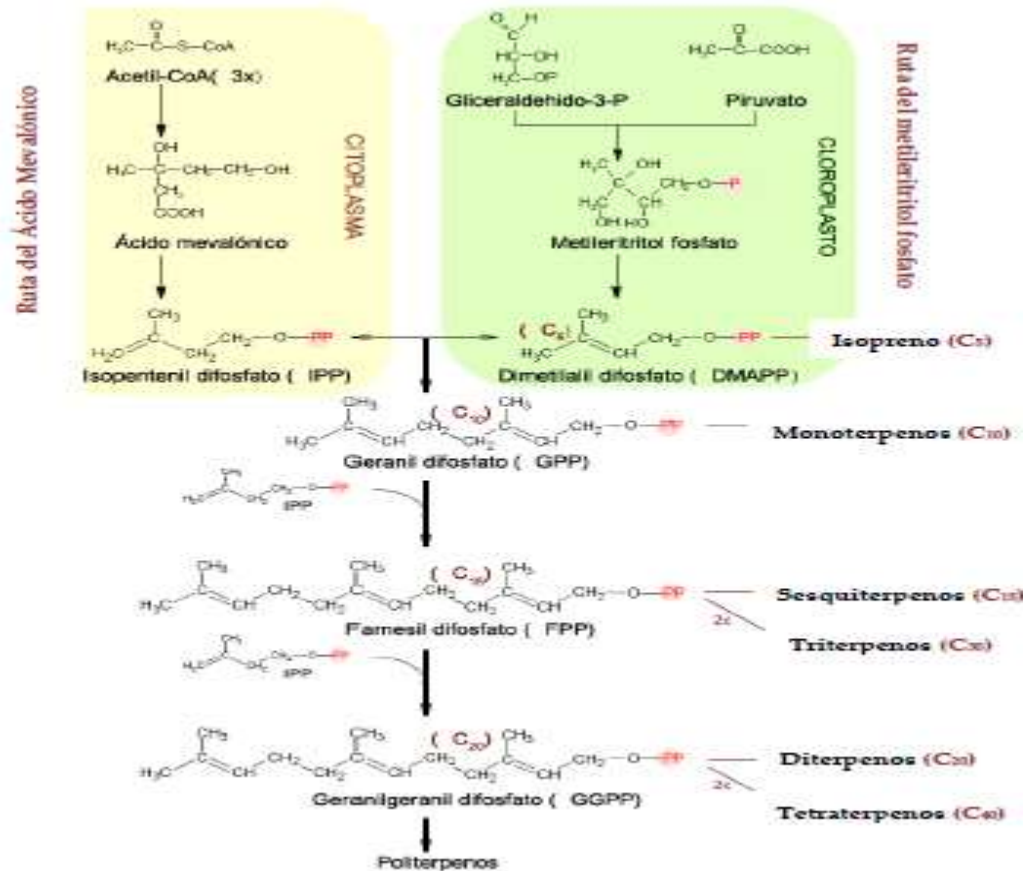


Figura No.2 Esquema de las rutas biosintéticas de los terpenoides
(Fuente: Hernández, 2011)

Los metabolitos secundarios fenólicos se encuentran presentes en menor proporción que los terpenoides, los cuales son los componentes mayoritarios que conforman los aceites esenciales. La mayor proporción se trata de alil y propenil fenoles, así como aldehídos, según lo menciona Flores (2010). Como ejemplo de aceites esenciales se observa la tabla No.2:

TABLA No.2 Ejemplos de aceites esenciales que poseen metabolitos secundarios fenólicos en su composición

Aceites esenciales que poseen metabolitos secundarios fenólicos en su composición
Anís, hinojo, perejil, clavo, nuez moscada, estragón, albahaca, cálamo aromático, canelas, clavo, orégano, tomillo.

Fuente: (Flores, 2010).

En la tabla No.3 se presentan algunos metabolitos secundarios fenólicos que forman parte de la composición de algunos aceites esenciales.

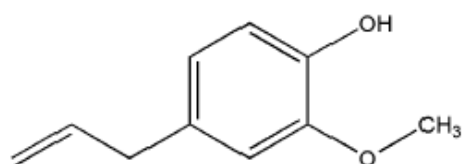
TABLA No.3 Ejemplos de metabolitos secundarios fenólicos

Ejemplo de metabolitos secundarios fenólicos
Anetol, anisaldehído, apiol, metilchavicol, eugenol, safrol, asaronas, cinamaldehído, timol y carvacrol

Fuente: (Flores, 2010).

2.1 EUGENOL

El eugenol es una molécula derivada del fenilpropano, presente en varios aceites esenciales de plantas aromáticas, siendo el principal componente del aceite esencial de clavo, donde puede encontrarse en un 49-98 %. (Chaieb et al., 2007). La figura No.3 permite apreciar los grupos funcionales presentes en el eugenol.



Eugenol

FIGURA No.3 Estructura del Eugenol, componente principal del aceite de clavo

Fuente: (Hernández, 2011).

2.1.1 PROPIEDADES

El eugenol posee muchos otros beneficios entre los cuales se puede mencionar sus propiedades antibacteriana, antivírica, antitumoral, anestésica, insecticida, hepatoprotectora, antidiabética, antiinflamatoria, antiplaquetaria, antiestress, anticarcinogénica y antipirética (Hernández, 2011).

El eugenol posee propiedades antifúngicas, debido a su acción sobre la membrana celular, lo cual induce la muerte de las células, según demostraron Cox, Man y Markham (2001). Es efectivo para combatir *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus niger*. (Tampieri, Galuppi & Macchioni, 2005; Pawar & Thaker, 2006).

2.1.2 USOS Y APLICACIONES

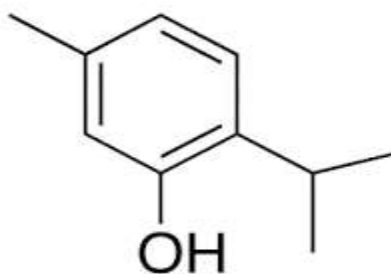
Gracias a los estudios realizados, es posible utilizar el eugenol en la industria farmacéutica y alimenticia como antimicrobiano así como para retrasar los productos de oxidación, lo cual hace que aumente la vida útil y permanezcan las propiedades originales de los productos preparados. (Gulcin, Gungor, Beydenir, Elmastas &, Kufrevioglu, 2004). En odontología se aplica como desinflamante, desinfectante y anestésico. En la industria cosmética y de cuidado personal, se utiliza en la elaboración de jabones, sprays bucales, soluciones orales, dentífricos, tintes para cabello, perfumes y fragancias, principalmente en las de la familia olfativa oriental y oriental especiada, tratamientos de cosmética corporal, cremas hidratantes faciales y maquillaje de labios (Hernández, 2011).

2.1.3 TOXICIDADES/CONTRAINDICACIONES

No existen estudios epidemiológicos en cuanto al consumo y uso externo del eugenol en seres humanos, sin embargo, se han realizado ensayos de laboratorio utilizando ratas, y debido a lo exitosos que estos han sido, la Food and Drug Administration (FDA) acepta su uso en la industria alimentaria, medicinal, cosmética, entre otras, con una concentración menor a 1500 ppm. Así mismo la EPA (Environmental Protection Agency) de los Estados Unidos de América, lo cataloga como pesticida de riesgo mínimo. La OMS (Organización Mundial de la Salud) considera como dieta ingesta diaria aceptable de 2,5 mg/Kg-día. La ingestión de altas dosis de eugenol puede causar daños respiratorios, fallos hepáticos, y depresión del sistema nervioso central. La dosis letal descrita es de 3,75 g/Kg de peso corporal (Hernández, 2011).

2.2 TIMOL

El timol es el principal componente del aceite de tomillo, el cual es un monoterpenoide fenólico, cíclico, como se ve en la figura No. 2 el cual se encuentra en un porcentaje que varía del 36 – 55 % en el tomillo (*Timus vulgaricus*) (Domínguez, 1997). En la figura No.4 se puede observar la estructura del timol.



Timol

Figura No. 4 Estructura del Timol, componente principal del aceite de tomillo

Fuente: (Uniquim, 2016)

2.2.1 PROPIEDADES

Los componentes fenólicos del aceite de tomillo (*T. vulgaricus*), timol y carvacrol, presentan actividad antibacteriana frente a bacterias grampositivas y gramnegativas, ya que actúan sobre la membrana bacteriana. Posee actividad antiséptica al ser eliminados por vía respiratoria, así mismo es un antiséptico urinario y de la cavidad bucofaríngea, y puede ser utilizado en la desinfección de heridas; es efectivo frente a *Candida albicans*.

Posee propiedades sobre los sistemas respiratorio, inmunitario y circulatorio. Se utiliza como tónico energizante natural. Beneficia los tractos intestinal, pulmonar y genitourinario. Es un excelente antiespasmódico, antitóxico, antiviral, antiséptico, astringente, diurético, afrodisíaco, bactericida, cicatrizante y parasiticida (infojardin, s.f.; cepvi, s.f.).

2.2.2 USOS Y APLICACIONES

Se utiliza como antimicrobiano y antifúngico en el tratamiento de frutas y verduras para alargar su vida útil. Una mezcla preparada con eugenol, mentol y timol, ha sido utilizada para inducir un aumento de la vida útil de uva sin semillas. En estudios posteriores, se utilizaron mezclas de eugenol, timol y carvacrol en combinación con técnicas de envasado activo o de atmosfera modifica MAP (Modified Atmosphere Packaging), en diversas variedades de uvas, se pudo observar que la adición de esta mezcla conserva mejor las uvas, con menor pérdida de firmeza y de acidez, menor acumulación de azúcar y disminuye los cambios de color. Además, tanto el recuento de aerobios mesófilos como de mohos y levaduras fueron inferiores en las uvas tratadas lo cual menciona Valero et al. (2006).

2.2.3 TOXICIDADES/CONTRAINDICACIONES

Los preparados de la plantas de las familia de las *Lamiaceaes*, las cuales poseen timol en su composición son en general, muy seguros de consumir, en especial si se ingieren sus preparados naturales y sin dosis excesivas. Sin embargo, los aceites esenciales de estas pueden provocar efectos tóxicos en las personas que lo consumen. No se recomienda la ingesta de estos en mujeres dando lactancia o en estado de gestación, ya que no se conoce en detalle, los efectos que podrían causar, ya que puede tener efectos abortivos.

El consumo, en dosis elevadas, de los aceites esenciales de estas plantas podría ocasionar algún tipo de intoxicación, dando como síntomas fuertes dolores estomacales y de cabeza, mareos, diarreas y vómitos (Plantasparacurar, s.f.).

Está reportado que el uso del timol puro, por tiempo prolongado y en grandes dosis puede ser corrosivo y cáustico por contacto con la piel, pudiendo causar daños irreversibles en los ojos, problemas de alergia; es tóxico por ingestión e irritante por inhalación, debiendo evitarse inhalar sus vapores e ingerirlo, así como evitar el contacto con la piel (Desde la piquera, s.f.).

2.3 CARVACROL

El carvacrol, como se observa en la figura No.5, es un terpenoide, fenólico, cíclico, principal componente del aceite de orégano, el cual está presente en un 91-98%. Al igual que el timol y el eugenol, posee propiedades antioxidantes, actividad farmacológica, etc.

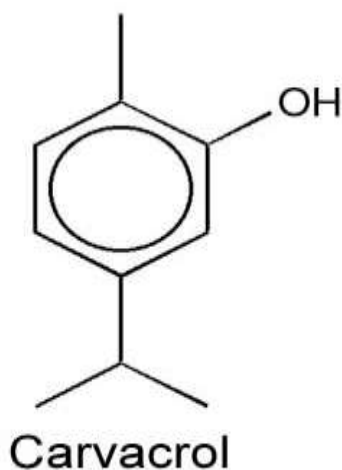


Figura No.5 Estructura del carvacrol, componente principal del aceite de orégano

Fuente: (Candida Hub, s.f.)

2.3.1 PROPIEDADES

El carvacrol posee propiedades farmacológicas, siendo utilizado en el tratamiento de algunos problemas digestivos, siendo muy recomendado para atacar la flatulencia, ya que facilita la eliminación de los gases atrapados en el tubo digestivo. Debido a esto es muy recomendado para aquellas personas que presenten meteorismo y flatulencia. Así mismo promueven la función biliar, lo cual favorece la digestión, y el movimiento intestinal, por lo que combaten los problemas de estreñimiento, digestión lenta y problemas digestivos en general, recomendándose el ingerirlo posterior a las comidas.

Se utiliza en el tratamiento de resfriados o catarros, y problemas bronquiales, Es antimicótico, ya que previene infecciones de hongos tales como la candidiasis. La resistencia fúngica a los componentes del orégano es muy rara. De hecho, el orégano es un agente anti-fúngico tan poderoso que es capaz de destruir hongos que han sido mutados en el laboratorio como resistentes y formas resistentes de hongos que resultan de la terapia antibiótica. Es también un poderoso antioxidante debido a la presencia de compuestos fenólicos. También puede proteger contra una amplia variedad de infiltración parásitos diferentes, tanto dentro del cuerpo, así como el entorno físico. Esto incluye los gusanos redondos, gusanos planos chinchas, piojos, pulgas y mosquitos (Willey, Sherwood &, Woolverton, 1997; Fan, 2008; Bartels, 1980).

2.3.2 USOS Y APLICACIONES

La combinación de eugenol y carvacrol con cinamaldehído es utilizada para aumentar el rendimiento de animales rumiantes destinados a la producción de leche y carne, así mismo para mejorar el sabor de la carne de ave, mediante dietas enriquecidas con bajas dosis de estos metabolitos. Otros documentos evidencian el uso combinado de ambos compuestos en la industria alimentaria como agentes aromáticos imitando el sabor de cola (Gautier, Kamel &, Doane, 2011).

2.3.3 TOXICIDADES/CONTRAINDICACIONES

Los aceites esenciales del orégano no son tóxicos si se consumen en su estado natural en bajas dosis. Sin embargo, los aceites esenciales de la planta de orégano pueden ser catalogados como tóxicos, ya que causan efectos narcóticos, dando como síntomas sueño, somnolencia o adormecimiento en algunas partes del cuerpo, pueden ser abortivos y pueden causar problemas en el periodo de lactancia. No se recomienda el consumo de los componentes del aceite esencial del orégano a personas con problemas de gastritis, colon irritable, úlceras ya que el consumo de estos aceites esenciales puede ocasionar un aumento de los síntomas en personas que presenten estas afecciones (Plantasparacurar, s.f.).

CAPITULO No.3 CICLODEXTRINAS (CD) COMO FIJADORES

1.1 FIJADORES

Los fijadores de aromas son sustancias que se utilizan para preservar y aumentar la presencia de las notas olfativas en un perfume. Esto se da gracias a que los fijadores retienen el olor y disminuyen la velocidad de evaporación de las sustancias volátiles al disminuir su presión de vapor. Los fijadores se dividen, según su origen, en fijadores naturales y artificiales.

1.1.1 FIJADORES NATURALES

Los fijadores naturales son sustancias que se extraen de organismos tales como las plantas o animales. Se dividen en sustancias de origen natural y de origen vegetal, las cuales son añadidas a las fragancias para retener y prolongar su aroma (Arctander, 1994). En la tabla No.4 se observan ejemplos de fijadores tanto animales como vegetales:

Tabla No.4 Ejemplo de fijadores naturales

FIJADORES NATURALES	
FIJADORES VEGETALES	FIJADORES ANIMALES
Bálsamo de Perú, liquen de encina, olíbano y resinas tales como pachulí y vetiver.	Almizcle, ámbar, castóreo.

Fuente: (Cuy & Merlo, 2004)

3.1.1.1 VENTAJAS

Son producidos por organismos vivos, ya sean animales o vegetales. Son potenciadores de los aromas, aún siendo utilizados en pequeñas cantidades y la mayoría no interfiere en el aroma de los perfumes con los que se mezclan. No presentan bioacumulación en los humanos.

3.1.1.2 DESVENTAJAS

Debido a que se trata de organismos vivos, en el caso de los animales, es necesario destazarlos y se obtiene solamente una pequeña cantidad de la sustancia. Al ser de origen vegetal, se obtiene un exudado de origen natural o patológico, en ambos casos se obtiene una cantidad pequeña. Todo esto se traduce en altos costos y por consiguiente se afectan los ecosistemas debido a que es necesario eliminar muchos ejemplares para la producción de perfumes (Lamas, 2011).

3.1.2 FIJADORES ARTIFICIALES

Los fijadores artificiales son sustancias que tienen origen sintético, es decir, que no se encuentran naturalmente y es necesario sintetizarlos en el laboratorio para obtenerlos. En esta clasificación se puede encontrar al indol, ftalato de dietilo y ciclodextrinas por mencionar algunos (Lamas, 2011).

3.1.2.1 VENTAJAS

Los fijadores de origen sintético presentan la ventaja de poseer generalmente un bajo costo de fabricación, pueden tener más de una aplicación a nivel industrial, por ejemplo, los ftalatos en la industria cosmética se utilizan como disolventes, diluyentes en productos para uñas y cabello, teniendo como característica especial

la falta de aroma, además de su función como fijadores de fragancias en colonias, perfumes, etc. (Lamas, 2011). Las ciclodextrinas no poseen toxicidad alguna.

3.1.2.2 DESVENTAJAS

La mayoría de los fijadores artificiales tienen la desventaja que pueden causar bioacumulación en los seres humanos, pudiendo causar trastornos genéticos y daños irreversibles.

Algunas sustancias como los ftalatos, se consideran disruptores endocrinos ya que son tóxicos y al acumularse en los organismos, afectan la reproducción y el desarrollo en animales, produciendo un descenso de los niveles de testosterona y malformaciones del sistema reproductor (Lamas, 2011). Existen estudios que revelan que las mujeres pueden tener mayores niveles de algunos ftalatos que los hombres, lo cual puede deberse a que tienen un mayor uso de productos de aseo y belleza, lo cual es preocupante debido a la exposición de mujeres en edad fértil por los posibles efectos sobre el feto. Se ha reportado que puede causar mala calidad del semen, daños en el ADN de los espermatozoides, reducción de las hormonas masculinas, infertilidad, menor tamaño del pene, reducción de la distancia ano-genital, ginecomastia, bajo peso al nacer, endometriosis, obesidad, resistencia a la insulina, efectos tiroideos, por mencionar algunos (De Prada, 2016).

“Diferentes investigaciones asocian algunos ftalatos a efectos diversos como malformaciones genitales congénitas (criptorquidias, hipospadias), deterioro de la calidad seminal, menor fertilidad, feminización, desarrollo prematuro de las mamas en hembras, efectos tiroideos, obesidad, resistencia a la insulina, alteraciones a la respuesta inmune. Las sustancias que actúan como disruptoras endocrinas no está claro que tengan un límite de concentración mínimo que pueda considerarse como claramente seguro” (De Prada, 2016, p.16).

Sin embargo, las ciclodextrinas, a pesar de ser de origen sintético, presentan baja toxicidad y gran cantidad de propiedades, las cuales son útiles en la preparación de fragancias. A continuación, se describirán brevemente las ciclodextrinas, sus propiedades y aplicaciones.

3.2 CICLODEXTRINAS

Las ciclodextrinas son oligómeros cíclicos de 6, 7, y 8 unidades de glucosa, correspondientes a las α -ciclodextrina (α -CD), β -ciclodextrina (β -CD) y γ -ciclodextrina (γ -CD) respectivamente, las cuales son producto de la degradación del almidón mediante una reacción de transglucosilación intramolecular, llevada a cabo por la enzima ciclodextrina glucanotransferasa (CGTasa) excretada por *Bacillus macerans*. Las CD poseen características similares, tanto biológicas como bioquímicas, de las dextrinas lineales que son solubles en agua. A las ciclodextrinas se les conoce con otros nombres como cicloamilosa, ciclomaltosas o dextrinas de Schardinger (Szetjili, 1998; Villiers, 1981; Eastburn & Tao, 1994; Hernández, 2011).

3.2 CICLODEXTRINAS (CD) MADRE

Las α -, β - y γ -CD poseen todas las glucosas hidroxiladas, por lo que es posible la formación de puentes de hidrogeno con el agua, debido a que se encuentran orientados hacia la parte externa del anillo de ciclodextrina. Sin embargo, su parte interna es relativamente apolar, por lo que su solubilidad en agua es parcial, lo cual indica que las ciclodextrinas en agua pueden formar contener en su parte interna moléculas que posean la misma polaridad, sin modificar su parte externa que es mucho más polar. (Brinker & Mieusset, 2010; Hernández, 2011). En la tabla No.5 se pueden observar las propiedades fisicoquímicas de las ciclodextrinas.

Tabla No.5 Propiedades fisicoquímicas de las alfa, beta y alfa ciclodextrinas

Propiedades	α - CD	β - CD	γ - CD
Número de glucopiranosas	6	7	8
Peso molecular (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidad en agua a 20°C (g/L)	90	16.4	185
Solubilidad en agua a 25 °C (g/L)	1271	18.7	256
Solubilidad en agua a 35 °C (g/L)	204	28.3	390
Diámetro exterior (*A)	14.6	15.4	17.5
Diámetro de la cavidad (*A)	4.7 – 5.3	6.0 – 6.5	7.5 – 8.3
Volumen de la cavidad (*A³)	174	262	427
Altura del cono (*A)	7.9	7.9	7.9
ΔH° de solución (KJ/mol)	32.1	34.7	32.2
ΔS° de solución (J/K)	57.7	48.9	61.4
pK_a (método potenciométrico a 25°C)	12.33	12.20	12.08
Agua (% en peso)	10.2	13.2-14.5	8.13-17.7

*A= angstroms

Fuente: (Hernández, 2011).

Las propiedades de las CD son muy similares a la de sus dextrinas análogas lineales, sin embargo, las CD son 5 veces más resistentes a la hidrólisis enzimática que las lineales. En la Figura No.6, se observan los tres tipos básicos de ciclodextrinas, según la cantidad de glucosa presente en su estructura.

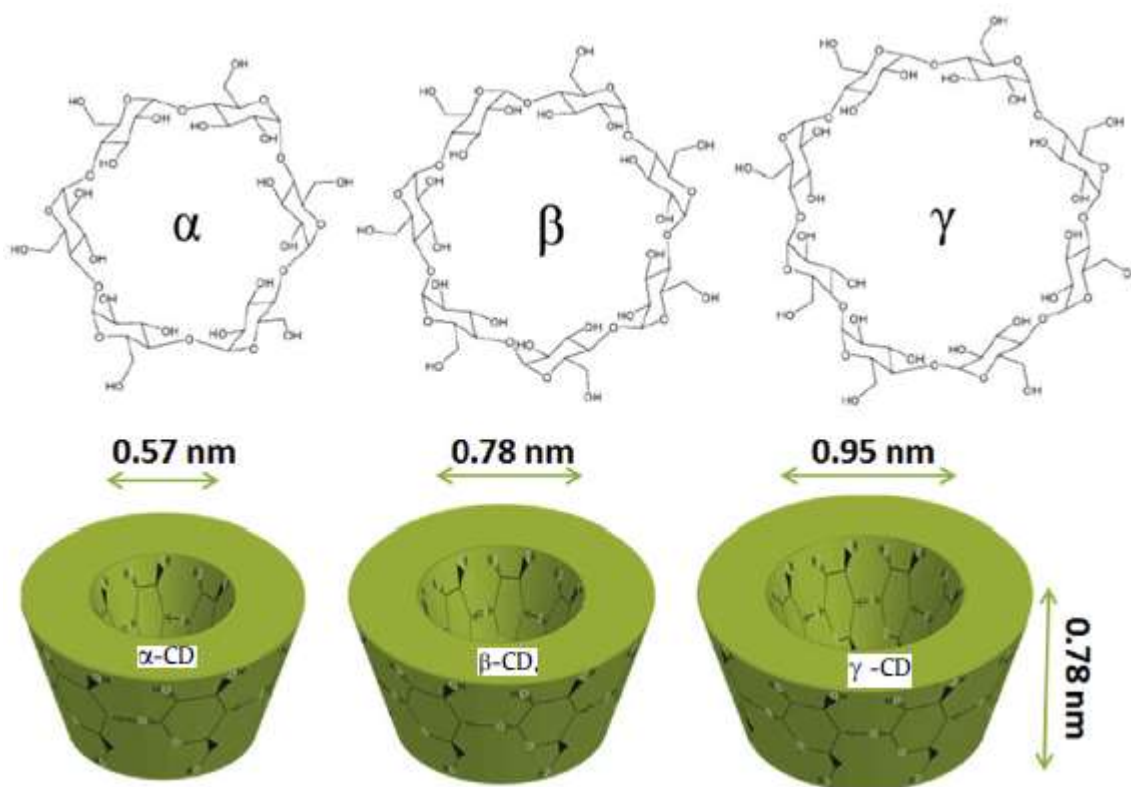


Figura No. 6 Representación esquemática de las α -, β - y γ -CD

Fuente: (González, 2012; Kayaci & Uyar, 2012).

3.3 CICLODEXTRINAS (CD) MODIFICADAS

Algunas CD presentan algunos inconvenientes, por ejemplo, las β -CD que poseen una relativa escasa solubilidad en agua, la cual se cree que se debe a que sus dimensiones moleculares son las óptimas para que su interior apolar pueda contrarrestar su polaridad. Se determinó que esta CD no es apta para uso farmacológico, debido a su carácter apolar, por lo que al buscar soluciones a este problema se encontró que la sustitución de múltiples hidroxilos en ambos bordes de la molécula, utilizando acilación, esterificación, eterificación, lo cual modifica el volumen de su cavidad interior, llamándose a estas CD modificadas o derivadas. Las CD sustituidas cubren más de un tercio de todos los medicamentos que contiene CD, ya que presentan una alta tolerancia en el cuerpo humano. Las α , β ,

y γ -CD se han podido modificar con más de 20 sustituyentes diferentes en diferentes regiones de la molécula de manera selectiva, brindándoles características específicas dependiendo del sustituyente que se añade (Villiers, 1981; Hernández, 2011). La figura No.7 es un esquema que muestra las ciclodextrinas simples y las modificaciones que pueden sufrir.

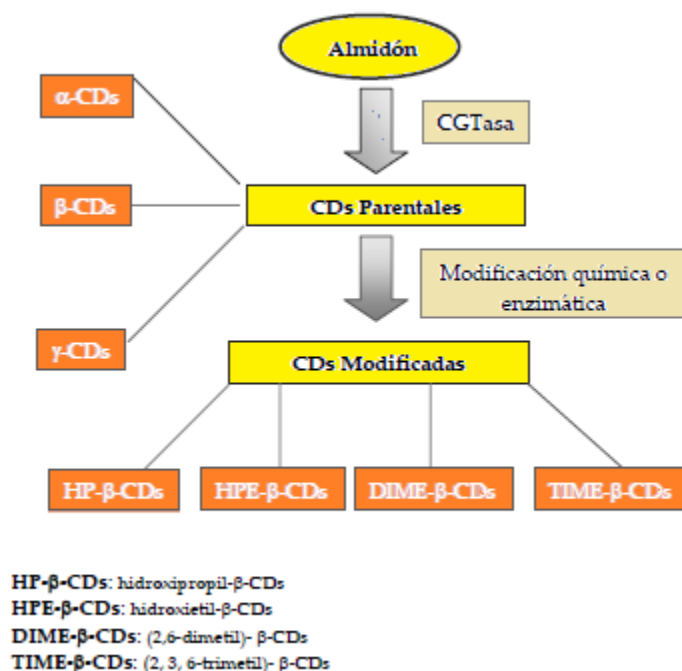


Figura No.7 Ciclodextrinas simples y modificadas

Fuente: (Hernández, 2011).

3.4 CICLODEXTRINAS EN COMPUESTOS DE INCLUSIÓN

Muchos aditivos, utilizados principalmente en alimentos, productos cosméticos y en la industria farmacéutica, tales como antioxidantes, sabores y aromas, generalmente resultan sensibles al calentamiento, oxígeno y luz, lo cual afecta sus propiedades. La formación de los complejos de inclusión es muy efectiva para la estabilización, protección y liberación controlada de estos aditivos con funciones específicas. La formación de complejos de inclusión con ciclodextrina, disminuye o en algunos casos, evita que sucedan los fenómenos antes mencionados (Hernández, 2011).

3.4.1 COMPLEJOS DE INCLUSIÓN

La encapsulación o formación de complejos de inclusión es una técnica en la que un material o mezcla de ciertas sustancias atrapa o encapsula en su interior a otro material. El componente que se recubre se denomina material activo o huésped, y la cubierta externa se conoce con el nombre de agente encapsulante o cubierta (Heizen, 2002).

La cápsula (complejo de inclusión) más sencilla formada, consiste en una molécula huésped rodeada por el material encapsulante, lo cual se llevará a cabo en la parte experimental de esta investigación. La molécula huésped puede estar conformada por un compuesto simple o una mezcla. Existe una amplia gama de materiales que se utilizan como agentes encapsulantes, los cuales presentan ventajas o dificultades, por lo que dependiendo de las características que se necesiten y de la finalidad del producto, se elegirá el proceso de encapsulamiento. Se conoce una amplia variedad de sustancias que se pueden utilizar como agentes encapsulantes, siendo estas proteínas, gomas, carbohidratos y almidones (Hernández, 2011).

Los complejos de inclusión de CD son complejos moleculares caracterizados por atrapamiento o la unión de forma reversible de una molécula de carácter apolar o lipofílico, por ejemplo, un resto lipófilo de una molécula de fármaco pobremente soluble en agua en la cavidad interna de CD que posee carácter apolar (Kurkov & Loftson, 2013). La figura No.8 muestra la formación de un compuesto de inclusión en medio acuoso, donde el agua es excluida de la cavidad interior, debido a su carácter apolar.

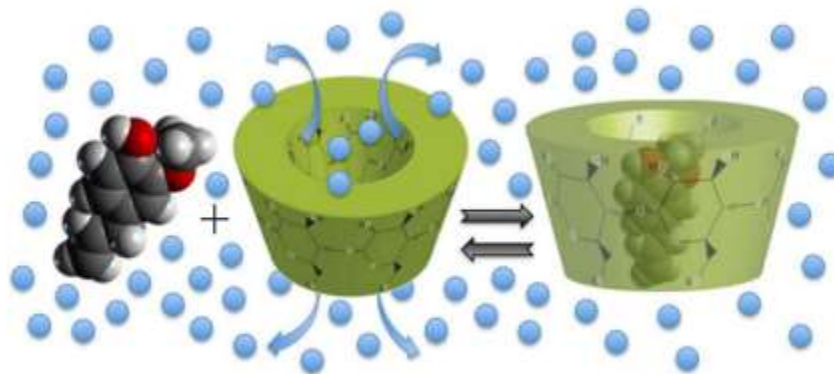


Figura No.8 Formación de complejos de inclusión ciclodextrina-metabolito secundario (analito)

Fuente: (Colchado, 2014).

3.4.2 USOS DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN

La tecnología de la encapsulación ha extendido su uso, encontrando un gran campo de aplicación, siendo muy utilizado en la industria farmacéutica, química, cosmética y alimentaria. En los campos de la alimentación, cosmética y farmacéutica, la encapsulación se ha desarrollado en grasas, colorantes y aceites, en componentes aromáticos, vitaminas y minerales, por mencionar algunos ejemplos.

La encapsulación se utiliza para disminuir procesos indeseados, evitando la formación de aromas indeseables producidos por interacciones entre componentes de los alimentos, protege de la oxidación a sustancias fotosensibles, minimiza la interacción entre componentes aromáticos, aumenta la vida útil de los aromas debido a que inhibe la oxidación de las mismas, además de controlar la liberación de los mismos dentro de un preparado alimenticio, farmacéutico o cosmético, etc. (Reineccius, 1991; Tari & Singhal, 2002; Dziezak, 1988; Jackson & Lee, 1991; Shahidi y Han, 1993).

CAPITULO No. 4 QUÍMICA COMPUTACIONAL

La relación que existe entre el estudio teórico de las moléculas y el trabajo experimental en el laboratorio es actualmente una herramienta muy útil al estudiar un sistema químico. Permite predecir el comportamiento, propiedades e interacciones de las moléculas de forma teórica, dando validez o significado a observaciones experimentales.

4.1 DISEÑO COMPUTACIONAL

La modelización molecular es una herramienta desarrollada para describir las estructuras de las moléculas, sus propiedades macroscópicas, tanto de moléculas simples como de estructuras complejas, entre los que se puede mencionar las proteínas y polisacáridos, compuestos sintéticos tales como polímeros, compuestos organometálicos, por mencionar algunos. La modelación computacional permite observar el comportamiento de las moléculas al estar en solución, al vacío y al estar interactuando con otras moléculas.

Es posible, gracias a esta herramienta, estudiar muchas de sus propiedades al equilibrio y termodinámicas, siendo datos útiles para la realización de comparación con datos obtenidos en la parte experimental, si se desea.

4.2.1 CÁLCULO DE LA ENERGÍA MECÁNICA MOLECULAR

Es un procedimiento teórico útil que permite calcular la energía y optimizar la geometría de las moléculas, utilizando las leyes de la física clásica para llegar a la estructura más estable y describir las propiedades de las moléculas. En este método la molécula es considerada como un conjunto de esferas (que representan a los átomos) las cuales están unidas por resortes (que representan a los enlaces) que poseen diferente elasticidad (González, 2012).

Este método resulta ventajoso porque realiza los cálculos en un tiempo accesible. Los resultados obtenidos son bastante fiables, aunque la molécula pueda poseer un elevado número de átomos (González, 2012). Sin embargo, es necesario poseer conocimientos de programación para utilizar la mayoría de programas, por lo que resulta costosa la utilización de los mismos para quienes no poseen esta formación.

4.2.2 CÁLCULO DE LA ENERGÍA DINÁMICA MOLECULAR

La dinámica molecular simula de forma computacional, el movimiento que realizan los átomos en una molécula en un intervalo de tiempo. Las interacciones intermoleculares producen repulsiones, elongaciones, rotación y cambio de posición de los átomos, llevando a la molécula al estado de equilibrio. Se recoge la posición y velocidad instantánea de los átomos. Así mismo, se considera la agitación térmica, la cual es dependiente de la temperatura a la que se encuentre (González, 2012).

Este método evita el uso de reactivos y los ensayos “prueba y error” por lo que en la realización del presente proyecto de investigación se utilizó la simulación computacional como herramienta que permite obtener datos y el comportamiento de las moléculas bajo condiciones específicas.

CAPITULO No.5 EQUILIBRIO QUÍMICO DE LOS COMPUESTOS DE INCLUSIÓN

5.1 MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN

Existe diversidad de métodos para determinar la formación de los compuestos de inclusión, tales como métodos termoanalíticos, espectroscopia de infrarrojo (IR), Cromatografía en capa fina (TLC), electroquímica, resonancia magnética nuclear (RMN), estudios de solubilidad, espectroscopia ultravioleta visible (UV-VIS), microcalorimetría, espectroscopía de dicroísmo circular por mencionar algunos. La mayoría de estos métodos son altamente sensibles, arrojan datos fiables, pero se tiene como desventaja que la mayoría son procedimientos costosos, requieren solventes con costos elevados, por lo que para fines de esta investigación se utilizará la espectroscopia ultravioleta visible y la calorimetría, debido a la sencillez de la técnica y al relativo bajo costo de los reactivos (Singh, Bharti, Madan &, Hiremath, 2010).

5.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS

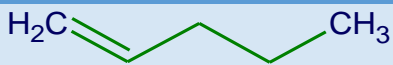

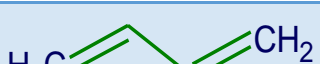

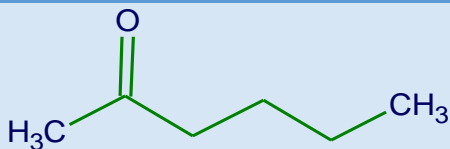
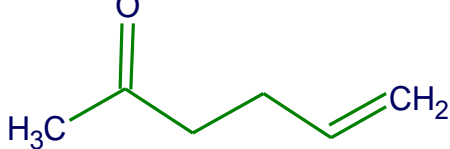
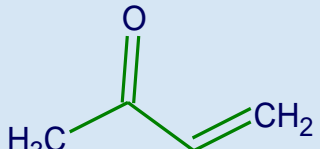
5.2.1 Espectroscopía ultravioleta visible

La formación de complejos provoca corrimientos en el espectro de absorción de la molécula huésped, en este caso, metabolitos secundarios. Durante la complejación, el cromóforo se transfiere a la ciclodextrina, lo cual provoca una perturbación espectral causada, ya sea por la interacción con la ciclodextrina, por la exclusión de las moléculas de agua o por una combinación de ambos efectos, los cuales se conocen como efecto hipsocrómico y efecto batocrómico. Estos pequeños cambios que se observan en el espectro UV al estar incluidos los huéspedes, son propiedades muy utilizadas para la determinación de la formación de los complejos de inclusión (Singh et al., 2010).

Skoog (2001) menciona que los hidrocarburos aromáticos, en el espectro visible presentan picos de absorción intensos a 184 nm, una banda débil a 204 nm y otra a 256 nm al no estar sustituidos. Sin embargo las bandas características del benceno se ven afectadas por los sustituyentes en el anillo. Estas sustancias que desplazan los picos del cromóforo, no absorben en la región ultravioleta y se

denominan auxocromos. Con los datos de absorbancia obtenidos es posible determinar si se da la formación del complejo deseado. La tabla No.6 muestra algunos ejemplos de auxocromos y algunas de sus características.

Tabla No. 6 Ejemplos de auxocromos y sus efectos en el espectro electromagnético.

COMPUESTO	TIPO	λ_{\max} (nm)	ϵ_{\max}
	Olefina	184	10,000
	Diolefina (no conjugada)	185	20,000
	Diolefina (conjugada)	217	21,000
	Triolefina (conjugada)	250	-----
	Cetona	282	27
	Cetona insaturada (no conjugada)	278	30
	α,β - cetona insaturada	324 219	24 3,600

Fuente: (Skoog, Holler &, Nieman, 2001)

5.2.2. Método de la variación de solubilidad.

Anteriormente se describió el carácter apolar de las CD en su cavidad interna, excluyendo las moléculas de agua de su interior, sin embargo debido a que en la parte externa cuenta con numerosos grupos $-OH$, las convierte en sustancias hidrosolubles. Esta capacidad de las CD es útil para aumentar la solubilidad de sustancias que no lo son o que son ligeramente solubles en agua. Aunque los complejos de inclusión formados son menos solubles que las CD sin acomplejar, Hernández (2011) menciona que la solubilidad de las moléculas hidrofóbicas se ve mejorada de un 10 al 300%. El método de la variación de la solubilidad se utiliza para determinar en qué relación molar se obtienen los complejos (Ver anexo1).

El método está reportado utilizando una concentración en exceso del metabolito y variando la concentración de ciclodextrina. Para fines de la presente investigación se realizó una modificación, en la cual se mantuvo constante la concentración de ciclodextrinas y se varió la concentración del metabolito. Está reportado que los complejos CD-metabolito presentan una relación estequiométrica 1:1. Fue necesario realizar una modificación al método de Benesi-Hildebrand (Hernández, López, Lucas &, Núñez, 2012) (ver anexo 4).

5.2.4 Equilibrio Químico

Se esperaría que las reacciones químicas se llevaran a cabo completamente, sin embargo en condiciones de laboratorio no sucede de esa forma ideal. Las concentraciones utilizadas, la temperatura y presión son factores que afectan las reacciones químicas. La expresión de la constante de equilibrio (K_{eq}) describe la relación que existe entre reactivos y productos, permitiendo calcular la cantidad de sustancia que no ha reaccionado cuando la reacción ha alcanzado el equilibrio.

IV. JUSTIFICACIÓN

Desde tiempos antiguos la fabricación de fragancias ha tenido parte en las diferentes culturas, siendo adquiridas por diversos procesos y materia prima de origen natural o sintético. A pesar de los avances tecnológicos en la industria cosmética y farmacéutica, se ha contado con el inconveniente de la corta duración de las fragancias, debido a que en parte los aromas se conforman de sustancias de naturaleza volátil, por lo que se ha precisado recurrir a la utilización de sustancias que permiten la duración de las fragancias por más tiempo.

Según Cuy y Merlo (2004, s.n.p) “un fijador es una sustancia poco volátil, con buen poder de disolución que disminuye la presión de vapor de las esencias e impide su rápida evaporación”, pudiendo ser de origen animal, vegetal o sintético. Sin embargo, estudios recientes han revelado complicaciones derivadas de la utilización de fijadores sintéticos en productos cosméticos, tales como el ftalato de etilo que puede provocar problemas testiculares en mamíferos, y otras sustancias que pueden causar problemas como alergias, toxicidad y bioacumulación, como lo mencionan Dadd y Tarcher (1997, s.n.p).

Por lo anteriormente descrito, surge la necesidad de buscar un sustituto natural de los fijadores, que no represente riesgo alguno al ser utilizado, tanto en la industria cosmética como en la farmacéutica. Las ciclodextrinas son moléculas de azúcares capaces de formar complejos con compuestos afines a su estructura interior tales como metabolitos secundarios (Villiers, 1981, p 112, 536-538; Schneiderman & Stalcup, 2000, s.n.p).

Para la presente investigación se analizaron 7 tipos de ciclodextrinas disponibles comercialmente, formando complejos de inclusión con moléculas huésped, en este caso específico, metabolitos secundarios aromáticos de fácil obtención y relativo bajo costo, siendo estos: eugenol, timol y carvacrol, que por su carácter apolar presentan afinidad con el interior de las ciclodextrinas. (Hernández,

2011, p.97; Szejtli, 1998, p.1743-1753; Villiers, 1981, p 112, 536-538; Schneiderman & Stalcup, 2000, s.n.p). Por las características que proporcionan las ciclodextrinas tales como biodegradabilidad, mejoramiento de la estabilidad térmica de principios activos lábiles e inhibición de la degradación por hidrólisis, oxidación y fotólisis de los metabolitos secundarios, además no son bioacumulables ni alérgenos (Hernández, 2011, p.91-96), se consideran apropiadas para su análisis y utilización en este campo. Así en este trabajo se propone la utilización de ciclodextrinas como fijadores de metabolitos secundarios aromáticos para la fabricación de fragancias, determinando así la efectividad de su uso, según los datos obtenidos de forma experimental. Los metabolitos estudiados se pueden obtener de los aceites esenciales de plantas que se cultivan en Guatemala, y están presentes en algunas plantas que pertenecen a las *Lamiaceae*, donde se puede mencionar al tomillo (*Thymus vulgaris* L), orégano (*Origanum vulgare*) y al orégano mexicano (*Lippia graveolens*), así como la respectivamente, ya que estas plantas poseen en un alto porcentaje los metabolitos a utilizar.

Estos metabolitos son utilizados en perfumería, así mismo en productos cosméticos de tratamiento y protección debido a su actividad antifúngica (Hernández, 2011, p. 52, 63; Lamas, 2011, p.298).

Se realizó la simulación computacional de los complejos formados por las 6 ciclodextrinas y los tres metabolitos secundarios aromáticos, con el fin de determinar cuál de las CD forma los complejos de inclusión con mayor estabilidad, para posteriormente ser preparados de forma experimental. Lo anterior, con la finalidad de realizar una comparación de los datos teóricos con los experimentales.

V. OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar la ciclodextrina más adecuada [α -ciclodextrina (ALFA), β -ciclodextrina (BETA), metil- β -ciclodextrina (MBCD), propil- β -ciclodextrina (PBCD), 2-hidroxiethyl- β -ciclodextrina (HECD), 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (HPCD) y γ -ciclodextrina (GAMA)], para ser utilizada como fijador de metabolitos secundarios aromáticos (eugenol, timol y carvacrol).

Objetivos específicos:

1. Determinar un procedimiento experimental adecuado para la formación de complejos de ciclodextrinas en función de la polaridad y la complementariedad espacial con los metabolitos secundarios.
2. Evaluar la compatibilidad de la formación de los complejos ciclodextrina-metabolitos secundarios mediante el cálculo de energías (mecánica y dinámica molecular y energía libre de Gibbs) del complejo formado por la ciclodextrina-metabolito secundario, utilizando simulación computacional.
3. Comprobar, verificar y comparar los resultados obtenidos en la formación de complejos ciclodextrina- metabolitos secundarios, entre el método experimental y el método computacional.

VI. HIPÓTESIS

Los valores termodinámicos obtenidos de forma experimental al preparar los complejos Ciclodextrina-Metabolito secundario presentan una desviación no significativa con respecto a los resultados obtenidos en la simulación computacional mediante la mecánica y dinámica molecular.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

VII.i Universo

El universo de esta investigación está compuesto tanto de α -ciclodextrina (ALFA), β -ciclodextrina (BETA), γ -ciclodextrina (GAMA), metil- β -ciclodextrina (MBCD), 2-hidroxiethyl- β -ciclodextrina (HECD), 2-hidroxiethyl- β -ciclodextrina (HPCD), propil- β -ciclodextrina (PBCD), como de los metabolitos secundarios fenólicos de aceites esenciales.

VII.ii Población y muestra

De las ciclodextrinas analizadas y preparadas en simulación computacional se utilizaron las que presentaron la energía dinámica y mecánica molecular menor a 0 KJ/mol más estables.

La muestra de los metabolitos secundarios fenólicos fueron el eugenol, timol y carvacrol.

VII.iii Materiales

Tabla No. 7 Reactivos

Cantidad	Sustancia	Grado / Presentación	Procedencia
20 g	2 hidroxipropilclodextrina	Reactivo	Comercial
10 g	Beta-ciclodextrina	Reactivo	Comercial
250 ml	Etanol	95 %	Comercial
1 ml	Eugenol	Estándar	Donación
1 g	Timol	Estándar	Donación
1 ml	Carvacrol	Estándar	Donación
-----	Agua desmineralizada		Comercial

Fuente: Elaboración propia

Tabla No.8 Equipo

Cantidad	Equipo	Especificaciones	Procedencia
1	Equipo UV-vis carey	Con celdas de cuarzo	Laboratorio de Investigación de Química ambiental
1	Balanza	Semi analítica	Departamento de Química General
1	Balanza	Analítica	Departamento de fisicoquímica
1	Baño de ultrasonido	-----	Departamento de fisicoquímica
1	Pipeta Eppendorff 2-20 ul	Automática	Unidad de Análisis Instrumental
1	Pipeta Eppendorff 10-100 ul	Automática	Unidad de Análisis Instrumental
1	Pipeta Eppendorff 100-1000 ul	Automática	Unidad de Análisis Instrumental

Fuente: Elaboración propia

Tabla No.9 Cristalería

Cantidad	Cristalería	Especificaciones	Procedencia
1	Probeta	Vidrio de 10 ml	Departamento de Química general
1	Probeta	Vidrio 50 ml	Departamento de Química general
1	Termómetro	De mercurio -10 a 250 °C	Departamento de Química general
2	Beackers	Vidrio de 250 ml	Departamento de Química general
3	Beacker	Vidrio de 100 ml	Departamento de Química general
2	Pipetas	10 ml serológicas	Departamento de Química general
1	Pipeteador	-----	Departamento de Química general
10	Balones aforados	Vidrio de 10 ml	Departamento de Fisicoquímica
3	Balones aforados	Vidrio de 100 ml	Departamento de Química general
2	Balones aforados	Vidrio de 50 ml	Departamento de Química general
1	Balones aforados	Vidrio de 25 ml	Departamento de Fisicoquímica
100	Tubos de ensayo	Vidrio 10 ml	Departamento de Química General

Fuente: Elaboración propia

VII.iv Métodos

El desarrollo de la investigación es considerado de tipo cuantitativo, y está conformado de dos secciones.

La primera sección está conformada por una parte teórica, en donde se realizaron y obtuvieron datos acerca de las moléculas a analizar, a partir de simulación computacional y en la segunda y última fase, se realizó una parte experimental, en base a los datos obtenidos durante la simulación computacional, preparando complejos ciclodextrina-metabolito secundario y su posterior análisis por medio de instrumentación analítica.

Sección I

Simulación computacional

- a. Se obtuvo la estructura tridimensional en formato digital de las moléculas que forman parte de esta investigación, siendo estas, la α -ciclodextrina, β -ciclodextrina, γ -ciclodextrina, metil- β -ciclodextrina, 2-hidroxietil- β -ciclodextrina, 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina, propil- β -ciclodextrina. Así mismo, se modelaron los metabolitos secundarios fenólicos (eugenol, timol y carvacrol). Posterior a esto se realizó la optimización de su geometría. (Molecular Mechanics) utilizando para ello el software Marvin Sketch, Avogadro y Sybyl X.
- b. Se obtuvo la conformación más estable de las moléculas (ciclodextrinas y luego de los metabolitos secundarios), determinando sus energías por mecánica molecular (Sybyl X), dinámica molecular (NAMD).
- c. Se formaron los complejos de inclusión ciclodextrina-metabolito secundario, a los que se les realizó un análisis exploratorio de la energía del complejo de inclusión utilizando para ello el software Marvin Sketch, Avogadro y Sybyl X.
- d. Se determinó la conformación más estable de los complejos ciclodextrina-metabolitos secundario formados, determinando sus energías por mecánica molecular (Sybyl X), dinámica molecular (NAMD). Para ello se colocó el

metabolito secundario a una distancia de 10 Å con respecto al centro de cada molécula, y se calculó la variación de la energía al modificar esta distancia, el ángulo de entrada del metabolito secundario con respecto a la ciclodextrina y rotando al metabolito con respecto a la ciclodextrina.

- e. Mediante la dinámica molecular, se calcularon las energías, y se determinó la estructura geométrica más estable para:
 - a. Las ciclodextrinas
 - b. Los metabolitos secundarios aromáticos
 - c. Los complejos formados
 - d. Las ciclodextrinas, los metabolitos secundarios aromáticos y los complejos formados solvatados en agua.

Sección II

Preparación de los compuestos de inclusión, mediante el método de la variación de solubilidad (Hernández, 2011)

Se realizó el estudio de la formación de los complejos mediante el método de variación de solubilidad, utilizando la 2-hidroxipropilciclodextrina (HPCD) así como la β -ciclodextrina (BETA) con los metabolitos eugenol, y timol y carvacrol, los cuales se realizaron de la siguiente forma:

Para formar los complejos de inclusión con BETA, se preparó una solución 15 mM y se le agregaron los metabolitos en concentraciones de 3, 6, 9, 12 y 15 mM, y para la HPCD, se preparó una solución de 50 mM, agregando los metabolitos en concentraciones 10, 20, 30, 40 y 50 mM, en un volumen final de 5 mL. Las muestras se mantuvieron en un baño de ultrasonidos durante 60 min, a 25 °C, con el fin de alcanzar el equilibrio.

Sección III

Caracterización cualitativa de los complejos de inclusión

1. Se realizó un barrido de la ciclodextrinas (200-400 nm), metabolitos secundarios y del complejo preparado en un rango de 200 a 300 nm para determinación de longitud de onda máxima, utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Cary.
2. Se determinó la longitud de onda máxima de los metabolitos secundarios y los complejos. No se registró ningún dato para las ciclodextrinas, como era de esperarse.
3. Se realizaron análisis de los complejos utilizando las longitudes de onda máxima obtenidas en los barridos del metabolito secundario correspondiente, para determinar corrimientos batocrómicos o hipsocrómicos en el espectrograma.
4. Utilizando los datos de absorbancia y la tendencia de los complejos preparados, se determinó la formación del complejo, preparando curvas de calibración de los metabolitos secundarios en solución, así como curvas de complejos preparados en la proporción que presento la mínima absorbancia (punto de inflexión).
5. Se realizó una modificación al método de Benesi-Hildebrand, relacionando las absorbancias obtenidas en la curva de calibración del metabolito con las observadas al preparar una curva con proporciones obtenidas en el punto mínimo de absorbancia, con el fin de determinar las constantes de equilibrio de los complejos.

VIII. RESULTADOS

Tabla No.10 Energías (Kcal/mol) de metabolito, ciclodextrina, complejo Metabolito-ciclodextrina y su diferencia energética obtenidas mediante la mecánica molecular.

Complejos	Distancia (Å)	Ángulo (Å)	Rotación (Å)	Energía metabolito (Kcal/mol)	Energía Ciclodextrina (Kcal/mol)	Energía del complejo (Kcal/mol)	Diferencia energética Kcal/mol
2-hidroxiopropilbeta-carvacrol	0.1	60.1	240	46.751	276.531	303.911	-19.371
2-hidroxietilbeta-carvacrol	2.1	60.1	90	46.739	229.223	257.706	-18.256
Propilbeta-carvacrol	3.1	60.1	0	46.758	213.503	242.149	-18.112
2-hidroxietilbeta-eugenol	3.1	40.1	90	65.803	229.223	277.345	-17.681
2-hidroxiopropilbeta-eugenol	1.1	60.1	180	65.818	276.531	324.931	-17.418
Propilbeta-eugenol.	1.1	60.1	270	65.801	213.503	262.06	-17.244
Metilbeta-carvacrol	3.1	60.1	0	46.762	171.387	201.006	-17.143
2-hidroxiopropilbeta-timol	-2.1	110.1	210	88.916	276.531	348.487	-16.96
Propilbetatimol	0.1	60.1	300	88.867	213.503	285.539	-16.831
Metilbeta-eugenol	1.1	60.1	180	65.808	171.387	221.143	-16.052
Beta-eugenol	1.1	60.1	330	65.807	174.442	225.252	-14.997
Beta-carvacrol	3.1	60.1	150	46.763	174.442	206.467	-14.738
2-hidroxietilbeta-timol	4.1	60.1	270	88.918	229.223	303.681	-14.46
Metilbeta-timol	-1.1	100.1	330	88.875	171.387	246.465	-13.797
Beta-timol	1.1	60.1	150	88.865	174.44	249.656	-13.649
Gamma-timol	2.1	40.1	240	88.892	205.252	283.187	-10.957
Gamma-carvacrol	0.1	40.1	240	46.771	205.256	241.645	-10.382
Alfa-eugenol	4.1	50.1	30	65.813	146.444	202.182	-10.075
Gamma-eugenol	1.1	50.1	240	65.814	205.252	261.155	-9.911
Alfa-timol	-4.1	130.1	330	88.871	146.428	225.905	-9.394
Alfa-carvacrol	-6.1	140.1	330	46.746	146.442	184.106	-9.082

Fuente: datos obtenidos en la unidad de Química Computacional, edificio T-10, Ciudad Universitaria.

Tabla No.11 Energías (Kcal/mol) de metabolito, ciclodextrina, complejo Metabolito-ciclodextrina y la energía de estabilización de los complejos obtenidos mediante la dinámica molecular.

Complejo	Energía complejo (Kcal/mol)	Energía Ciclodextrina (Kcal/mol)	Energía ligando (Kcal/mol)	Energía de estabilización del complejo (Kcal/mol)
Propilbeta-eugenol.	416	438.77	26.45	-49.22
Propilbeta-carvacrol	410.97	438.77	14.47	-42.27
Beta-eugenol	368.66	376.85	26.45	-34.64
2-hidroxiopropilbeta-timol	493.16	510.33	17.17	-34.34
Metilbeta-carvacrol	401.61	420.56	14.47	-33.42
Beta-timol	362.9	376.85	17.17	-31.12
Propilbeta-timol	424.85	438.77	17.17	-31.09
2-hidroxiopropilbeta-eugenol	505.78	510.33	26.45	-31.00
Metilbeta-eugenol	416.15	420.56	26.45	-30.86
Gamma-carvacrol	406.04	422.23	14.47	-30.66
2-hidroxietylbeta-eugenol	506.49	509.63	26.45	-29.59
Metilbeta-timol	409.12	420.56	17.17	-28.61
2-hidroxietylbeta-carvacrol	498.09	509.63	14.47	-26.01
Beta-carvacrol	365.84	376.85	14.47	-25.48
2-hidroxiopropilbeta-carvacrol	502.01	510.33	14.47	-22.79
2-hidroxietylbeta-timol	504.15	509.63	17.17	-22.65
Gamma-eugenol	426.65	422.23	26.45	-22.03
Alfa-timol	308.36	312.44	17.17	-21.25
Gamma-timol	421.56	422.23	17.17	-17.84
Alfa-eugenol	321.9	312.44	26.45	-16.99
Alfa-carvacrol	315.93	312.44	14.47	-10.98

Fuente: datos obtenidos en la unidad de Química Computacional, edificio T-10, Ciudad Universitaria.

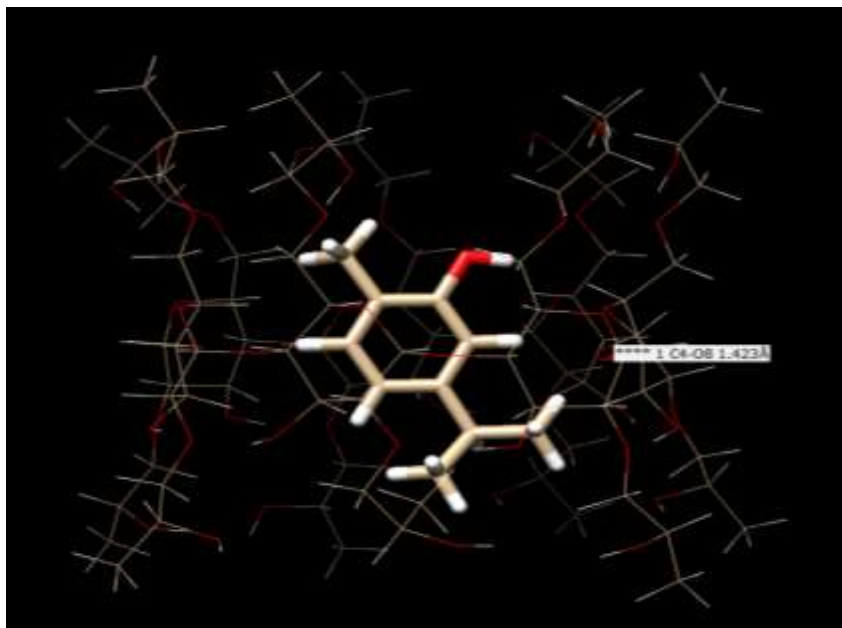


Figura No.9 Conformación más estable del complejo
2-hidroxipropil- β -carvacrol (HPBC)

Fuente: obtenido en la Unidad de Química computacional, edificio T-10, zona 12, USAC

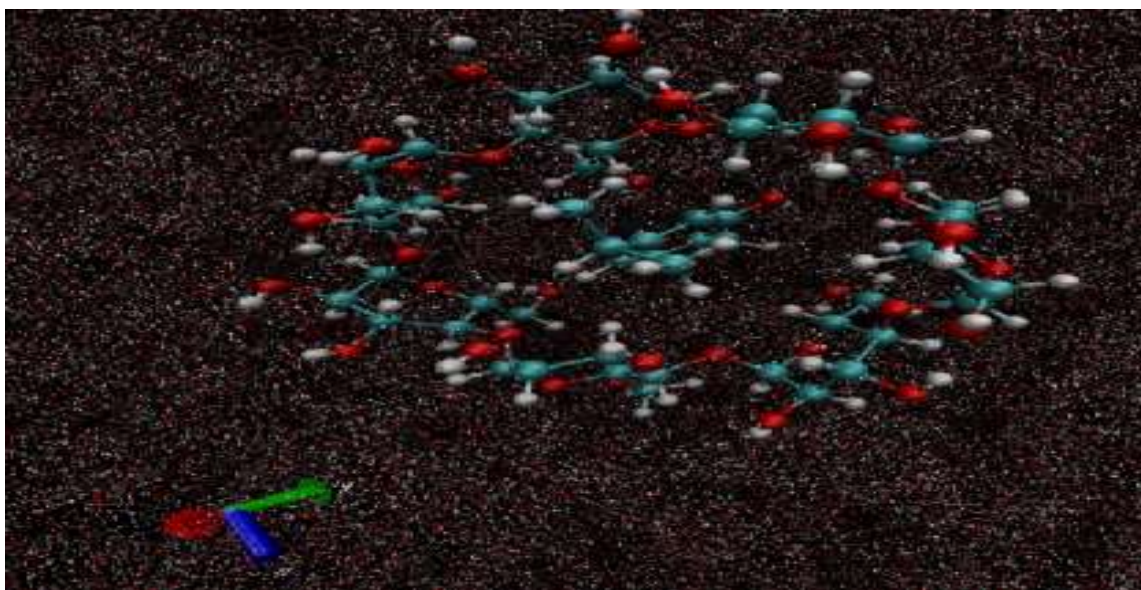


Figura No.10 Conformación más estable del complejo
2-hidroxipropil- β -carvacrol (HPBC) obtenido mediante dinámica molecular
Fuente: obtenido en la Unidad de Química computacional, edificio T-10, zona 12, USAC

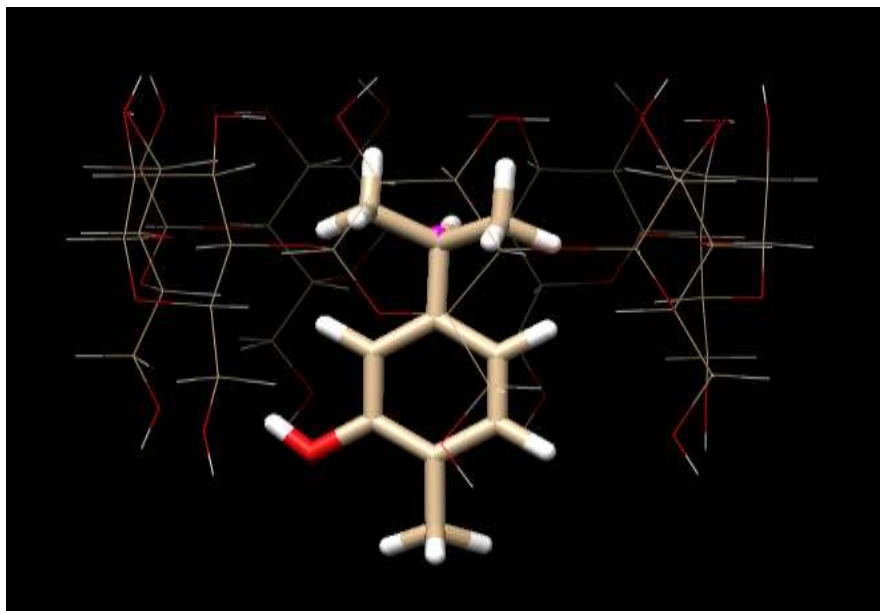


Figura No.11 Conformación más estable del complejo
 β -carvacrol (BETC)

Fuente: obtenido en la Unidad de Química computacional, edificio T-10, zona 12, USAC

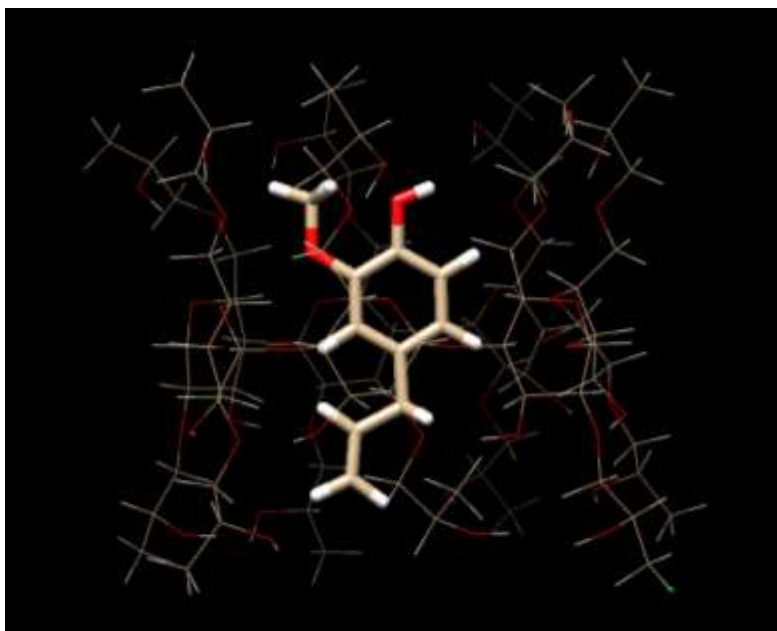


Figura No.12 Conformación más estable del complejo
2-hidroxipropil-beta-eugenol (HPBE)

Fuente: obtenido en la Unidad de Química computacional, edificio T-10, zona 12, USAC

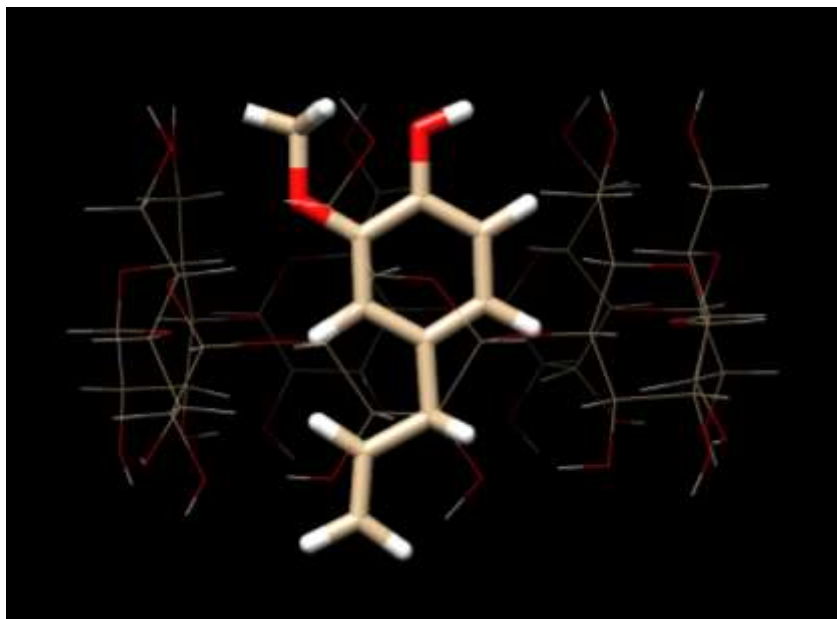


Figura No.13 Conformación más estable del complejo
beta-eugenol (BETE)

Fuente: obtenido en la Unidad de Química computacional, edificio T-10, zona 12, USAC

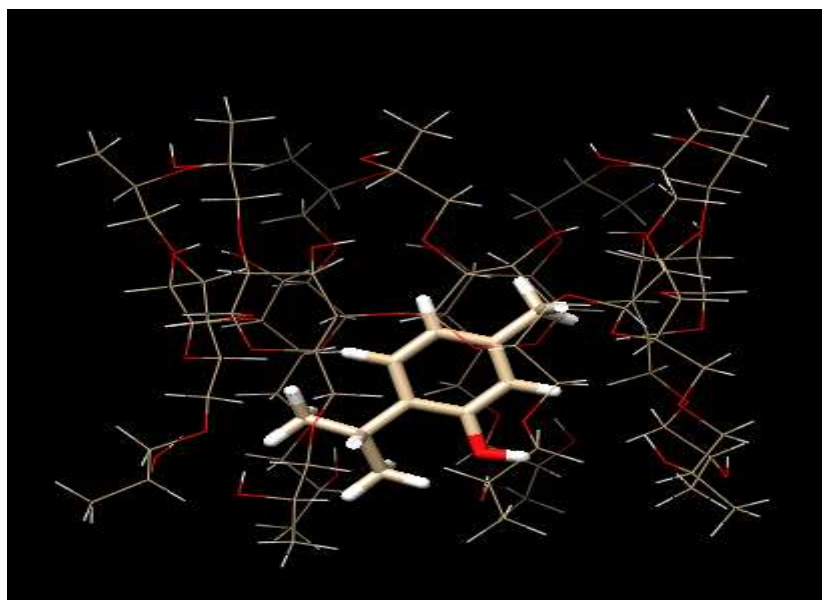


Figura No.14 Conformación más estable del complejo
2-hidroxipropil-beta-timol (HPBT)

Fuente: obtenido en la Unidad de Química computacional, edificio T-10, zona 12, USAC

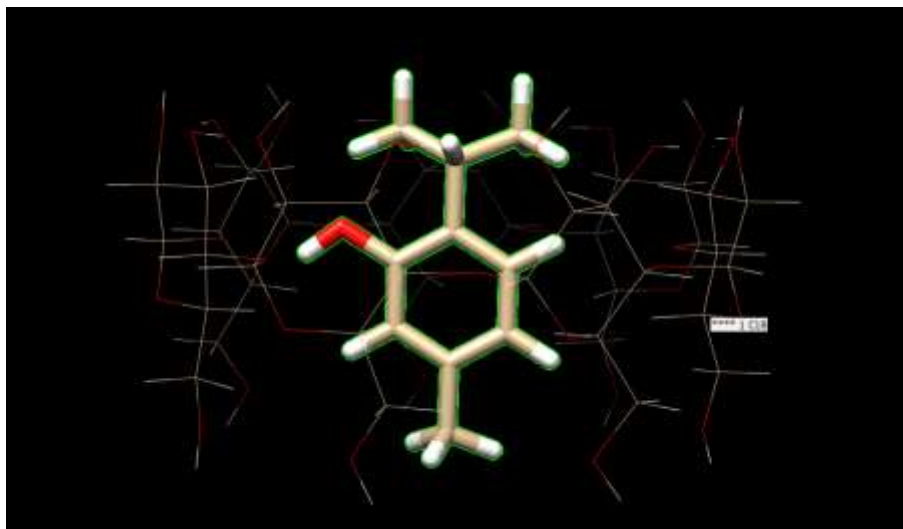
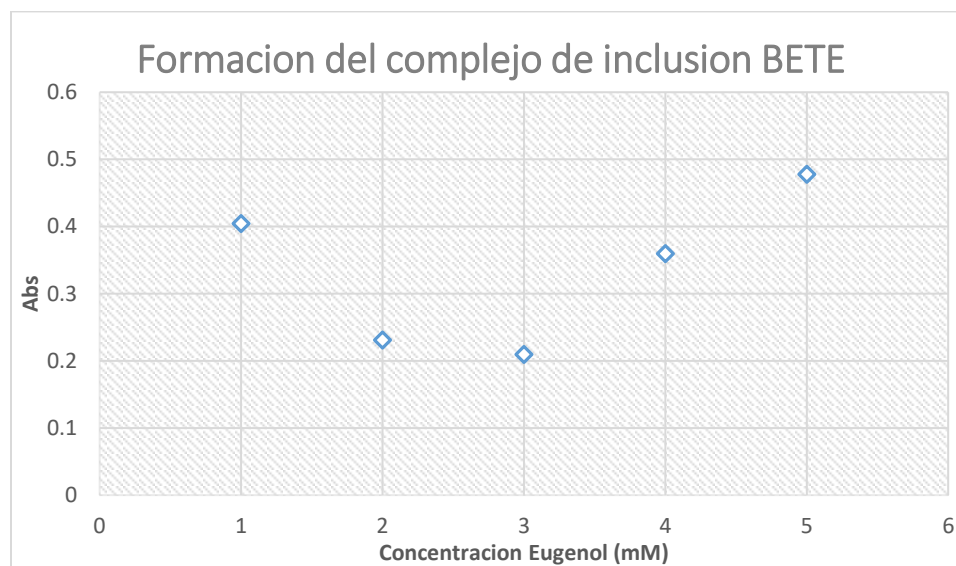


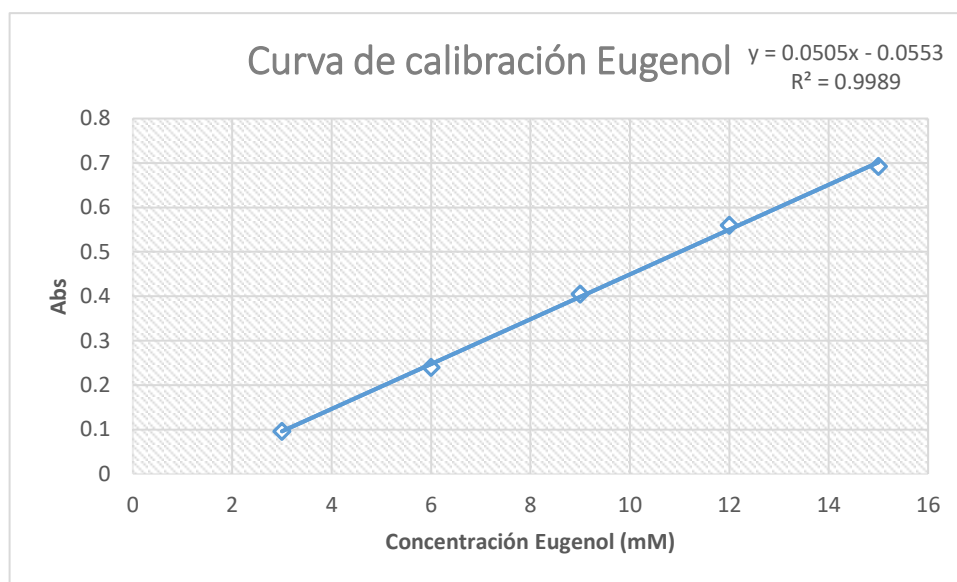
Figura No.15 Conformación más estable del complejo
beta-timol (BETT)

Fuente: obtenido en la Unidad de Química computacional, edificio T-10, zona 12, USAC



Gráfica No.1 Preparación del complejo Beta-Eugenol con el método de las
proporciones múltiples.

Fuente: datos experimentales obtenidos en edificio T-12, zona 12, USAC



Gráfica No.2 Curva de calibración Eugenol (3 – 15 mM)

Fuente: datos experimentales obtenidos en edificio T-12, zona 12, USAC

Tabla No.12 Contantes de asociación de los complejos de inclusión preparados en el laboratorio

Complejo	Kc (Media)
BETT	5.64×10^{-05}
BETC	1.00×10^{-04}
BETE	7.40×10^{-06}
HPBC	2.64×10^{-05}
HPBT	1.19×10^{-05}

Fuente: obtenido en la Unidad de Química computacional, edificio T-10, zona12, USAC

IX. DISCUSION DE RESULTADOS

Se realizó la simulación computacional mediante mecánica molecular, preparando los complejos de inclusión CD-metabolito, realizando variaciones de distancia, torsión y ángulo de rotación entre las CD y los metabolitos en el proceso de preparación de los complejos.

En la Tabla No. 10 se muestran las energías de las CD y los metabolitos sin acomplejar, observándose que al aumentar el tamaño de las CD, aumenta el valor energético, siendo mayor aun al estar sustituidas, coincidiendo con lo observado por Torres (2014, p.51) quien atribuye este aumento energético a las interacciones de enlace de hidrógeno entre los grupos hidróxi (-OH) terminales, siendo una excepción la HPCD, donde el grupo -OH se encuentra en un carbono secundario.

Se obtuvo la diferencia de energías de las conformaciones más estables, entre las moléculas libres y acomplejadas. Pudo observarse que los complejos que poseen sustituyentes presentan menores valores energéticos que las que no los tienen, lo cual se debe a existen interacciones electrostáticas entre los sustituyentes y la molécula huésped, cosa que no ocurre con las CD que no están sustituidas. Al calcular la diferencia energética de todos los complejos se observó que todos se encuentran por debajo de 0 KJ/mol, siendo esta la conformación más estable, lo cual indica que todas las CD evaluadas podrían formar complejos de inclusión al ser preparados de forma experimental.

En la figura No.9 se observa la conformación más estable del complejo HPBC, en la cual se puede apreciar que el grupo OH- del carvacrol está orientado hacia la parte "angosta" de la ciclodextrina, lo cual se debe a que los grupos OH están más cerca entre sí, formando enlaces de hidrógeno entre los sustituyentes de la ciclodextrina y del carvacrol, mientras que en el lado ancho puede observarse la parte apolar del carvacrol, la cual presenta interacciones despreciables con los susituyentes de la ciclodextrina, debido a su carácter apolar. Se observa el mismo comportamiento en el complejo HPBE.

En la figura No.14 se observa que en el complejo HPBT, el timol presentó rotación, dejando al grupo OH lo más afuera posible de la cavidad interna de la CD, sin embargo se puede apreciar que existen interacciones entre el grupo -iso y la parte polar de la CD. El valor energético pudo verse afectado debido a que “con respecto a la estabilidad del complejo formado ésta tiende a aumentar conforme incrementa el carácter donador de electrones de las moléculas huésped, y la especie acomplejada puede lograr una permanencia en la cavidad proporcional a las interacciones no covalentes que se generen como resultado de la disposición espacial producida” (Szente & Szemán, 2013, s.n.p.), y se puede visualizar fácilmente que la disposición espacial del metabolito permite tener interacciones con las moléculas de agua en el exterior, lo cual no favorece la formación de los complejos de inclusión.

Los complejos BETC, BETE y BETT (figura No.11, 13 y 15) presentan mayores valores al realizar la diferencia energética. Esto puede ser una consecuencia del tamaño de la CD, ya que aunque posee los mismos 7 anillos de glucosa que la HPCD, es una molécula pequeña debido a la carencia de los sustituyentes, por lo que no puede acomplejar completamente al huésped, produciendo interacciones en ambos lados del complejo debido a los sustituyentes apolares del metabolito.

En la tabla No.11 se observa la energía de estabilización del complejo, observándose que los compuestos acomplejados, presentan la mayor diferencia energética al utilizar las CD sustituidas, con excepción de los complejos formados con BETA.

La dinámica molecular permitió confirmar los resultados obtenidos en la MM, calculando las energías de estabilización del complejo. Para esto, se tomaron en consideración las energías obtenidas con valores menores a 0 KJ. Como se observa en la figura No.10, la ciclodextrina sufre una variación estructural, ya que se puede ver que pierde su forma toroidal, debido a que la simulación se realizó con los complejos solvatados en agua y a una temperatura constante de 25 °C, en un espacio delimitado que contenía moléculas de agua, por lo que adoptó una forma ligeramente ovalada.

Sin embargo, se observa que el complejo se mantiene formado a pesar de las interacciones con la molécula de agua. Dado que la parte interna de las CD es apolar y la externa polar, el grupo -OH del carvacrol está orientado al exterior (hacia el lado abierto de la CD) interactuando con los grupos hidroxilo de la ciclodextrina y las moléculas de agua que rodeaban el complejo, formando enlaces de hidrógeno. Por otro lado, la parte apolar del metabolito interactúa con el interior de la CD y se mantiene distante de las moléculas de agua que se hallan afuera del complejo.

Los datos energéticos obtenidos mediante la simulación computacional, tanto en dinámica como en mecánica fueron necesarios para decidir cuál de las ciclodextrinas presentaba la mayor estabilidad energética, para preparar los complejos en laboratorio. Se eligió a la HPCD como la mejor opción, debido a que en la MM obtuvo el valor más bajo, y en la MD la energía de estabilización del complejo presentó una mayor diferencia con respecto al resto de ciclodextrinas, lo cual indica que sus complejos de inclusión son estables y se pueden preparar experimentalmente. Así mismo, se prepararon los complejos utilizando BETA, para realizar una comparación entre los complejos preparados con las ciclodextrinas sustituidas y sin sustituir. Para la preparación de los complejos con ambas CD se utilizó baño de ultrasonido como una forma de acelerar la cinética de la formación de estos, ya que según lo menciona Hernández (2011), al utilizar únicamente los complejos con agitación magnética, el equilibrio puede tardar en alcanzarse alrededor de 130 horas y al utilizar un sonicador, se ha observado que este se alcanza en únicamente 1 hora.

Al tener listos los complejos, se utilizó la espectrofotometría UV para determinar el comportamiento de los complejos de inclusión. Se realizaron barridos para determinar si existieron corrimientos en el espectro ultravioleta visible, sin embargo no se pudo determinar cambio alguno en la longitud de onda máxima, debido a que el metabolito fue acomplejado por la CD, en la que no hay grupos cromóforos.

En la gráfica No.2 se puede observar la curva de calibración del eugenol, en la cual se observa el comportamiento creciente de la absorbancia al aumentar la concentración del eugenol. Sin embargo, en la gráfica No.1 que presenta los

complejos preparados con concentración de CD constante, y variando de forma creciente la concentración del metabolito, se observa un punto mínimo de absorbancia, lo cual indica que existe la formación máxima de complejo, debido a que al acomplejarse, el metabolito absorbe una cantidad mínima de luz, debido a que la CD está compuesta por unidades de glucosa, la cual no posee ningún grupo cromóforo, por lo cual no es detectable por espectrofotometría UV.

Mediante el método de variación de solubilidad y una modificación del método de Benesi-Hildebrand, se realizó un tratamiento de los datos obtenidos para determinar de esta forma las constantes de equilibrio (ver anexo 4).

En la tabla No.12 se presentan las constantes de equilibrio, observando que todas estas constantes son valores menores a 1, lo cual indica que el equilibrio está desplazado hacia los reactivos. Puede decirse que se obtuvo una cantidad baja del complejo, sin embargo, fue suficiente para poder obtener una señal espectroscópica. Cabe mencionar que aunque sí es posible obtener complejos de inclusión, la metodología utilizada fue ineficiente, ya que no se obtuvo una cantidad considerable de complejo para poder realizar otras pruebas de caracterización.

X. CONCLUSIONES

1. Se determinó, mediante los cálculos con la mecánica molecular, que las ciclodextrinas sustituidas presentan una mayor diferencia energética al acomplejarse, en comparación con las que no lo están. Sin embargo, todas las ciclodextrinas analizadas presentaron una diferencia energética menor a cero, lo cual indica que es muy probable que se formen todos los complejos.
2. La HPCD presentó la mayor diferencia energética al realizar la simulación en la mecánica molecular.
3. Se prepararon 6 complejos de inclusión (HPBC, HPBT, HPBE, BETC, BETT y BETE) a nivel de laboratorio, determinando mediante el método de Benesi-Hildebrand, que se formaron todos los complejos, a excepción del HPBE.
4. No fue posible obtener los complejos en estado sólido, mediante el método de la variación de solubilidad, debido a la baja concentración de reactivos a la que se trabajó en el laboratorio.
5. Los valores de las constantes de equilibrios determinadas de forma experimental, presentaron valores menores a 1, lo cual indica que el equilibrio está desplazado hacia los reactivos. Por lo tanto, se puede decir que se obtuvo complejo en una muy baja proporción.
6. Los resultados obtenidos en la experimentación en el laboratorio fueron acordes a los resultados obtenidos mediante la mecánica y dinámica molecular, ya que si se observó la formación de 5 complejos de los 6 complejos planificados.

XI. RECOMENDACIONES

- Es conveniente hacer un estudio posterior sobre la liberación controlada de los metabolitos secundarios, utilizando como parámetro a seguir el pH, para determinar la estabilidad de los complejos formados.
- Se sugiere probar otra metodología para obtener los complejos sólidos, tal como el método de pasta o el de mezclado en seco, para realizar análisis de termogravimetría (TGA), ya que se había propuesto esta técnica previamente, sin embargo, no pudo utilizarse debido a la falta de complejo sólido.
- Es conveniente realizar un estudio de la viabilidad del uso de los complejos ciclodextrina-metabolito en la industria para su uso en productos que contengan aromas, y darles así una aplicación comercial.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andoni, E. (s.f.). *Evaluación del uso de ciclodextrinas para el control de la difusión de componentes activos desde películas comestibles a sistemas alimentarios*.
2. Arctander, S. (1994). *Perfumes y materias aromáticas de origen natural*. Molecular Encapsulation Organic Reactions in Constrained Systems Carol stream. Allured Publishing Corporation.
3. Ávalos, A. & Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*. 2 (3): 119-145.
4. Bartels, H. (1980). *Inspección Veterinaria de la Carne*. Zaragoza-España. Editorial Acribia, (p.p. 425-426).
5. Bauer, K., Garbe, D., & Surburg, H. (1990). *Materiales aromáticos y fragancias comunes: Preparación, propiedades y usos*. (2^{da}. ed.). Verlagsgesellschaft, Alemania.
6. Brinker, U. & Mieusset, J. (2010). 1th. Ed. John Wiley & Sons, Ltd. United Kingdom.
7. Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia: fitoquímica plantas medicinales*. (2a ed.). Zaragoza, España. Acribia S.A.
8. Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakni, A., Kalha-Nackbi, A., Rouabhia, M. (2007). The chemical composition biological activity of clove essential oil, *Eugenia cayophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae: A short review). *Phytoterapy review*. 21, 501-506.
9. Colchado, S. (2014). Caracterización fisicoquímica de complejos de inclusión β -ciclodextrina/aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens*) incorporados a nanoparticulas poliméricas. (Tesis de maestría) Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.
10. Cox, S., Man, C., Markham, J. (2001). Interactions between components of the essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letter Applied Microbiological* 36, 162-167.

11. Cuy, A. y Merlo, S. (2004). Estudio de la evaporación de un perfume aplicado sobre la piel en función del tiempo, empleando HS-SPME/GC-MSD. (Tesis de licenciatura) Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.
12. Dadd, D. y Tarcher, J. (1997). *Home Safe Home: Protecting Yourself and Your Family from Everyday Toxics and Harmful Household Products*. New York.
13. De Prada, C. (2016). *Los ftalatos: Un problema de salud pública que debe ser abordado con urgencia para proteger a mujeres embarazadas y niños. Una propuesta política*. Fundación Vivo Sano. Madrid, España.
14. Domínguez, X. (1997). Métodos de investigación fitoquímica. (p. 229). México.
15. Dziezak, J. D. (1988). Microencapsulation and encapsulation ingredients. *Food Technology*. 42, 136-151.
16. Eastburn, S. & Tao, B. (1994). Applications of modified cyclodextrins. *Biotechnology Advanced*. 12 (1) 325-339.
17. Fan, W. (2008). The use of tea polyphenol dip to extend the shelf life silverscorp during storage in ice. *Food chemistry*. 108 (6), 148- 153.
18. Flores, M. (2010). Investigación de los aceites esenciales, sus características y finalidad de uso. Análisis del estado de su regulación en Chile y el mundo. (Tesis de licenciatura) Universidad de Chile, Chile.
19. Gautier, F., Kamel, C., Calsamiglia, Doane, P. (2011). *Food additive for ruminant based on eugenol and cinamaldehyde*.
20. González, Ma. (2012). Auto-agregación y formación de complejos de inclusión de ciclodextrinas modificadas con compuestos modelos. (Tesis de doctorado) Universidad de Alcalá, España.
21. Gulcin, I., Gungor, I., Beydenir, S. S., Elmastas, M., Kufrevioglu, I. (2004). Comparison of antioxidant activity of clove oil (*Eugenia caryophyllata Thunb*) buds and lavender (*Lavandula stoechas L.*). *Food chemistry*. 87 (1) 393-400.
22. Heinzen, C. (2002). Microencapsulation solve time dependent problems foodmakers. *Europ. Food and drink review*. 3, 27-30

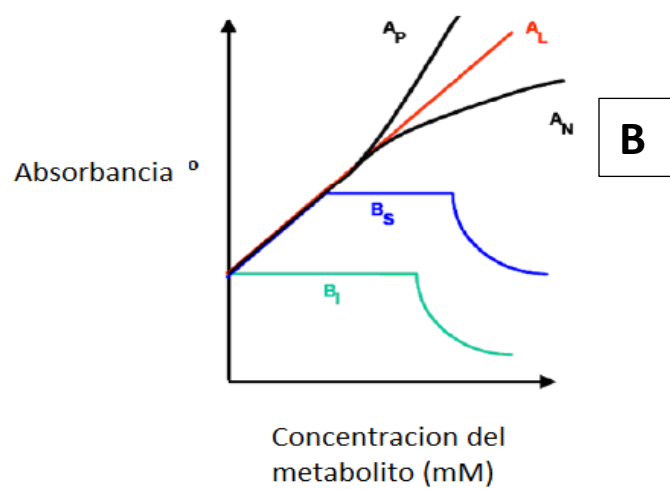
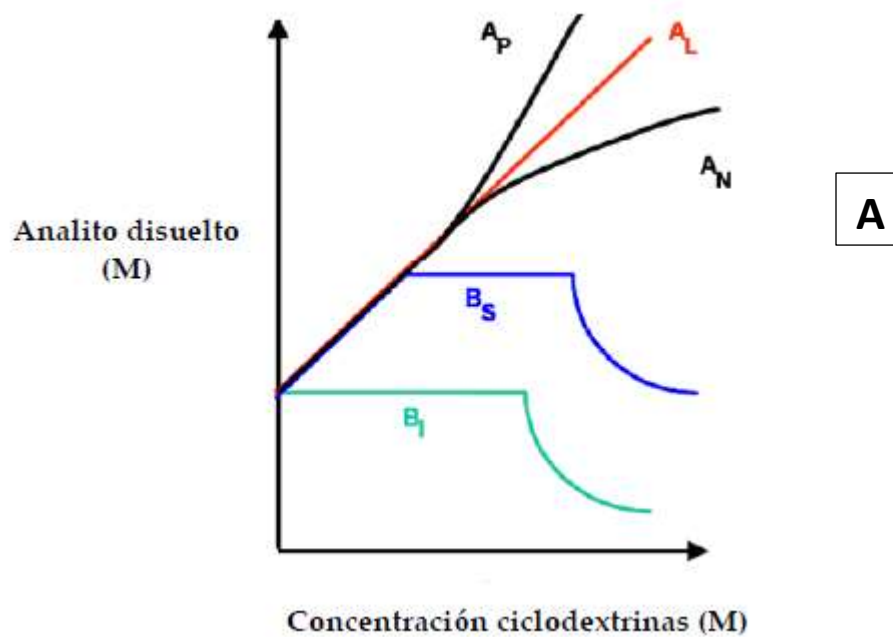
23. Hernández, P. (2011). Encapsulación de Aceite Esencial de Clavo para su Aplicación en la Industria Alimentaria. (Tesis de licenciatura). Universidad Católica San Antonio, Murcia.
24. Hernández, P., López, S., Lucas, C. & Núñez, E. (2012). Complexation of Eugenol (EG), as main component of clove oil and as pure compound, with β - and HP- β -CDs. *Food and Nutrition Sciences*, 3, 716-723
25. Jackson, L. & Lee, K. (1991). Microencapsulation in the food industry. *Lebensmittel- Wissenschaft und Technology*. 24, 289-297.
26. Kayaci, F. & Uyar, T. (2012). *Encapsulation of vanillin/cyclodextrin inclusion complex in electrospun polyvinyl alcohol (PVA) nanowebs: Prolonged shelf-life and high temperatura stability of vanillin.*
27. Kurkov, S. & Loftson, T. (2013). Cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics* 453 167– 180.
28. Lamas, J. (2011). Determinación de fragancias, conservantes y otros aditivos regulados en productos de uso cotidiano y atmósferas interiores (Tesis de doctorado). Universidad de Santiago de Compostela, Madrid.
29. Lou, A. (2011). Comparación de la mecánica molecular de la formación del complejo de α -naftalencarboxilato y cucurbit[8]urilo en medios solvatado y no solvatado. (Tesis de Licenciatura). Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala.
30. Mérida, M. (2012). Estudio del rendimiento y composición del aceite esencial de diferentes poblaciones silvestres de *Lippia chiapasensis* Loes. del altiplano occidental guatemalteco. (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
31. Pawar, V., Thaker, V. (2006). In vitro efficacy of 75 essentials oils against *Aspergillus Niger*. *Micoses*. 49, 316-323.
32. Pinho, E., Grootveld, M., Soares, G. & Henriques, M. (2014). *Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. Carbohydrate Polymers.*
33. Reinneccius, G. (1991). Carbohydrates for flavor encapsulation. *Food Technology*. 45, 144-147

34. Schneiderman, E. & Stalcup, A. (2000). Cyclodextrins: a versatile tool in separation science. *Journal of Chromatography*.
35. Solís, P. (2011). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare L.*) y tomillo (*Thymus vulgaris L.*) como potenciales bioconservadores en carne de pollo. (Tesis de licenciatura). Escuela superior politécnica de Chimborazo, Ecuador.
36. Shahidi, F. & Han, X. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical Review of Food Science and Nutrition*. 33, 501-547.
37. Singh, R., Bharti, N., Madan, J., Hiremath, S.N., (2010). Characterization of Cyclodextrin Inclusion Complexes – A Review. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 2 (3), 171-183.
38. Skoog, D., Holler, F., & Nieman, T. (2001). *Principios de análisis instrumental*. (5ª ed). McGraw-Hill/Interamericana de España, S. A. U.
39. Skoog, D., West, D., Holler, F. & Crouch, S. (2001). *Química analítica*. (7ª ed). McGraw-Hill Interamericana Editores S.A. de C.V.
40. Szejtli, J. (1998). *Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry*.
41. Szente, L., & Szemán, J. (2013). Cyclodextrins in Analytical Chemistry: Host–Guest Type Molecular Recognition. *Analytical Chemistry*, 85(17), 8024-8030. doi: 10.1021/ac400639y
42. Tari, T. & Singhal, R. (2002). Starch based spherical aggregates: reconfirmation of the role of amylase on the stability of a model flavouring compound, vanillin. *Carbohydrates Polymers*. 50, 279-282.
43. Tampieri, M., Galuppi & R., Macchioni, F. (2005). The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. *Mycopathology*. 159, 339-345.
44. Torres, S. (2014). Evaluación para la separación enantiomérica del acetato del 5-fenil-3metilpentilo, un fármaco prototipo para el tratamiento del Alzheimer, por medio de la simulación de la mecánica molecular de los complejos que se forman con ciclodextrinas disponibles comercialmente.

- (Tesis de licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
45. Valero, D., Valverde, J. M., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Castillo, S. & Serrano, M. (2006). The combination of modified atmosphere packaging with eugenol or thymol to maintain quality, safety, and functional properties of table grapes. *Postharv Biotechnology*. 41, 317-327.
 46. Villiers A. (1981). *Sur la fermentation de la fécula par l'action du ferment butyrique*. Compt. Rend. Acad. Sci.
 47. Willey J, Sherwood, L. & Woolverton, C. (1997). Antimicrobial Chemotherapy in Prescott, Harley, and Klein's Microbiology. (7th ed.). Ed., McGraw-Hill International, Pp: 837,840.
 48. Candida Hub (s.f.) Recuperado de: <https://candidahub.com/essential-oil/Oregano-Oil-for-Yeast-Infection> 2016/11/14
 49. Cepvi. (s.f.) recuperado de: <http://www.cepvi.com/medicina/aromaterapia/tomillo.shtml> 2009/06/10
 50. Fichas infojardin. (s.f.) recuperado de: <http://fichas.infojardin.com/condimentos/thymus-vulgaris-tomillotremoncillo.htm> 2011/08/22
 51. Desde la Piquera: Abejas y apicultura Biológica (2011) Recuperado de: <http://www.desdelapiquera.com/2011/01/timol-la-otra-cara-de-este-tratamiento.html> 2015/11/14
 52. Plantas para curar (s.f.) Recuperado de: <http://www.plantasparacurar.com/toxicidad-del-tomillo/s/> 2010/05/16
 53. Unidad de Informática del Instituto de Química UNIIQUIM (2016) <https://uniiquim.iquimica.unam.mx/compuesto-item/timol/> 2016/11/14

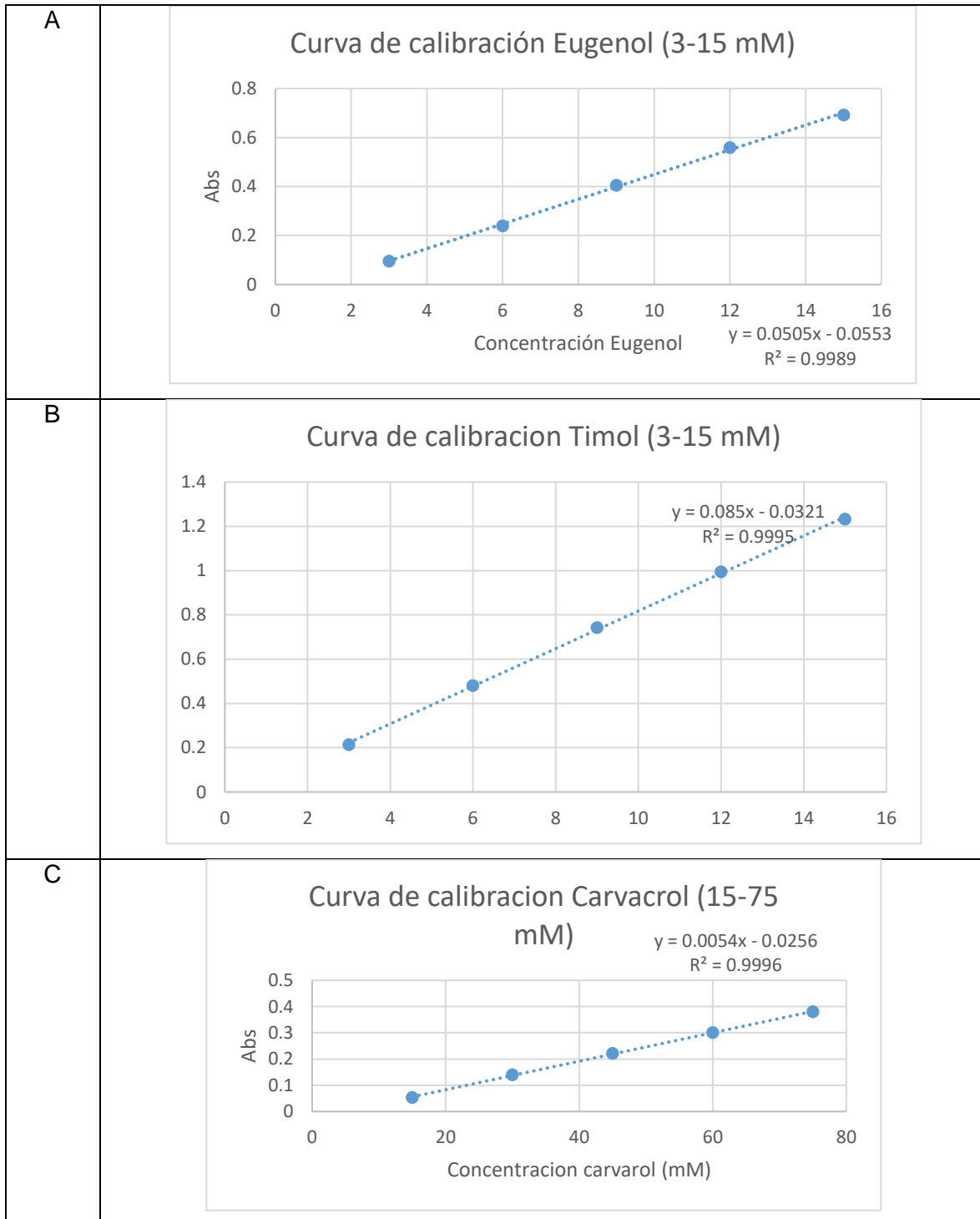
ANEXOS

Anexo 1 Diagrama de solubilidad original (A) y su modificación (B)



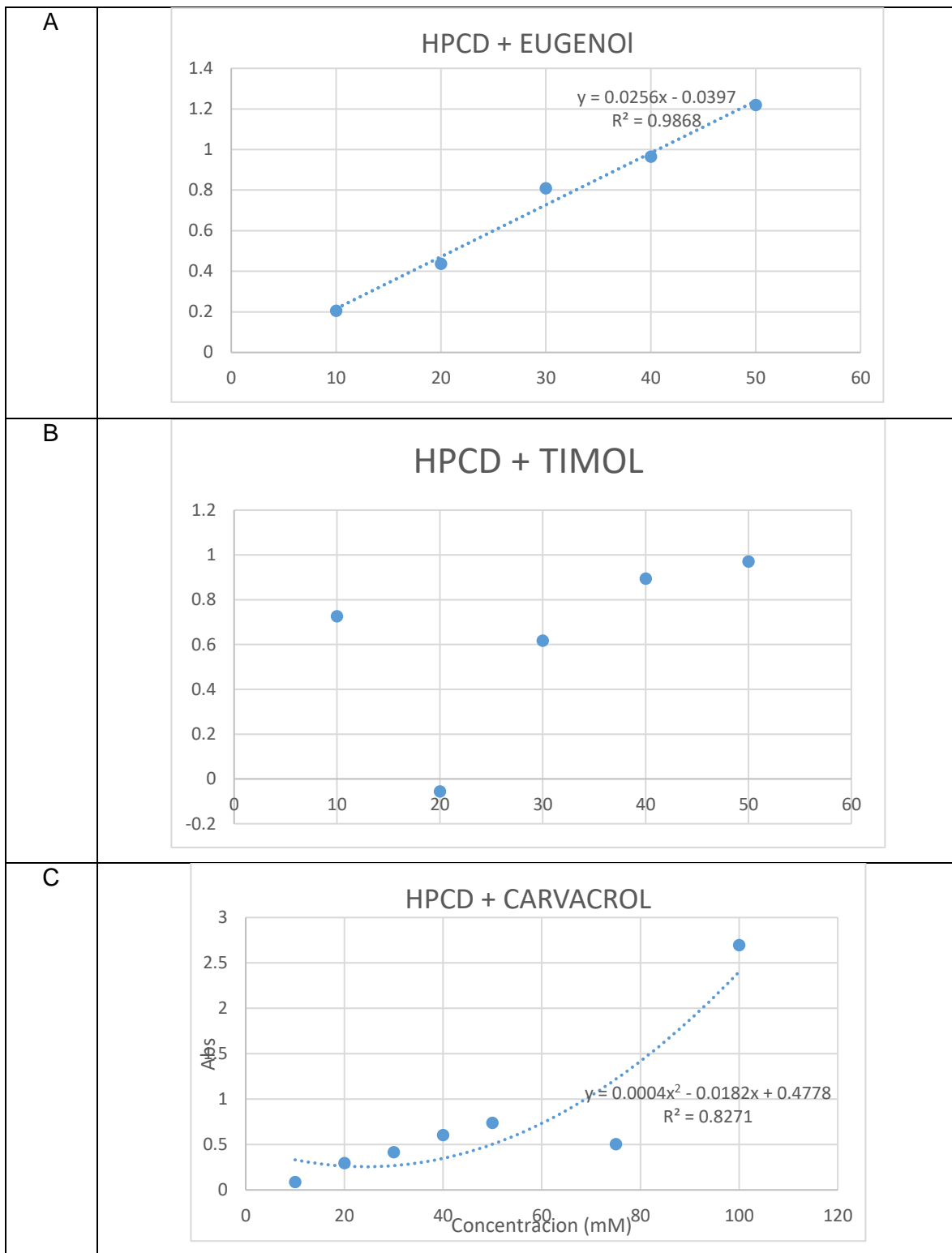
Fuente: (Hernández, 2014, p. 111)

Anexo 2 Graficas de las curvas de calibración de (A), timol (B) y carvacrol (C)



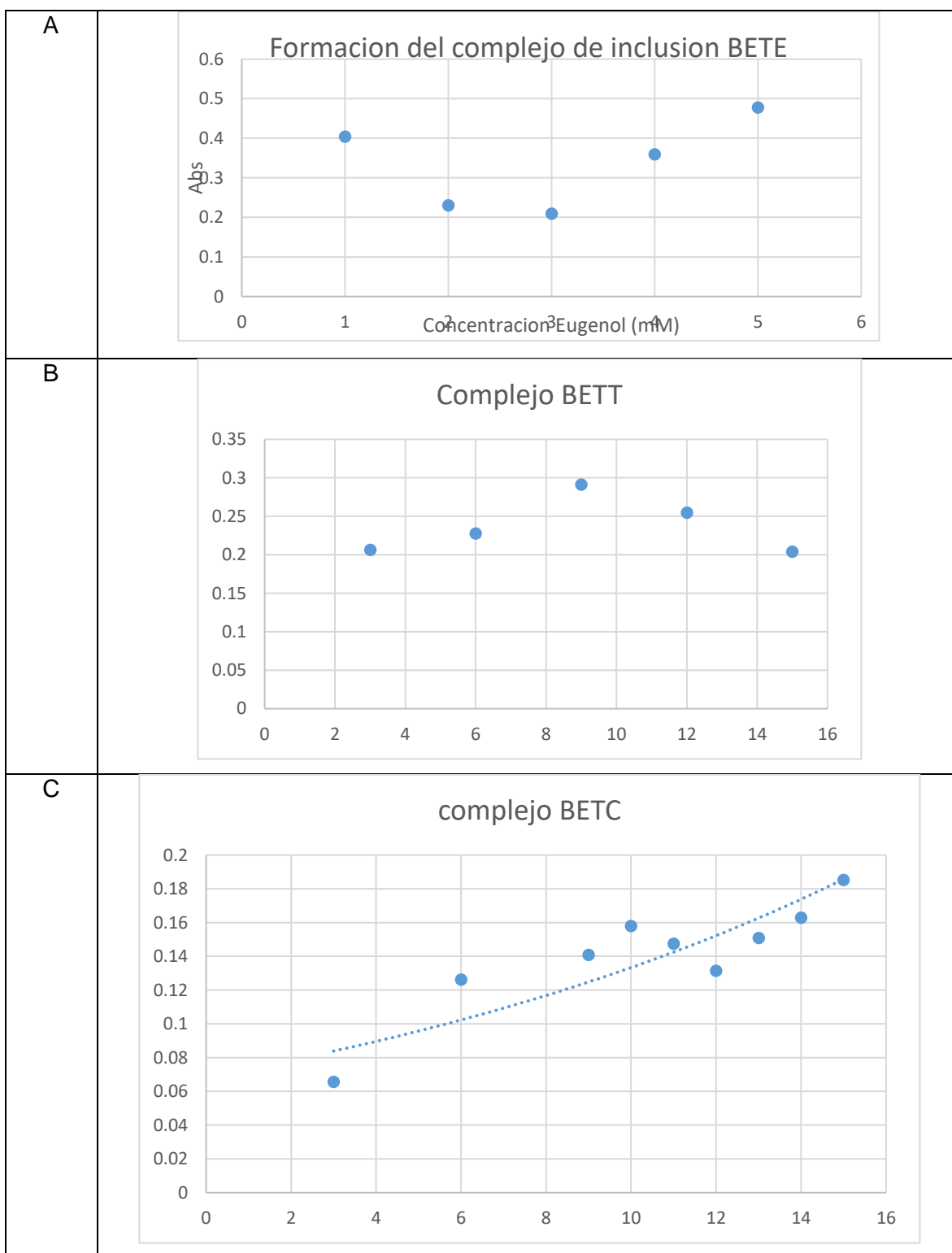
Fuente: Datos experimentales obtenidos en el LIQA, Edificio T-12, Ciudad Universitaria

Anexo 3 Graficas de las curvas preparadas con HPCD de eugenol (A), timol (B) y carvacrol (C)



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el LIQA, Edificio T-12, Ciudad Universitaria

Anexo 4 Graficas de las curvas preparadas con eugenol (A), timol (B) y carvacrol (C)



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el LIQA, Edificio T-12, Ciudad Universitaria

Anexo 4. Modificación de la ecuación de Benesi-Hildebrand

$$A = A_0 + \frac{(A_{\infty} - A_0) K_c [CDs]}{1 + K_c [CDs]}$$

Ecuacion No.1

Ecuación de Benesi-Hildebrand

Fuente: (Hernández, López, Lucas, & Núñez, 2012)

$$K = \frac{[\text{Complejo}]}{[\text{Ciclodextrina}][\text{Metabolito}]}$$

$$K = \frac{CD - \text{metabolito}}{([CD]_{\text{inicial}} - [CD - \text{metabolito}])([Metabolito]_{\text{inicial}} - [CD - \text{metabolito}])}$$

Se colocó en función de las concentraciones basándose en la ley de Beer, llegando a la expresión:

$$K = \frac{\left(\frac{\Delta abs}{\epsilon b}\right)}{\left(\frac{\Delta abs}{\epsilon b}\right)^2 - \left(\frac{\Delta abs}{\epsilon b}\right) ([CD]_{\text{inicial}} + [metabolito]_{\text{inicial}}) + ([CD]_{\text{inicial}}[metabolito]_{\text{inicial}})}$$

Donde

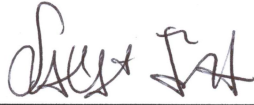
 Δab

= la diferencia de absorbancia entre la curva de calibración del metabolito libre y acomplexado

 ϵ = absorotividad del metabolito libre b = camino óptico

Anexo 5. Constantes de equilibrio determinadas y la media correspondiente.

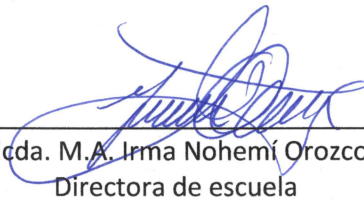
Complejo	Kc	Media
BETT	5.27×10^{-05}	
	5.70×10^{-05}	
	5.94×10^{-05}	5.64×10^{-05}
BETC	1.29×10^{-04}	
	9.87×10^{-05}	
	7.25×10^{-05}	1.00×10^{-04}
BETE	1.29×10^{-05}	
	6.24×10^{-06}	
	3.09×10^{-06}	7.40×10^{-06}
HPBC	2.35×10^{-05}	
	2.78×10^{-05}	
	2.80×10^{-05}	2.64×10^{-05}
HPBT	1.34×10^{-05}	
	1.16×10^{-05}	
	1.07×10^{-05}	1.19×10^{-05}



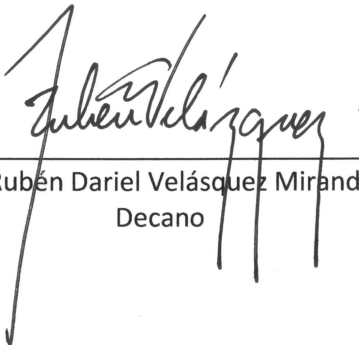
Alba Elena Sarai Toledo Hernández



Lic. Omar Ernesto Velásquez González
Asesor



Licda. M.A. Irma Nohemí Orozco
Directora de escuela



Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda
Decano