



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS
BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS DEL CLAVO DE OLOR
MEXICANO (*ZYZIGIUM, AROMATICUM, L. MYRTACEAE*)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERA EN ALIMENTOS**

P R E S E N T A :

ALMA LIDIA VIZZUETT VEGA

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. JUAN MANUEL ACEVES HERNÁNDEZ**

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis**

Caracterización de los compuestos biológicamente activos del clavo de olor mexicano (Zyzigium, aromaticum, L. Myrtaceae).

Que presenta la pasante: Alma Lidia Vizzuett Vega

Con número de cuenta: 302015618 para obtener el Título de la carrera: Ingeniería en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de Noviembre de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

| | NOMBRE | FIRMA |
|----------------------|-----------------------------------|-------|
| PRESIDENTE | Dr. Juan Manuel Aceves Hernández | |
| VOCAL | I.Q.I. José Oscar Germán Ibarra | |
| SECRETARIO | Q.F.B. Salvador Zambrano Martínez | |
| 1er. SUPLENTE | M. en C. Tais Nopal Guerrero | |
| 2do. SUPLENTE | Dra. Dolores Molina Jasso | |

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por las bendiciones y oportunidades que pone en mi camino día con día, por medio de las cuales he podido llegar hoy a este punto tan importante en mi vida, a San Benito Abad por escuchar mis oraciones como buen protector de los ingenieros durante todo mi recorrido universitario.

A mi Familia

A mi madre Hilda Vega, por ser tan paciente, comprensiva, atenta, pero sobre todo por darme siempre su apoyo y amor.

A mi padre Roberto Vizzuett por estar siempre al pendiente de todo lo que hago sin importar lo cerca o lejos que este, por darme su amor, apoyo y comprensión.

A mis hermanos Luz, Roberto, Ana, Moisés y Nancy por las alegrías, su apoyo y compañía, porque a pesar de no ser yo el mejor ejemplo, me esfuerzo día con día para poder serlo.

A mis abuelos Rufino Vega y Rufina Martínez por todos sus consejos y enseñanzas y por darme siempre su apoyo incondicional.

A Carlos M. Fuentes por el amor que me ha brindado todos estos años, por motivarme y apoyarme siempre sin importar lo imposible que el reto parezca.

A mi asesor de tesis el Dr. Juan M. Aceves Hernández por sus enseñanzas, consejos, su incondicional amistad y por el gran apoyo que me ha brindado para realizar este trabajo, también por la motivación que me da para poder continuar con los nuevos aprendizajes.

A mis amigos, con los cuales he reído, llorado, aprendido y disfrutado de mi estadía en la Facultad y fuera de ella.

A mi querido amigo Luis Enrique Ortega por su maravillosa amistad, por estar allí en las buenas y en las malas sin dejarme nunca caer.

A mi *alma mater* la Universidad Nacional Autónoma de México, así como a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, que me han abierto sus puertas guiándome paso a paso en mi formación académica como Ingeniera en Alimentos y por lo que orgullosamente mi corazón azul es y mi piel dorada por siempre.

Contenido

| | |
|---|----|
| 1. RESUMEN | i |
| 2. GENERALIDADES | 1 |
| 2.1. Productos naturales | 1 |
| 2.1.1 Inicio del uso de las especias | 2 |
| 2.1.2. Clavo de olor | 3 |
| 2.3. Métodos de extracción..... | 8 |
| 2.3.1. Métodos directos..... | 9 |
| 2.3.2 Destilación | 9 |
| 2.3.3 Destilación por arrastre con vapor de agua..... | 10 |
| 2.3.4 Destilación con agua o hidrodestilación..... | 10 |
| 2.3.5 Destilación agua - vapor o vapor húmedo..... | 10 |
| 2.3.6 Destilación previa maceración | 11 |
| 2.3.7 Destilación al vacío | 11 |
| 2.3.8 Destilación molecular..... | 11 |
| 2.3.9 Métodos de extracción con solventes..... | 11 |
| 2.3.9.1 Maceración en grasa..... | 11 |
| 2.3.9.2 Extracción con solventes volátiles | 12 |
| 2.3.9.3 Extracción por Fluidos Supercríticos (EFS)..... | 12 |
| 2.3.9.4 Enfloración o Enfleurage..... | 12 |
| 2.4. Ensayos biológicos | 13 |
| 2.4.1 Antibiogramas..... | 13 |
| 2.4.2 Método de Kirby Bauer | 14 |
| 2.5 Aspectos básicos de la química computacional..... | 14 |
| 2.6 Modelado molecular..... | 15 |
| 2.6.1 Software ó programa Spartan..... | 16 |
| 2.6.2 Acoplamiento o Docking molecular..... | 18 |
| 3. PROBLEMA | 28 |
| 4. HIPOTESIS | 29 |
| 5. OBJETIVOS | 30 |
| 6. METODOLOGIA..... | 31 |
| 6.1 Metodología experimental | 31 |

| | |
|---|----|
| 6.1.1 Materiales y equipos..... | 31 |
| 6.1.2 Reactivos..... | 31 |
| 6.1.3. Procedimiento de la destilación por arrastre de vapor por el método directo..... | 31 |
| 6.1.4. Secado del aceite esencial | 32 |
| 6.2. Metodología de pruebas biológicas..... | 33 |
| 6.2.1. Materiales para el medio de cultivo | 33 |
| 6.2.2. Materiales para la prueba de sensibilidad..... | 33 |
| 6.2.3. Procedimiento de la prueba de sensibilidad (Antibiograma) | 34 |
| 6.3 Metodología de cálculos teóricos..... | 35 |
| 6.4 Metodología de modelado molecular..... | 36 |
| 6.5 Metodología del Docking..... | 37 |
| 7. RESULTADOS Y DISCUSION..... | 38 |
| 7.1 Extracción del aceite esencial..... | 38 |
| 7.2. Pruebas de sensibilidad | 39 |
| 7.2.1. E.coli | 39 |
| 7.2.2. Staphylococcus aureus | 39 |
| 7.3. Modelo molecular..... | 41 |
| 7.3.1 Parámetros Geométricos..... | 42 |
| 7.3.2 Espectros de infrarrojo y Raman | 45 |
| 7.3.3 Diferencia de energía de los orbitales moleculares HOMO-LUMO | 46 |
| 7.3.4. Estructuras LUMO del Eugenol..... | 46 |
| 7.3.5. Estructuras HOMO del Eugenol..... | 46 |
| 7.3.6. Superficie de potencial electrostático molecular..... | 47 |
| 7.3.7. Estructuras con densidad LUMO | 48 |
| 7.3.8. Estructuras con densidad HOMO | 48 |
| 7.4. Docking | 49 |
| 8. CONCLUSIONES | 58 |
| 9. REFERENCIAS..... | 59 |
| 10. APENDICE..... | 62 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 Clavos de olor. | 4 |
| Figura 2. Estructura química del Eugenol. | 8 |
| Figura 3. Prueba de antibiograma en cultivo estándar. | 14 |
| Figura 4. Estructura tridimensional de la proteína 3P98 usada como blanco o receptor en nuestro estudio. | 22 |
| Figura 5. Detalle de la interacción ligando-proteína donde puede apreciarse la complementariedad geométrica de la molécula orgánica (esferas oscuras) y los huecos de la cavidad. | 25 |
| Figura 6. a) Evaluación de la interacción entre un átomo de carbono en un punto de la malla y el sitio de unión, la evaluación se repetirá para cada punto de la malla y para cada tipo de átomo. b) Las interacciones del átomo de carbono (y de los demás) de la molécula ya fueron precalculadas. La energía de interacción es la suma de esos valores. c) Una orientación diferente de la misma molécula requiere los valores precalculados para los átomos en los nuevos sitios de la malla. d) Ejemplo de interacción no realista donde parte del ligando se traslapa sobre la molécula blanco. El átomo de nitrógeno recibe una penalización alta. | 26 |
| Figura 7. Representación tridimensional generada a partir de las coordenadas cartesianas de los átomos del sitio de unión y del ligando en su orientación óptima. | 27 |
| Figura 8. Destilación por arrastre de vapor | 32 |
| Figura 9. Diagrama de flujo de procedimiento de prueba de sensibilidad (antibiograma). | 34 |
| Figura 10. Diagrama simplificado de las etapas de simulación del reconocimiento molecular o docking. | 37 |
| Figura 11. Medio de cultivo después de 24 horas de incubación con discos impregnados de extracto oleoso de clavo de olor y <i>Staphylococcus aureus</i> . | 40 |
| Figura 12. Medio de cultivo después de 24 horas de incubación con discos impregnados de extracto oleoso de clavo de olor y <i>E. coli</i> . | 40 |
| Figura 13. Molécula de Eugenol optimizada. | 41 |
| Figura 14. Molécula de Eugenol con ángulos entre átomos de carbono y oxígeno. | 43 |
| Figura 15. Espectro infrarrojo, obtenido con cálculos teóricos. | 45 |
| Figura 16. Espectro de Raman obtenido, mediante cálculos teóricos. | 45 |
| Figura 17. Orbitales LUMO y LUMO (+) de la molécula de Eugenol | 46 |
| Figura 18. Orbitales HOMO y HOMO (-) de la molécula de Eugenol | 46 |
| Figura 19. Potencial electrostático y densidad de la molécula de Eugenol. | 47 |
| Figura 20. Densidad de los orbitales LUMO y LUMO (+). | 48 |
| Figura 21. Densidad de los orbitales HOMO y HOMO (+). | 48 |
| Figura 22. Complejo Eugenol – proteína de prostaglandina H Sintasa, que se produce en la inflamación, el ligando esta en volumen lleno. | 49 |
| Figura 23. Fragmento de la secuencia de aminoácidos de la proteína 3p98. | 50 |
| Figura 24. Fragmento de la secuencia de aminoácidos de la proteína 1cx2. | 51 |
| Figura 25. Molécula tridimensional de Eugenol con los residuos de aminoácidos más cercanos y sus distancias en Armstrongs. | 52 |
| Figura 26. Distancia de interacción entre el Eugenol y los residuos de la proteína 1CX2-A, ya que es un tetrámero la proteína completa. | 53 |
| Figura 27. a) Cavidades de la 3P98-Eugenol b) Cavidades de la 3P98-Eugenol en estructura secundaria o backbone. | 54 |
| Figura 28. Estructura Backbone de la 3P98 con Eugenol en el sitio activo principal. | 55 |
| Figura 29. a) Cavidades de la 1Cx2-Eugenol en estructura backbone b) Cavidades de la 1Cx2-Eugenol | 56 |
| Figura 30. Estructura Backbone de la 1Cx2 con Eugenol en el sitio activo principal. | 57 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| <i>Tabla 1 Componentes químicos del clavo de olor en % de concentración</i> | 5 |
| <i>Tabla 2. Tipos de métodos de extracción</i> | 9 |
| <i>Tabla 3. Propiedades moleculares de fármacos potenciales</i> | 24 |
| <i>Tabla 4. Resultados del halo de inhibición de eugenol vs Staphylococcus aureus y Escherichia coli.</i> | 39 |
| <i>Tabla 5. Ángulos de distancia entre átomos de la molécula de eugenol.</i> | 42 |
| <i>Tabla 6. Ángulos diedros entre átomos de la molécula de eugenol.</i> | 43 |
| <i>Tabla 7. Longitud de enlaces entre átomos de la molécula de eugenol.</i> | 44 |
| <i>Tabla 8. Diferencial de energía de los orbitales HOMO –LUMO</i> | 46 |
| <i>Tabla 9. Ligandos principales de la interacción Eugenol-proteína 3p98</i> | 50 |
| <i>Tabla 10. Ligandos principales de la interacción Eugenol-proteína 1cx2</i> | 51 |
| <i>Tabla 11. Control del método de Kirby Bauer</i> | 62 |

GLOSARIO

| | |
|------------------------------|---|
| Å | Armstrong |
| <i>Ab initio</i> | “Desde el principio” o “de primeros principios” |
| Apoptosis | Destrucción o muerte celular programada o provocada por el propio organismo, con el fin de autocontrolar su desarrollo y crecimiento, está desencadenada por señales celulares controladas genéticamente. |
| B3LYP | Funcional híbrido, en el que el potencial de intercambio es de Becke, además de tres parámetros y el de correlación de Lee, Yang y Parr. |
| HOMO | Acrónimo en el idioma inglés para orbital ocupado de más alta energía (Higher occupied molecular orbital) |
| LUMO | Acrónimo del idioma inglés para orbital molecular desocupado de más baja energía. (Lowest unoccupied molecular orbital) |
| Química Computacional | Disciplina emergente de un subcampo de la química teórica, la cual tiene como objetivo principal resolver químicamente los problemas mediante cálculos apoyados en programas computacionales. |
| Química Medicinal | Estudio de los fármacos usados en medicina, desde el punto de vista químico y de las proteínas con las que interactúa el fármaco en su acción terapéutica. |
| Química teórica | Disciplina que involucra a la mecánica cuántica debido a que incide directamente sobre la química molecular. |
| RMSD | Root Mean Square Deviación. (Desviación estándar de la raíz cuadrática media. |

1. RESUMEN

Los clavos de olor (*Syzygium aromaticum*) también llamados clavo o giroflé, son botones de los capullos secos de sabor picante agudo y con olor fuerte del árbol del clavo, originarios de las islas Molucas, las islas de las Especias. Se obtienen al quitar los botones de las flores rosas aún no abiertas, se secan y reciben este nombre por sus capullos que parecen clavos. Los aceites esenciales de la planta son determinantes para el olor, sabor y efecto, pueden llegar a un 15 por ciento en masa del total del clavo. Siendo sus principales componentes en un 70 a 85 % de eugenol (también existe en la canela), un 15 % aproximadamente de acetato de eugenol y un 5 a un 12 % de β -cariofileno y un 2 % de ácido oleanólico, en el clavo mexicano.

En la cocina mexicana se utilizan clavos de olor para condimentar escabeches, salsas, platos de carne y pescado. Se usa en cantidades limitadas para proporcionar fragancia y sabor, también se ha aprobado el uso del clavo de olor como antiséptico tópico y anestésico.

El eugenol, uno de sus constituyentes, se ha usado como analgésico, anestésico local, antiinflamatorio y con efectos antibacterianos. Se le usa en forma de pasta o mezcla como cemento dental, relleno y material de restauración.

Por las características de esta especie de uso común, en el presente trabajo se realizó una caracterización química del clavo de olor mexicano, evaluando sus propiedades antisépticas y antimicrobianas, así como su modelado molecular, docking o acoplamiento molecular y cálculos teóricos para explicar su actividad biológica.

El trabajo teórico que aquí se presentó, se sustentó en la Teoría de Funcionales de la Densidad, permitiendo la determinación de las propiedades geométricas, electrónicas y electrostáticas de la molécula de Eugenol contenida en el aceite esencial de clavo de olor, empleando el funcional híbrido B3LYP y con el conjunto de funciones base 6-311G+ (d, p). De igual manera, la superficie de potencial electrostático molecular y los orbitales moleculares HOMO-LUMO permitieron verificar los sitios activos y el comportamiento electrófilo y nucleófilo de la molécula de eugenol siendo está muy contrastante con el nivel de energía en la que se encontraba.

Apoyados en estas características, se hizo uso de la base de datos del Protein Data Bank, PDB, para obtener y preparar las proteínas con las que se presume que interactúa el Eugenol en el proceso de desinflamación ya que es usado como analgésico, anestésico local, antiinflamatorio y con efectos antibacterianos

Las proteínas de interacción principal son la 3P98 y 1CX2 (ciclooxigenasa y prostaglandina), estas pertenecen a una subfamilia de receptores transmembrana de la superficie celular y están relacionadas con funciones de homeostasis de diversos procesos biológicos, como con el dolor, inflamación y neoplasias, así mismo la ciclooxigenasa es la enzima clave para la síntesis de prostaglandina a través de la oxidación del ácido araquidónico (18).

Por tanto, el estudio de la forma en la que el Eugenol inhibe la síntesis de estas proteínas es de suma importancia para poder comprender como es que este actúa sobre el efecto causado por ambas enzimas y la capacidad que tiene para inhibir el crecimiento bacteriano pudiendo dar así un gran uso en el campo alimenticio y médico.

2. GENERALIDADES

2.1. Productos naturales

Los productos naturales son sustancias y/o extractos derivados de un gran número de plantas, raíces, hojas y tallos de vegetales que cuentan con actividad biológica, el clavo de olor es una de las especias más utilizadas en nuestro país y este abarca desde sus usos gastronómicos hasta su uso médico, debido a la gran variedad de propiedades biológicamente activas de sus compuestos y de los cuales se tiene muy poca información bibliográfica y explicación científica de su acción terapéutica.

Es por esta razón que se ha elegido estudiar los compuestos biológicamente activos del clavo de olor mexicano.

El actual interés sobre los productos naturales se enfoca en los aspectos biológicos como quimiotaxonomía, *estudios enzimáticos* y ecología química.

La quimiotaxonomía está relacionada con la descripción y clasificación de las plantas. Además, un gran número de bioquímicos tienen interés en los productos naturales con el objeto de conocer qué enzimas intervienen en los procesos biosintéticos, la naturaleza de las mismas, su activación e inhibición.

Otro de los campos de investigación en productos naturales, se refiere a la función que desempeñan algunos de ellos en los organismos y medios en los cuales se originan, o a su papel como mediadores de las interacciones ecológicas, asegurando la supervivencia en un medio hostil.

Una de las primeras razones de estudio de los productos naturales fue su utilización en medicina y que en la actualidad continua; además las empresas farmacéuticas realizan ensayos dirigidos al descubrimiento de nuevas propiedades farmacológicas en extractos de plantas que poseen ya actividades bien establecidas y utilizadas, por ejemplo el uso odontológico del eugenol por sus propiedades antisépticas y antiinflamatorias.

2.1.1 Inicio del uso de las especias

Las Hierbas Aromáticas y Especias son importantes en la historia, tanto por sus propiedades curativas como culinarias. A cualquier comida le dan un toque especial y ofrecen un sabor único en cada plato.

El primer indicio de utilización de especias aromáticas fue durante la edad de fuego, cuando el hombre utilizaba ramas de determinadas especies para la cocción de sus alimentos. Los humos aromáticos surgían a partir de la combustión de los aceites esenciales que estas plantas poseían.

Las primeras aplicaciones en alimentación aparecen con la edad de hierro y de bronce, cuando se inicia la utilización de cenizas en la cocción de alimentos. También durante esta época comienza la utilización de hierbas aromáticas con fines medicinales, aplicando las mismas cenizas en heridas y zonas traumatizadas.

Los egipcios y los babilonios utilizaron mucho las plantas aromáticas. Se remonta a entonces la creación de los primeros jardines, en los que se cultivaban especias aromáticas para ser empleadas en cocina o para la preparación de ungüentos y aceites cosméticos.

El primer antecedente sobre el cultivo de plantas aromáticas y medicinales se remonta a 3.000 años AC en China, donde se producían estas plantas para consumo y como moneda de intercambio con otros pueblos. Se debe al emperador chino Cho-Chin Kei (conocido por la historia como el Hipócrates chino) la obra que más destaca en el conocimiento sobre la aplicación y acción de los principios activos contenidos en las plantas aromáticas y medicinales de la China antigua. En dicha obra se usaron las siguientes plantas: *Ruibarbo*, *Acónito*, *Alcanfor*, *Albahaca*, *Ají (capsicum)*, **Clavo de olor**, *Canela* y *Vainilla*, posteriormente aparece el *Azafrán*.

Con el tiempo se consagra la raíz de Ginseng como “panacea universal” (un mítico medicamento capaz de curar todas las enfermedades, o incluso de prolongar indefinidamente la vida, por lo que fue buscada durante siglos, especialmente en la Edad Media).

Los Asirios y Hebreos también cultivaron diversas plantas aromáticas, que utilizaban en forma de aguas aromáticas, tinturas y ungüentos.

Pero la fuente común para todos los descubrimientos posteriores a China, fue la India, durante el segundo período Brahmánico, donde se encuentra el origen de los extractos de Sándalos, Canela, Clavo y Cardamomo.

Los Romanos importaban de África, España y Oriente, Pimienta, Canela, Jengibre y Cardamomo, Mirra, Goma arábiga, Adormidera, Semillas de Lino, Semillas de Ajonjolí, Semillas de Rábano, Miel de abejas, Colorantes y Especies. Desarrollaron durante esa época el uso de las hierbas medicinales aplicadas a seres humanos y animales (comienzo de la ciencia veterinaria). Los nombres más conocidos que impulsaron su uso y propagación en esta época fueron: Columela, Paladius, Plinio y Galeno, este último considerado el “Padre de la Farmacopea”

Un gran paso lo dieron los Árabes al distinguir Medicina de Farmacopea. Ellos fueron los grandes contribuyentes a la difusión en las costas del Mediterráneo, de diversas plantas medicinales y sus propiedades. El clavo de olor ha sido una especia muy valorada y muy costosa, alrededor del siglo XV los árabes comercializaban **clavos de olor** en la ruta del Océano Índico, que fue tomada por los portugueses y distribuyeron grandes cantidades de esta especia a Europa. Se cuenta que entonces su valor era de unos 7 gramos de oro por cada kilo de clavo.

En la Edad Media, la vida aislada en los castillos fortificados de los feudos, obligaba a comer carne conservada de un modo muy práctico, simplemente secada al sol y luego ahumada, o bien conservada en sal y especias como **clavo de olor** y pimienta.

Con el Renacimiento, durante la fastuosidad de las cortes europeas, la cocina también entró en una fase de refinamiento, adoptando recetas elaboradas y complejas en las que las hierbas aromáticas tenían el papel protagonista.

En el siglo XVIII el empleo de las hierbas aromáticas no disminuyó, ya sea por la dificultad de conservar la carne o por la tendencia a un tipo de cocina con sabores.

Durante el siglo XIX se prefirieron en cambio alimentos más simples, basados en pocos condimentos. La cocina popular, a causa de la pobreza de la alimentación, necesitaba ser enriquecida con algún perfume, aportando entonces ese toque con hierbas como *salvia*, *coriandro*, *orégano*, *romero*, *menta*, *tomillo* y *clavo* entre otras.

2.1.2. Clavo de olor

Los clavos de olor son originarios de las islas Molucas, en Indonesia. El clavo pertenece a la familia de las mirtáceas y es el estambre o pistilo de la flor seca antes de abrirse, posee una forma que recuerda a los clavos usados en la ebanistería.

El compuesto principal del aceite de clavo es el Eugenol, perteneciente a los alilbencenos, de pronunciada actividad analgésica y antiséptica. El aceite esencial recién destilado es de color transparente, pero por acción de la luz y oxígeno adquiere un color amarillo claro. En la Figura 1 se presenta una muestra del clavo de olor.

Además de ser una especia aromática, el clavo tiene propiedades medicinales con aplicaciones en la industria de los alimentos y se le han detectado propiedades plaguicidas.



Figura 1 Clavos de olor .

Definición

Clavo

Zyzigium aromaticum Myraceae

2.1.2.1 Botánica y ecología.

Árboles o arbustos de hasta 20m de altura, cuya corteza se desprende en "parches". Las hojas son verde-oscuro en el anverso y verde-amarillento en el reverso, lustrosas, y muy puntiagudas. Las flores son blancas y grandes. Los frutos son globosos, de color rosa o amarillento y tienen un aroma agradable.

Género con especies nativas de Asia, Malasia y Australia; introducida en América y naturalizada en varias regiones tropicales. Asociada a bosque tropical caducifolio.

2.1.2.2 Etnobotánica y antropología.

El clavo es utilizado como condimento alimenticio y también como planta medicinal para aliviar el dolor de muela. Con tal fin, en Oaxaca y Guanajuato, se calientan levemente unos clavos machacados y luego se aplica sobre la muela que duele; también suele usarse en Morelos contra las caries.

En Tlaxcala se recomienda ocuparla en baños para después del parto.

Existen muchas referencias de las múltiples aplicaciones del eugenol, sin embargo hay muy pocas sobre que proteínas o enzimas actúa específicamente el eugenol.

2.2. Farmacología.

Evaluado el eugenol en ratas hembras, por la vía oral, a la dosis de 0.375 mg/kg, mostró actividad antiinflamatoria por medio de la técnica del edema de la pata inducido con carragenina. Esta actividad fue observada también con un extracto preparado con partes de varias plantas, entre otros botones de flores de la especie *S. aromaticum*, que produjo resultados positivos en humanos. En la Tabla 1 se presentan las concentraciones en las que se obtienen los diferentes componentes del clavo de olor.

Entre los principales componentes químicos se encuentran los señalados en la tabla 1.

Tabla 1 Componentes químicos del clavo de olor en % de concentración.

| Componentes | Concentración (%) |
|---|-------------------|
| Eugenol | 71.56 |
| Eugenyl acetate | 8.99 |
| Caryophyllene oxide | 1.67 |
| Nootkatin | 1.05 |
| Phenol-4-(2,3-dihydro-7-methoxy-3methyl-5-(1-propenyl))-2-benzofurane | 0.98 |
| p-Cymene | 0.90 |
| Guaiol | 0.90 |
| Thymol | 0.87 |
| Isolongifolanone (trans) | 0.86 |
| 5-Hexene-2-one | 0.67 |
| Benzene-1-butylheptyl | 0.55 |
| Hexadecanoic acid | 0.50 |
| Vitamine E acetate | 0.43 |
| Dodecatrienoic acid-3,7,11-trimethylethyl ester | 0.38 |
| Octadecanoic acid butyl ester | 0.33 |
| 9,17-Octadeca-dienal | 0.24 |

2.2.1 Eugenol

El Eugenol es un derivado fenólico presente en grandes cantidades en la esencia del clavo (*Syzygium aromaticum*) aunque también puede extraerse de la *pimienta*, *hojas de laurel*, *canela*, *alcanfor* y otras plantas. Es de consistencia líquida y aceitosa, de color amarillo claro, con aroma característico, poco soluble en agua y soluble en alcohol. El aceite de clavo ha sido utilizado desde el siglo XVI como antiséptico y anestésico local para aplicación tópica, hasta que *Chislama* en 1873, lo introdujo en la odontología y recomendó que se mezclara con óxido de zinc para formar una masilla de eugenolato de

zinc y pudiera aplicarse directamente en las cavidades cariosas, lo cual se utiliza hasta la actualidad en odontología como material de obturación temporal, y es un componente de las preparaciones higiénicas orales. Igualmente se utiliza como sedante pulpar, cementante provisional, apósito quirúrgico, obturador de conductos, anestésico tópico, protector dental, como desinfectante en la obturación de los conductos radiculares y en el revestimiento pulpar. Tópicamente forma parte de formulaciones de dentífricos y productos cosméticos y también de una formulación de aplicación tópica sobre el glande para evitar la eyaculación prematura.

2.2.3 Mecanismo de acción en odontología

El eugenol es un bloqueador irreversible de la conducción nerviosa y en concentraciones bajas, es capaz de reducir la transmisión sináptica de la zona neuromuscular. Varios estudios han concluido que el eugenol inhibe la ciclooxigenasa, favoreciendo el efecto analgésico y anestésico al lograr la inhibición de la biosíntesis de las prostaglandinas. A bajas concentraciones el eugenol inhibe la actividad nerviosa de forma reversible, como un anestésico local. Después de la exposición a altas concentraciones de eugenol, la conducción nerviosa es bloqueada irreversiblemente, indicando un efecto neurotóxico. El eugenol igualmente reduce la transmisión sináptica en la unión neuromuscular. Las fibras nerviosas sensoriales y sus funciones desempeñan un papel importante en la generación de la respuesta inflamatoria, ya que los nervios sensoriales en la pulpa dental contienen péptidos vasoactivos, como la sustancia P, péptido relacionado con el gen de la calcitonina, y otros. El hecho de que el Eugenol inhiba la actividad nerviosa y los componentes vasculares de la respuesta inflamatoria, así como la relación entre estos elementos, puede estar vinculado con sus posibles efectos antiinflamatorios.

El eugenol inhibe la quimiotaxis de los neutrófilos y la generación de anión superóxido a bajas concentraciones. Se ha encontrado que el Eugenol actúa como un inhibidor competitivo de la prostaglandina H (PGH) sintetasa, y previene el enlace del ácido araquidónico a esta enzima con la consecuente formación de PGH. El aceite de clavo ha demostrado ser un potente inhibidor de la formación de tromboxanos y de la agregación plaquetaria en sangre humana *in vitro*. Tanto las prostaglandinas (PG) como los leucotrienos (LT) son mediadores importantes en la respuesta inflamatoria. (Biblioteca Digital de la UNAM, Medicina Tradicional Mexicana)

Los efectos provocados por especies reactivas de oxígeno son eventos moleculares relacionados con el daño tisular. Son múltiples los estudios que han demostrado la capacidad antioxidante del eugenol y compuestos relacionados (como el isoeugenol), de inhibir la peroxidación lipídica inducida por especies reactivas de oxígeno. Igualmente inhibe la formación radical superóxido en el sistema xantina-xantina oxidasa, así como la generación del radical hidroxilo, previniendo la oxidación de Fe²⁺ en la reacción de Fenton, la cual genera este radical que es uno de los más agresivos a los tejidos, por todas las reacciones que desencadena. Esta propiedad quimiopreventiva del eugenol puede estar dada por la actividad de atrapar radicales libres. A continuación se presentan algunos usos, dosis, efectos farmacológicos y otra información del eugenol.

2.2.3.1. Uso terapéutico y dosis del clavo de olor:

- Infusión al 2%, 1 taza, 2-3 veces al día.
- Polvo: 200 mg/cápsula, 2 al día.
- Tintura (1:5): 0,5-2 g/dosis, 2-3 veces/día.
- Aceite esencial, diluido y aplicado tópicamente con una torunda de algodón.

2.2.3.2 .Efectos farmacológicos del clavo de olor:

- Antiséptico, bactericida, antiparasitario, fungicida y viricida (aceite esencial)
- Antiinflamatorio, analgésico, antihistamínico y espasmolítico.
- Antihelmíntico muy activo contra nematodos (aceite esencial).
- Colagogo (aceite esencial, especialmente el eugenol y metil eugenol).
- Anestésico local (aceite esencial).
- Antiemético.
- Carminativo (aceite esencial).
- Anti diarreico (taninos).
- Uterotónico

2.2.3.3. Información toxicológica

- Irritación:
 - (subcutánea, humanos): 40 mg/48
 - (subcutánea, hombre): 16 mg/48
- Toxicidad aguda:
 - DL50 (oral, rata): 1930 mg/kg
 - DL50 (intratraqueal, rata): 11 mg/kg
- Nocivo por ingestión, por inhalación o por absorción a través de la piel.
- Causa irritación en la piel.
- El vapor o emanaciones son irritantes de los ojos, membranas mucosas y el tracto respiratorio superior.
- Puede causar reacciones alérgicas.
- Efectos crónicos
 - Órganos diana: riñones, sistema nervioso central, pulmones y sistema gastrointestinal.

2.2.4 Aplicaciones del clavo de olor:

Vómitos, disquinesias biliares, meteorismo, parasitosis por nematodos. Amigdalitis, hepatitis víricas, enterocolitis, disentería amebiana, enterocolitis. salpingitis, cistitis, uretritis.

En aplicación tópica: neuralgias, odontalgias y otras afecciones de la pulpa dentaria (como antiséptico-analgésico), acné, artritis reumatoide.

En la Figura 2 se presenta la estructura química del eugenol.

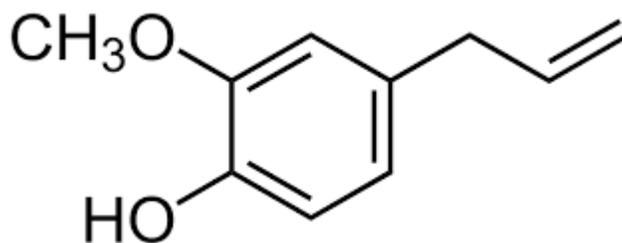


Figura 2. Estructura química del Eugenol.

2.3. Métodos de extracción

Se emplean diversos procedimientos físicos y químicos de extracción de aceites esenciales, según la variedad del material vegetal, parte de la planta a emplear y estabilidad del aceite esencial que se pretenda obtener, por lo que su correcta aplicación será lo que determine la calidad del producto final

Dependiendo de las variables anteriores, se tienen diversas técnicas de extracción, como se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Tipos de métodos de extracción

| Tipo de método | Procedimiento | Productos obtenidos |
|---------------------------------|---|---------------------------------------|
| Métodos directos | Extrusión | Aceites esenciales cítricos |
| | Exudación | Gomas, resinas, bálsamos |
| Destilación | Directa | Aceites esenciales y aguas aromáticas |
| | Arrastre de vapor con agua | |
| | Destilación- maceración (liberación enzimática de agliconas en agua caliente) | |
| Extracción con solventes | Solventes volátiles | Absolutos de pomadas |
| | Solventes fijos (grasas y aceites) | Absolutos de enforados |

2.3.1. Métodos directos

Los métodos directos se aplican principalmente a los cítricos, porque sus aceites están presentes en la corteza de la fruta, y el calor de los métodos de destilación puede alterar su composición. El aceite de los cítricos está contenido en numerosas células del epicarpio. Al exprimir la corteza tales células se rompen y liberan el aceite, el cual se recoge inmediatamente para evitar que sea absorbido por la corteza esponjosa que resulta después de este tipo de procesos. Los fenómenos que ocurren durante la extracción del aceite se clasifican en varias etapas:

- Laceración de la epidermis y de las células que contienen la esencia.
- Generación en la cáscara de áreas con presión mayor que sus circundantes a través de las cuales el aceite fluye al exterior.
- Abrasión de la cáscara, con la formación de pequeñas partículas de la raspadura.

2.3.2 Destilación

Consiste en separar por calentamiento, en alambiques u otros recipientes, sustancias volátiles que se llaman esencias, relativamente inmiscibles con el agua, de otras más fijas, enfriando luego su vapor para reducirlas nuevamente a líquido. Como la mayor la de los aceites esenciales son una mezcla de compuestos volátiles, que cumplen la ley de Raoult, lo que representa que a una temperatura dada, la presión total del vapor ejercida por el aceite esencial, será la suma de las presiones del vapor de sus componentes

individuales, por lo que durante el proceso de la destilación de vapor, la vaporización del aceite ocurre a una temperatura menor que la del punto de ebullición del agua.

En general los componentes del equipo de destilación para extraer aceite esencial son:

1. Fuente de energía.
2. Destilador.
3. Intercambiador de calor.
4. Decantador.

2.3.3 Destilación por arrastre con vapor de agua

Es el proceso más común para extraer aceites esenciales, más no es aplicable a flores ni a materiales que se apelmazan. En esta técnica se aprovecha la propiedad que tienen las moléculas de agua en estado de vapor de asociarse con moléculas de aceite. La extracción se efectúa cuando el vapor de agua entra en contacto con el material vegetal y libera la esencia, para luego ser condensada. Con el fin de asegurar una mayor superficie de contacto y exposición de las glándulas de aceite, se requiere picar o llevar a molienda el material según su consistencia.

2.3.4 Destilación con agua o hidrodestilación

Consiste en poner a hervir agua, bien sea por fuego directo, camisa de vapor o camisa de aceite, en la cual se ha sumergido previamente el material vegetal, preferiblemente en polvo, con el objeto de que el vapor de agua ejerza su acción en el mayor número posible de partículas vegetales

Similar al arrastre con vapor, el vapor producido arrastra los aceites esenciales hasta otro recipiente donde se condensan y se separan.

2.3.5 Destilación agua - vapor o vapor húmedo

Este procedimiento comúnmente se utiliza en el agro para destilar especialmente hierbas y hojas. El material se coloca sobre una parrilla, y luego, entre el fondo y la parrilla se coloca el agua, hasta un nivel un poco inferior a la parrilla. Cuando se dispone de poca agua, el agua que sale con el aceite esencial en la primera extracción, se recircula al extractor para sostener el proceso de destilación (cohobación).

El calentamiento se puede efectuar desde una fuente externa o dentro del propio cuerpo del extractor. El vapor de agua producido, se satura, atraviesa el material que se

encuentra sobre la parrilla y provoca el arrastre de la esencia, no existiendo peligro de sobrecalentamiento del material vegetal, tal como ocurre en la hidrodestilación.

2.3.6 Destilación previa maceración

El método se aplica para extraer el aceite de semilla de almendras amargas, bulbos de cebolla, bulbos de ajo, semillas de mostaza y hojas de corteza de abedul. En el caso de plantas aromáticas, la maceración en agua caliente se emplea para favorecer la separación de su aceite esencial, ya que sus componentes volátiles están ligados a componentes glicosilados.

2.3.7 Destilación al vacío

Se han diseñado sistemas para aislar constituyentes del aceite esencial, el cual se basa en sus diferentes puntos de ebullición. La mayor ventaja de este método, es la mínima probabilidad de descomposición de los aceites esenciales y formación de compuestos no deseados, debido a las bajas temperaturas de trabajo.

2.3.8 Destilación molecular

Este método se utiliza para la obtención de productos coloreados, más estables y la recuperación de las notas más delicadas que caracterizan los aceites esenciales. Se basa en una destilación del material entre 10,3 a 10,6 psi, (libra por pulgada cuadrada) cuyo producto se procesa con diversos solventes orgánicos, que luego se separan y recuperan, obteniendo en cada fase orgánica compuestos determinados del aceite esencial, según su afinidad frente al solvente.

2.3.9 Métodos de extracción con solventes

2.3.9.1 Maceración en grasa

Es un método de extracción con grasa caliente basado en sumergir los pétalos de flores en la grasa, y luego extraer las esencias con alcohol. Este método se ha reemplazado por completo por la extracción con disolventes orgánicos.

2.3.9.2 Extracción con solventes volátiles

Se basa en la facilidad de los disolventes orgánicos para penetrar en el material vegetal y disolver sus aceites volátiles, debido a las diferencias de punto de ebullición entre el aceite esencial y el solvente.

Tiene la ventaja de trabajar a temperaturas bajas, por lo que no provoca la termo destrucción ni alteración química de los componentes del aceite. Además ofrece la posibilidad de separar componentes individuales y/o presentes en poca cantidad. Se utiliza a escala de laboratorio pues a escala industrial resulta costoso por el valor comercial de los solventes. Se obtienen esencias impurificadas con otras sustancias (algunas veces tóxicas). La muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como éter de petróleo, pentano, éter etílico, alcohol, cloroformo. Estos solventes solubilizan la esencia y extraen otras sustancias tales como ácidos grasos, ceras y pigmentos que se pueden separar por destilación controlada.

2.3.9.3 Extracción por Fluidos Supercríticos (EFS)

Consiste en utilizar como material de arrastre sustancias químicas en condiciones especiales de temperatura y presión. El material vegetal se corta en trozos pequeños, se licua y se empaca en una cámara de acero inoxidable por donde se hace circular un líquido supercrítico. Los aceites esenciales se solubilizan y el líquido supercrítico que actúa como solvente extractor se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente. Finalmente se obtiene un aceite puro, una vez que se evapora el CO₂, que es el más usado.

2.3.9.4 Enfloración o Enfleurage

Se emplea para la extracción de esencias de flores delicadas, sensibles al calor y costosas como: rosa, jazmín, azahar, acacia, violeta, y resinas como la mirra. Los pétalos frescos se ponen en contacto con una delgada capa de grasa y el perfume emitido por las flores se absorbe. Después de dos o tres meses, muchas capas de grasa se saturan con las moléculas perfumadas del aceite de la flor, el cual se trata con alcohol y luego se destila para obtener la esencia. Es un procedimiento muy costoso por la mano de obra. Generalmente se sustituye por la extracción con hexano como solvente. Este método tiene sus ventajas debido a que la extracción de algunas plantas tiene bajo contenido intrínseco del aceite esencial, y otros métodos destruirían estas frágiles esencias.

2.4. Ensayos biológicos

2.4.1 Antibiógramas

La resistencia de las bacterias es el principal obstáculo para la eficacia terapéutica de los antibióticos, pues no sólo puede anular la acción curativa si se manifiesta en el curso del tratamiento, sino que a la larga tiene consecuencias todavía más graves para el conjunto de la población, ya que provoca la desaparición de las cepas susceptibles y la propagación de las resistentes. Ese es el motivo por el cual la determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos haya adquirido tanta importancia y sea indispensable para hacer de los antibióticos un uso racional y así, preservar la eficacia de este grupo tan valioso de agentes terapéuticos.

El conocimiento de la sensibilidad a los antibióticos, del microorganismo causante de una enfermedad, no es sólo importante para hacer la selección inicial del agente terapéutico correspondiente, sino que además en aquellos casos en los cuales el paciente presente intolerancia a determinado fármaco, permite seleccionar el más adecuado para ese paciente en particular.

Los antibiógramas son métodos *in vitro* que determinan las susceptibilidades de los microorganismos a una variedad de agentes antimicrobianos, bajo condiciones de laboratorio específicas y estandarizadas. La meta principal del estudio de susceptibilidad es proveer al clínico algunas recomendaciones sobre la terapia que puede ser más apropiada en pacientes con una infección específica. No obstante, la correlación exacta entre los resultados *in vitro* y la respuesta clínica es muchas veces difícil de predecir, ya que existen numerosos factores que influyen la interacción de los agentes antimicrobianos y los microorganismos en un determinado paciente. Entre los factores podemos resaltar:

Factores del agente antimicrobiano

- Farmacocinética
- Unión a proteínas del plasma
- Vías de administración
- Acción bacteriostática o bactericida
- Concentración en el sitio de la infección

Factores del huésped

- Enfermedad
- Estado inmunológico
- Formación de absceso
- Presencia de cuerpo extraño
- Función renal y hepática
- Cumplimiento del tratamiento

Factores del microorganismo

- Virulencia
- Alta concentración de microorganismos
- Infección mixta

- Desarrollo de resistencia durante el tratamiento

2.4.2 Método de Kirby Bauer

En el método de Kirby Bauer, el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico. Las placas se incuban por 16-18 horas a 35-37°C. Durante la incubación, el antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco. En un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir al germen en estudio. El diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I, o R) de acuerdo a tablas publicadas por los organismos encargados del control de tales métodos, por ejemplo el Comité Nacional de Estándares de Laboratorios Clínicos de los Estados Unidos de Norteamérica. En la Figura 3 se presenta un antibiograma típico.



Figura 3. Prueba de antibiograma en cultivo estándar.

2.5 Aspectos básicos de la química computacional

La química computacional es una disciplina que se extiende más allá de los límites tradicionales que separan la química, la física, la biología y la ciencia de la computación, permitiendo un estudio más detallado de átomos, moléculas y macromoléculas, mediante un sistema de hardware's cuando la investigación dentro del laboratorio se torna inapropiada, impracticable o imposible.

La química computacional implica el uso de modelos matemáticos, así como mecánica cuántica y la mecánica estadística, al igual que aspectos de física molecular y fisicoquímica, con el fin de determinar propiedades moleculares empleando programas

especializados en computadoras. De igual manera, consiste en determinar la estructura y las propiedades moleculares mediante el uso de la mecánica molecular y química cuántica a nivel semiempírico y teoría de orbitales moleculares a primeros principios (*ab initio*). (Cuevas 2003).

La química computacional incluye diversos aspectos tales como:

- El modelado molecular.
- Los métodos computacionales.
- El diseño molecular asistido por computadora.
- Las bases de datos químicas.
- El diseño de síntesis orgánica.
- La búsqueda de datos en bases químicas.

Existen distintas definiciones de química computacional aunque quizás la más apropiada sea la dada por Lipkowitz y Boyd: **“Aquellos aspectos de la química que son explicados o realizados mediante ordenadores”**.

El término química teórica se encuentra asociado con la búsqueda de mejores teorías para describir cantidades determinadas experimentalmente, e incluye los desarrollos de la química cuántica, la mecánica cuántica y la mecánica estadística en modelos tendientes a explicar la realidad física del fenómeno de reactividad. Los desarrollos de la química teórica se pueden transformar en algoritmos susceptibles de programarse, así que la química teórica es proveedora de métodos aplicables en química computacional, enriquecidos con los desarrollos generados por el modelado molecular, la mecánica molecular, la dinámica molecular, el desarrollo de interfaces gráficas, entre otras.

Mientras el modelado molecular nos da un modelo en 2D o 3D de la estructura de una molécula y sus propiedades, los métodos computacionales calculan la estructura y los datos apropiados necesarios para realizar el modelo.

2.6 Modelado molecular

En las últimas tres décadas, el modelado molecular ha surgido como una opción y herramienta poderosa para el estudio de los fenómenos químicos. Los cálculos en mecánica molecular que ahora se usan junto con los visualizadores gráficos facilitan la presentación de vistosos compuestos tridimensionales para ver la forma molecular y cuantificar el efecto estérico.

Los cálculos en química cuántica que hace tiempo eran solo una novedad científica,, ahora continúan siendo protagonistas en la investigación química y en la investigación científica, ya que ofrecen una alternativa viable como complemento de los datos experimentales, para probar y explorar una nueva química.

Existen sobradas razones para explicar el incremento de cálculos teóricos, en particular cálculos de química cuántica entre los químicos y los ingenieros. Pero lo más importante es que las teorías detrás de los cálculos teóricos han evolucionado hasta el punto en que una variedad importante de propiedades, entre ellas la geometría de una molécula en equilibrio y las energías implicadas en una reacción se pueden obtener con una precisión buena para ser usadas en publicaciones y en el laboratorio.

Por otro lado está el espectacular avance en el hardware en la última década, lo que permite presumir que esto significa que las “buenas teorías” pueden ser aplicables fácilmente y en forma rutinaria a sistemas “reales”. También, se han desarrollado programas de cómputo a tal punto que un químico con poco o ningún entrenamiento puede usarlos fácilmente.

Finalmente, el modelado molecular ha llegado a ser una parte legítima e indispensable en el tronco común del curriculum de un químico o ingeniero. Al igual que la espectroscopia NMR hace algunas décadas, el modelado molecular facilitará la comprensión de la química nueva, si se garantiza su difusión en las futuras generaciones. Sin embargo, existen obstáculos en el camino del futuro progreso, por un lado, los usuarios están confrontados con “demasiadas posibilidades” para hacer y desarrollar, por otro lado hay pocas guías del camino a seguir.

El problema fundamental es por supuesto, que las ecuaciones matemáticas que surgen de la aplicación de la mecánica cuántica a la química y las cuales finalmente gobiernan la estructura molecular y las propiedades no se pueden resolver. Es necesario hacer aproximaciones para darse cuenta que las ecuaciones se pueden resolver en realidad.

Severas aproximaciones pueden llevar a métodos en los cuales pueden ser ampliamente aplicadas pero no se obtiene información confiable. Aproximaciones menos drásticas pueden llevar a métodos que son más precisos y que son menos costosos para ser usados rutinariamente. En fin, no hay un método de cálculo que sea ideal para todas las aplicaciones y la última elección de un método específico se basa en el compromiso entre seguridad, precisión y el costo computacional.

2.6.1 Software ó programa Spartan

El software llamado **Spartan** es un programa computacional, que se usa cada vez más en la determinación de la geometría más estable energéticamente, que es amigable e interactivo. Que hace a la química computacional comprensible, ya que es una herramienta de acceso cómodo a un conjunto completo de modelos de mecánica molecular y química cuántica, que con frecuencia ocupan una posición de relevancia en la química moderna.

Los modelos construidos son representaciones en tercera dimensión de las moléculas y una ventaja importante de ello es que la representación es totalmente interactiva, la cual nos muestra desde distintas perspectivas el comportamiento interno y externo de la molécula, lo mismo que su reactividad e interacción con otros compuestos activos o con proteínas con las cuales el fármaco o ligando actúa terapéuticamente.

2.6.3 Principales características

Tareas que se pueden obtener

- Energías de conformación
- Geometrías de equilibrio
- Geometrías del estado de transición
- Confórmelo de menor energía
- Distribución de confórmeros
- Perfiles de energía
- Termoquímica
- Análisis de similitud.

Espectros

- Infrarrojos
- UV/vis
- RMN

Modelos gráficos

- Orbitales superficies, contornos, mapas
- Densidad superficies, contornos
- Densidad espín superficies, contornos
- Mapas potencial ionización localizado
- Potencial electrostático superficies, contornos, mapas
- Destacar regiones accesibles
- Animaciones
- Biopolímeros estilo cinta
- Planos definidos
- Mostrar enlaces hidrógeno.

2.6.2 Acoplamiento o Docking molecular

El modelado o docking viene de la palabra Dock = atracar, Docking = anclaje, así el docking molecular es el acoplamiento molecular de un fármaco o sustancia activa a un sitio receptor de la proteína, en donde dicho compuesto tiene acción terapéutica o curativa. Las técnicas basadas en modelado molecular y bioinformática tienen uso directo y extenso en áreas químicas y farmacéuticas, tales como la minimización de energía, la dinámica molecular, Monte Carlo y el análisis conformacional. Además, existen métodos que utilizan de manera auxiliar dichas técnicas, como es el caso del estudio sobre descubrimiento y diseño de nuevos fármacos.

El primer paso en la mayoría de los programas de desarrollo de fármacos es la identificación de compuestos guía. Un compuesto guía es una sustancia que demuestra ser activa en un determinado ensayo. A partir del o los compuestos guía, se llevan a cabo modificaciones químicas de dichos compuestos con el fin de aumentar la potencia y la especificidad, además de intentar disminuir los efectos colaterales y proveer un adecuado transporte a través de las membranas celulares. En este sentido juegan un rol importante las técnicas de modelado molecular/bioinformática estructural para entender el tipo de modificaciones a realizar y analizar adecuadamente los resultados. En la actualidad, se utilizan técnicas modernas de química combinatoria para generar grandes cantidades de moléculas para ser sometidas a screening o cribado. La gran mayoría de las interacciones entre un compuesto activo o fármaco llamado ligando y una macromolécula (receptor) son de tipo no enlazante (Van der Waals y Coulombicas) aunque existen casos de interacciones covalentes (formación de enlaces).

Los agonistas generan el mismo (o mayor) efecto que el sustrato natural mientras que los antagonistas son inhibidores del efecto del ligando natural. Los agonistas inversos generan un efecto que parece ser el opuesto al del agonista. Hacen que el receptor adquiera una forma inactiva.

En general los ligandos con mayor actividad sobre un receptor exhiben un alto grado de complementariedad.

Este grado de complementariedad entre ligando y receptor puede ser visualizado y analizado de forma adecuada al construir las superficies moleculares correspondientes.

Es deseable disponer de estructuras experimentales para el receptor bajo estudio.

El desarrollo de métodos para estudiar conformaciones de ligandos ha estimulado el interés en la influencia de las estructuras tridimensionales sobre su actividad química y biológica. Pocas veces posee un inhibidor enzimático (por ejemplo) si no es capaz de alcanzar a su blanco una vez dentro del organismo en cuestión. Un ejemplo pionero de estudio de relación estructura-actividad (QSAR) es el hallazgo de relación entre la potencia de narcóticos y los respectivos coeficientes de partición aceite-agua. Pero el primer uso de QSAR propiamente dicho fue realizado por Hansch, quien relacionó la actividad biológica de ciertas moléculas con características electrónicas e hidrofóbicas similares. El componente hidrofóbico modelaba de alguna manera la habilidad de las drogas por atravesar membranas biológicas. Una forma alternativa de la ecuación de Hansch se expresa en términos del parámetro π que es el logaritmo de la relación entre el coeficiente de partición de una molécula con un cierto sustituyente X y el coeficiente de partición de una molécula donde el sustituyente es H.

El docking es una de las principales actividades del diseño de fármacos basados en cribado, Screening Based Drug Design por sus siglas en inglés, SBDD.

Desde el punto de vista de la reactividad química, la idea subyacente a querer predecir las estructuras de complejos intermoleculares y medir la afinidad de ligandos por sitios de unión, es poder proponer cuáles serán los mejores ligandos o inhibidores, ya que cualquiera que sea la reacción a seguir, una mejor unión va a facilitar la conversión química posterior. El problema de docking como suele llamarse, tiene que ver con la generación y evaluación de estructuras plausibles para complejos moleculares, típicamente ligando-receptor. Normalmente, involucra una gran cantidad de grados de libertad, los seis grados de libertad de rotación y traslación de una molécula con respecto a otra y los grados de libertad conformacionales de cada molécula. Usualmente, los mejores resultados se obtendrán con ligandos con más bien baja flexibilidad (lo que supone limitadas opciones conformacionales) y en sitios de unión que no sean demasiado más grandes que los ligandos estudiados.

Los métodos de docking teórico pueden utilizarse para la identificación de compuestos guías sin determinar explícitamente farmacóforos (aunque también puede guiarse el docking utilizando información farmacofórica). Evidentemente que deberá conocerse la estructura del receptor (SBDD).

Los algoritmos de docking son algoritmos flexibles, donde se permite al ligando ir variando su estructura de manera de adoptar distintas conformaciones dentro del sitio activo. Estos algoritmos utilizan métodos de búsqueda conformacional, en el caso de Monte Carlo, se obtienen conformaciones al azar de los ligandos y luego se mide la energía de interacción con el receptor por mecánica molecular, MM. Finalmente se aplica el criterio Metropolis para aceptar o rechazar la orientación. En los algoritmos genéticos modificados para docking, los “cromosomas de algoritmo” no solamente codifican la conformación interna de los ligandos sino también la orientación de los mismos dentro del receptor. El “score” de cada estructura “dockeada” actúa como valor de selección o “fitness”.

El aspecto original del algoritmo de DOCK, un software muy usado, es la representación de la cavidad del receptor mediante un conjunto de esferas solapantes, en cuyos centros se harán coincidir los átomos del ligando. La idea es encontrar aquellas orientaciones del ligando que minimicen las diferencias entre las distancias entre los átomos del ligando y las distancias entre los centros de las esferas. Las orientaciones se pasan por un chequeo rápido para asegurar que no existen interacciones estéricas inaceptables y luego se aplica un campo de fuerza (de MM) para calcular el score de las mismas, minimizando (moviendo rígidamente la orientación) la interacción ligando-receptor. En primeras versiones, la minimización de energía se realizaba con el método simplex, en versiones posteriores se utiliza el de gradientes conjugados, “conjugate gradients”.

Se conservan aquellos modos de unión (orientaciones) que poseen un valor de energía (score) menor a cierto valor umbral. La función de scoring es simple y contiene los términos que corresponden a un potencial de Van der Waals (Lennard-Jones) y a un potencial electrostático (Coulomb). Se trata de entalpías de interacción y no de energías libres de unión. En el presente estudio, la función de scoring se reporta cuando el RMSD es menor a 2 Angstroms.

Las nuevas versiones de DOCK permiten realizar docking flexible, generando conformaciones de los ligandos. En cada punto de la rejilla, “grill” generada, y para cada átomo de prueba (sonda), se asigna un valor de interacción energética entre el átomo y la proteína, luego, la interacción de cada ligando con la proteína se va a calcular utilizando información de los 8 puntos de la grill más cercanos a cada átomo del ligando.

El uso de esta grill hace que el tiempo de cálculo sea proporcional a la cantidad de átomos del ligando y no de la proteína.

En el caso de utilizar el método Monte Carlo/simulated annealing, se hace lo acostumbrado en este tipo de simulaciones. El ligando se somete a un “random walk” en donde en cada paso se generan, al azar, los tres tipos de movimientos posibles:

- traslación del centro de masas
- rotación del centro de masas
- variación de las posiciones de los diedros rotables.

Valiéndose de la grill, se calcula la interacción para la conformación obtenida y se aplica el criterio de aceptación/rechazo de MC.

El carácter de “simulated annealing” que tiene la simulación supone que la misma está compuesta de una sucesión de etapas en donde la temperatura de simulación se va bajando paulatinamente. Es decir, se comienza a temperatura alta de manera de muestrear mejor (se aceptarán con mayor probabilidad los movimientos) el espacio conformacional accesible al ligando.

La variante de exploración que utiliza un algoritmo genético de tipo Lamarckiano supone dos contribuciones distintas. Por un lado, una estrategia estándar de algoritmos genéticos (lo que se denomina búsqueda global) para generar conformaciones posibles o candidatas. Y por otro lado un algoritmo de minimización de energía (búsqueda local) para mejorar las geometrías obtenidas por el algoritmo genético.

En términos genéticos, se dice que en este caso, el “fenotipo” (la búsqueda local) altera al “genotipo” (la búsqueda global), de ahí la referencia a Lamarck. Los “genes” en este caso deben codificar una variable de estado con información de traslación, orientación y conformación, lo que se implementa utilizando datos de tipo floating point.

Otra ventaja del software libre Autodock, es que la función de cálculo de score incluye, además de los términos estándar (electrostático y Van der Waals), un término de desolvatación del ligando y un término de pérdida de grados de libertad del ligando por la unión al receptor. Esto posibilita dar una estimación de la energía libre de interacción.

Las conformaciones que se reportan se agrupan en cúmulos o clusters, según un criterio de semejanza o desviación de la raíz cuadrática media, (RMSD) y para cada cluster se identifica la estructura representativa de menor energía.

El paso 1 del procedimiento puede evitarse si junto a los ligandos a dockear, se provee una base de datos conformacional de los mismos. Esto se puede hacer optimizando la geometría de la molécula, usando el software **Spartan**.

En el método “Alpha Triangle” lo que se hace es superponer tripletes de átomos en la conformación del ligando con tripletes de esferas (previamente definidas) en la cavidad de unión. El triplete de átomos en el ligando y en la cavidad se elige al azar. La variante “Triangle matcher” es muy similar a la Alpha Triangle sólo que la elección de los tripletes a acoplar es sistemática y no aleatoria.

El método de Proxy triangle se utiliza solamente para ligandos medianos o grandes, donde existen una mayor cantidad de conformaciones.

La función Affinity DG aporta la contribución entálpica a la energía libre de unión mediante una combinación lineal de factores que representan cada uno un tipo de interacción no enlazante distinta: enlace de H, iónica, hidrofóbica, metálica, etc. Por último, la función

Alpha HB scoring consta de la combinación lineal de dos términos solamente. Uno de ellos mide el ajuste geométrico al sitio (interacción atractiva y repulsiva) mientras que el otro mide los enlaces de H. Se detectan los posibles sitios de interacción por enlace de H del ligando y se evalúa la región vecina de cada sitio en busca de grupos consistentes en el receptor.

La identificación del modo de ligando vinculante se hace evaluando iterativamente un número de soluciones candidatas (conformaciones de ligando) y estimando la energía de sus interacciones con la macromolécula. Las soluciones con puntuaciones más altas se devuelven para un análisis adicional.

El Docker Virtual Molegro (MVD) es un programa integrado para estudiar y predecir cómo interactúan los ligandos con macromoléculas.

El MVD requiere de una estructura tridimensional de ambos, proteína y ligando (usualmente derivada de experimentos en rayos X/NMR o modelos homológicos). El MVD realiza el docking ó acoplamiento de ligandos flexibles, así la geometría óptima del ligando será determinada durante el docking.

El efecto deseable en un nuevo principio activo es el control de los procesos bioquímicos alterados en un paciente, o bien el evitar que un organismo patógeno realice sus procesos invasivos naturales. En este último caso, lo ideal es seleccionar como molécula blanco a una proteína que sea indispensable para la supervivencia del organismo patógeno y que esté ausente en el huésped; así, un fármaco que se una a esa proteína e impida su correcto funcionamiento tiene posibilidades de ser un buen antibiótico.

La identificación de moléculas blanco con estas características es difícil, ya que en muchas ocasiones, la proteína en cuestión existe simultáneamente en el huésped y en la especie patógena y es entonces necesario que el ligando, o principio activo por desarrollar, se fije exclusivamente a la proteína del patógeno (Gómez-Puyou A,(1995)). En los casos donde la enfermedad que desea tratarse se debe al funcionamiento inapropiado de la maquinaria molecular del propio paciente, es preciso indagar el tipo y modo de acción particular de las enzimas involucradas en la disfunción y elegir como blanco de estudio la molécula que esté mejor caracterizada.

La elección del sujeto de estudio puede validarse a través de experimentos que permitan conocer el efecto de la modificación funcional del blanco (o incluso, de la ausencia total del mismo) sobre un microorganismo. Cuando se trabaja con proteínas, y particularmente con enzimas como sustancias blanco, deben considerarse tres factores importantes: la especificidad o selectividad molecular de la enzima, la afinidad o fuerza con que se fija el sustrato a ella, y la geometría del sitio de unión.

Muchos principios activos son inhibidores de la función de una enzima a través de un bloqueo efectivo del sitio activo o de las zonas coadyuvantes de la catálisis. En estos casos es deseable desarrollar compuestos que se unan con gran firmeza y alta especificidad a los sitios funcionales, y para desarrollar un fármaco con ambas características es imprescindible conocer con detalle la geometría del sitio de unión.

Este método de reconocimiento molecular o docking, es ampliamente utilizado alrededor del mundo por compañías privadas y por instituciones de investigación pública para el hallazgo de nuevos compuestos con efectos terapéuticos. Si bien la técnica del docking representa una alternativa a los procedimientos de ensayo masivo de laboratorio,

también, y de manera más importante, esta técnica ha sido utilizada en el diseño de fármacos, tanto para llevar a cabo las etapas de identificación del sitio de unión sobre el blanco, como las de construcción y evaluación de los complejos moleculares resultantes.

2.6.3 Simulación del reconocimiento molecular.

Durante esta etapa es indispensable emplear un criterio numérico para distinguir cuál de todas las disposiciones probadas resulta ser la más adecuada, es decir, la que adoptaría el ligando si tuviera acceso al sitio de unión; a este criterio le llamaremos puntaje. Una vez establecidas las condiciones descritas anteriormente, el proceso para probar orientaciones se repite para cada ligando de la base de datos, ésta es la etapa que consume la mayor cantidad de tiempo de cálculo. Finalmente, el programa de cómputo ordena los diferentes compuestos probados de acuerdo al puntaje de su orientación óptima y entonces, se puede analizar estos resultados y planear experimentos para validar los resultados generados en la simulación por computadora.

A continuación se discutirán algunos detalles de cada una de las etapas descritas para el proceso de docking, donde se utilizará como ejemplo en las figuras a una proteína indispensable en la ruta de la glucólisis, la triosafosfato isomerasa. (Maldonado, E. 1998).

Figura

4.

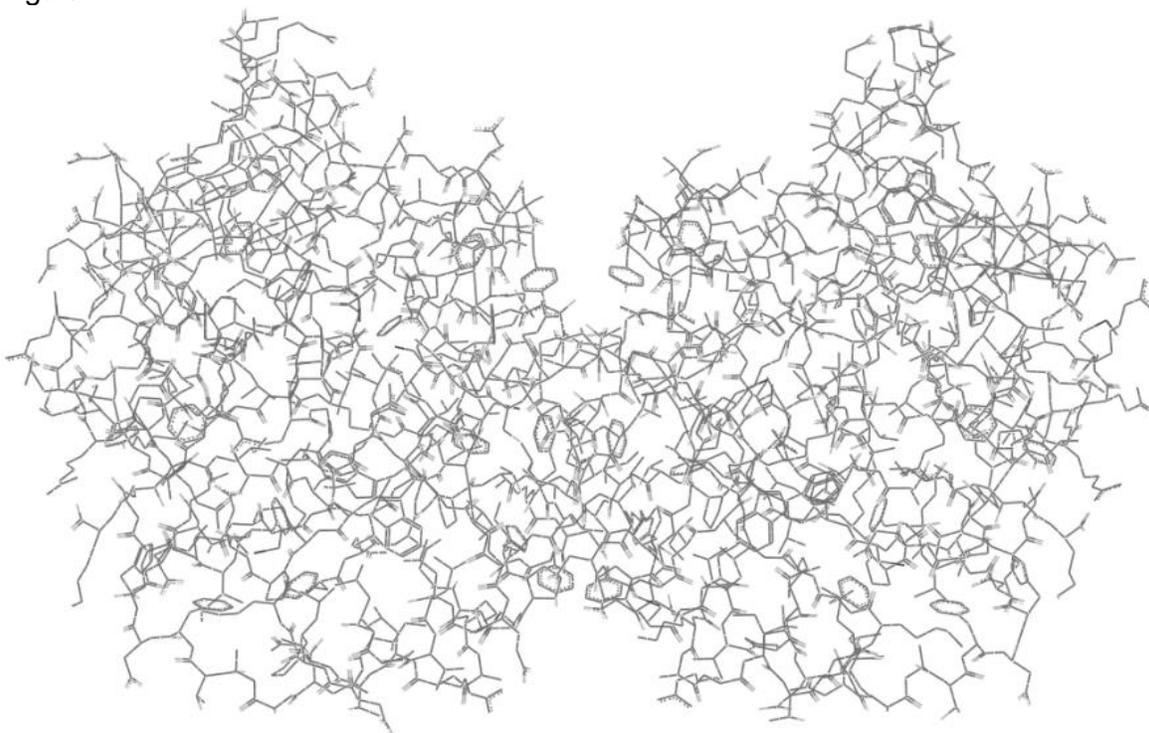


Figura 4. Estructura tridimensional de la proteína 3P98 usada como blanco o receptor en nuestro estudio.

Para un estudio de docking es indispensable que la estructura tridimensional del blanco haya sido previamente determinada, ya sea por difracción de rayos X (Figura 4) o por resonancia magnética nuclear. La fuente principal de estructuras tridimensionales de proteínas es el PDB (Protein Data Bank), de acceso gratuito a través de la red en la dirección www.pdb.org. Sin embargo, en la mayor parte de los casos los archivos depositados en esta base de datos no pueden ser utilizados directamente en estudios de diseño de fármacos, sino hasta realizar algunas adecuaciones.

Aunque cada caso tiene sus peculiaridades, puede generalizarse que las modificaciones más comunes que deben hacerse a estas moléculas son: la adición de los átomos de hidrógeno, que representan casi la mitad de los átomos totales en una proteína, y cuya posición normalmente no es detectada por la técnica de difracción de rayos X; la remoción de las moléculas de agua que están unidas a la superficie de la proteína, y que con gran frecuencia ocupan el sitio de unión; la eliminación de ligandos presentes durante la cristalización y determinación de la estructura tridimensional de la macromolécula; y finalmente, el modelado de las regiones que no pudieron ser determinadas experimentalmente o que resultaron ser ambiguas.

Para la mayoría de los esquemas de evaluación numérica durante el docking es imprescindible conocer la carga eléctrica que corresponde a cada átomo del receptor (y del ligando, como veremos más adelante). Una forma sencilla de establecer estas cargas es asignar, de acuerdo con el pH en la simulación, carga positiva a los átomos de nitrógeno de las cadenas laterales de arginina, lisina e incluso histidina; negativa a cada átomo de oxígeno de los grupos carboxilato; y neutra al resto de los átomos. Sin embargo, este procedimiento no considera los efectos electrostáticos que pueden sufrir los átomos con cargas parciales; por ejemplo, el oxígeno en un grupo carbonilo de la cadena principal puede llegar a tener una carga de hasta -0.4. Para incluir estos efectos en la simulación pueden consultarse valores promedio calculados para cada uno de los átomos de los aminoácidos que constituyen a las proteínas (Weininger, D. (1998)) y que normalmente representan una buena opción inicial en la asignación de cargas parciales.

La superficie de una proteína es irregular, con una serie de protuberancias y cavidades que forman un relieve complejo. Generalmente, es en estas cavidades donde las moléculas orgánicas o fármacos pueden unirse. Sin embargo, debido al tiempo de cálculo que implica, no es práctico probar el conjunto de las moléculas de la base de datos en todas las orientaciones posibles sobre cada uno de los sitios potenciales de unión. Por ello es necesario seleccionar una sola de esas cavidades para su estudio. Si la proteína es una enzima o un receptor, la elección directa es analizar el sitio activo o de reconocimiento; ya que cualquier molécula que pueda unirse a este lugar impedirá o forzará que la proteína realice adecuadamente su función biológica.

Es necesario enfatizar en este momento, que la unión de un ligando en una de estas zonas no necesariamente afectará la función de la enzima.

Una vez preparada la molécula blanco cuya función se desea alterar, y ya seleccionada la cavidad o sitio de unión sobre ella, es necesario realizar una búsqueda de las moléculas orgánicas más afines a este sitio que logren actuar como ligandos potentes.

Muchas de las moléculas contenidas en las bases de datos que provienen de empresas privadas, poseen las características más comunes observadas en los medicamentos conocidos (Tabla 3), situación que no es compartida por las fuentes de información públicas.

En esta última tarea, debe considerarse que las moléculas pequeñas poseen una mayor variedad de tipos de átomo y grupos funcionales que las proteínas conocidas. Por ello, en vez de emplear tablas de valores promedio para la asignación de cargas, se utiliza un algoritmo basado en cálculos de electronegatividad de los átomos involucrados en cada enlace químico (Gasteiger J y Marsili M. (1980)). Debido a que la serie de etapas de preparación debe realizarse sobre cada una de las moléculas que integran las enormes

bases de datos de compuestos químicos, se han desarrollado paquetes de cómputo que realizan esta ardua tarea de forma automática y eficiente (TORVS. (2010)).

Tabla 3. Propiedades moleculares de fármacos potenciales.

| Propiedades moleculares de fármacos potenciales | | |
|---|--------------|--------------|
| Propiedad | Valor mínimo | Valor máximo |
| Donadores de puentes de Hidrogeno | 0 | 5 |
| Aceptores de puentes de Hidrogeno | 0 | 10 |
| Carga eléctrica formal | -2 | +2 |
| Numero de enlaces con rotación libre | 0 | 8 |
| Masa molar (Da) | 200 | 500 |
| Número de átomos pesados | 20 | 50 |
| Hidrofobicidad (<i>LogP</i>) ^a | -2 | 5 |
| <i>(LogP)</i> ^a : Se define como el coeficiente de partición entre una fase orgánica y una acuosa. | | |

Simulación de la formación de complejos

La tarea de acomodar una molécula orgánica en una cavidad de la proteína blanco no es sencilla. Como analogía, podría pensarse en estacionar un automóvil en un sitio estrecho orientándolo al azar en diferentes posiciones, sólo que el caso molecular es tridimensional y no hay información previa de cuál es la colocación correcta. Justamente ésta es la razón para desarrollar esquemas numéricos de puntaje para cada orientación (Clark RD. (2002).)

En el más sencillo de estos esquemas se determina el número de contactos totales que pueden establecerse entre cada pareja de átomos del sitio de unión y del ligando, en una orientación particular de éste. Se considera formado un contacto cuando un átomo del ligando y otro del sitio de unión se encuentran a una distancia menor o igual a la de un valor umbral (v. g. 3 Å). Si la forma geométrica del ligando es complementaria a la de la cavidad (Figura 5), una orientación adecuada generará un gran número de contactos y se le asignará un puntaje alto; por supuesto que debe haber penalizaciones por el traslape de cualquier átomo del ligando con los de la proteína para evitar así interacciones no realistas (Figura 6).

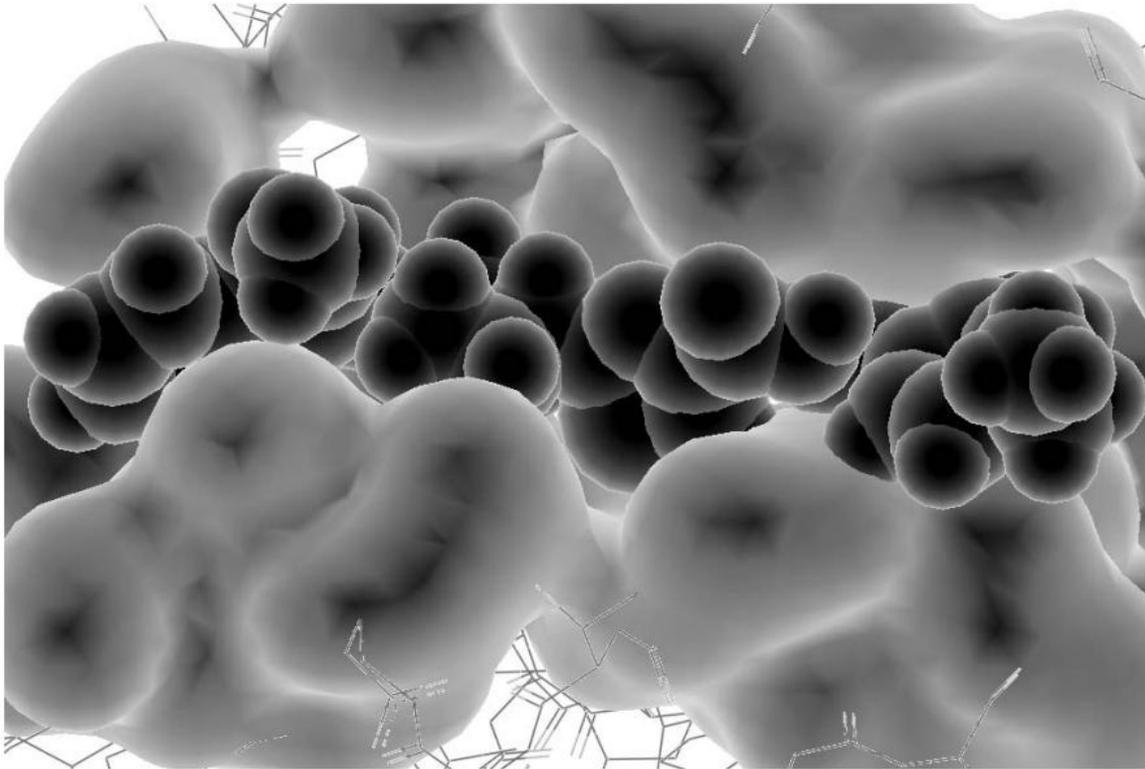


Figura 5. Detalle de la interacción ligando-proteína donde puede apreciarse la complementariedad geométrica de la molécula orgánica (esferas oscuras) y los huecos de la cavidad.

Aunque este criterio de evaluación es bueno para detectar compatibilidad geométrica, no considera la naturaleza de los átomos que interactúan, es decir, otorga el mismo peso a tener dos átomos cercanos con carga del mismo signo que con carga opuesta o sin ella. La intención es emplear ecuaciones matemáticas de la física clásica que determinen la energía no covalente de la unión blanco-ligando como función de las distancias atómicas entre moléculas. Por ejemplo, para calcular la energía electrostática entre dos átomos cargados puede utilizarse la ecuación de Coulomb:

$$E = k \cdot \frac{q_B \cdot q_L}{d_{BL}}$$

Donde q_B y q_L son las cargas parciales de un átomo del blanco y uno del ligando, respectivamente, y d_{BL} es la distancia entre ellos. Valores negativos, generados por cargas con signo opuesto, indican interacciones favorables, y viceversa.

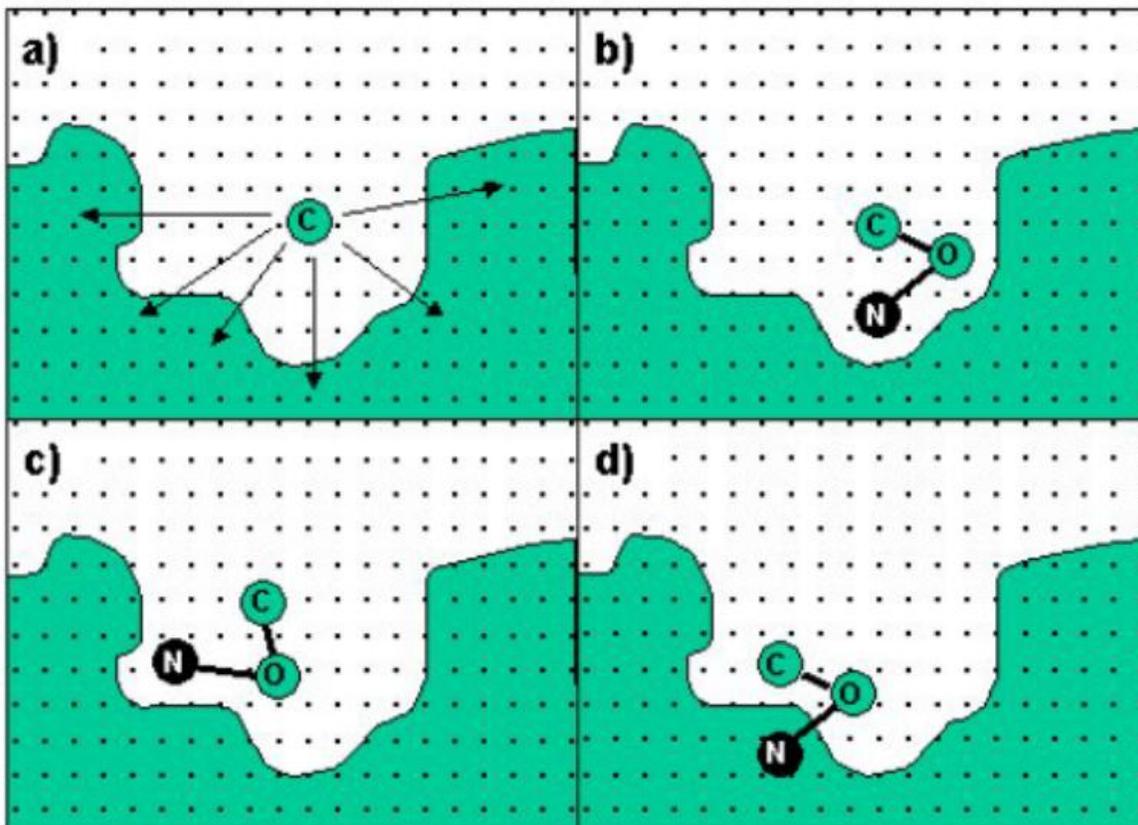


Figura 6. a) Evaluación de la interacción entre un átomo de carbono en un punto de la malla y el sitio de unión, la evaluación se repetirá para cada punto de la malla y para cada tipo de átomo. b) Las interacciones del átomo de carbono (y de los demás) de la molécula ya fueron precalculadas. La energía de interacción es la suma de esos valores. c) Una orientación diferente de la misma molécula requiere los valores precalculados para los átomos en los nuevos sitios de la malla. d) Ejemplo de interacción no realista donde parte del ligando se traslapa sobre la molécula blanco. El átomo de nitrógeno recibe una penalización alta.

De esta forma, como es de esperarse, la menor distancia entre átomos genera la mayor energía de interacción. Para estimar las relaciones de tipo van der Waals existe una expresión matemática típicamente descrita por:

$$E = \frac{A}{d_{BL}^{12}} - \frac{B}{d_{BL}^6}$$

Donde A y B representan los valores de constantes que dependen de la naturaleza de los dos átomos que establecen la interacción. En los cálculos de docking es común emplear más de un criterio de asignación de puntaje para evaluar de manera más completa las diferentes orientaciones que adquiere cada una de las moléculas en la cavidad del blanco. Es importante mencionar que los cálculos de energía, debido tanto a las contribuciones electrostáticas como a las de tipo Van der Waals, deben repetirse para cada pareja de

átomos que intervienen en el reconocimiento molecular. Si el ligando tuviera 40 átomos y el blanco 8000, el número de contactos que debería calcularse es de más de 300,000 para cada una de las orientaciones posibles del ligando.

También puede reducirse el número de orientaciones del ligando a través de una selección y evaluación de los arreglos tridimensionales que produzcan los mejores contactos con las paredes de la cavidad (Rarey M. (1996), Kramer B, (1999)).

Una estrategia más consiste en calcular la energía que tendría un átomo de cada tipo representativo de las moléculas orgánicas (carbono, oxígeno, nitrógeno, azufre, etc.) que de manera independiente se ubicara en lugares definidos por una malla dentro de la cavidad (Figura 7).

Los resultados obtenidos al finalizar los cálculos son dos archivos por cada criterio de puntaje empleado. Un archivo contiene las coordenadas cartesianas de cada átomo del ligando en la mejor orientación dentro de la cavidad del blanco (Figura 7). El otro archivo incluye los nombres o códigos de cada uno de las poses, ordenados de acuerdo con el puntaje obtenido para su orientación óptima.

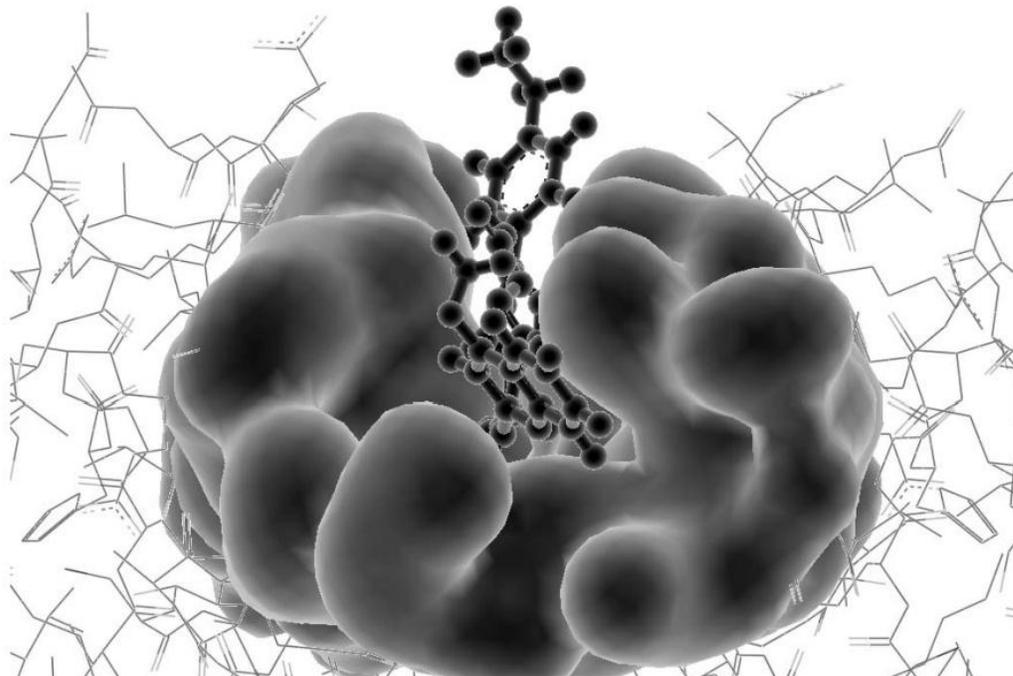


Figura 7. Representación tridimensional generada a partir de las coordenadas cartesianas de los átomos del sitio de unión y del ligando en su orientación óptima.

3. PROBLEMA

Debido a la carencia de conocimiento sobre la forma de actuar de las especias agregadas a los alimentos como condimentos, se estudiarán los compuestos biológicos activos del clavo de olor mexicano para ayudar a comprender cómo es que éstos ayudan a la salud en el ser humano.

4. HIPOTESIS

Si los compuestos activos de las plantas o especias usadas en alimentos, presentaran propiedades biológicas novedosas entonces podrían tener un efecto benéfico en la salud del ser humano en dosis adecuadas.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Obtener aceite esencial de clavo de olor mexicano a través de una destilación por arrastre de vapor, para establecer un modelo molecular computarizado de los compuestos biológicos activos, caracterizando a la molécula fisicoquímicamente para explicar su actividad biológica y acción terapéutica

OBJETIVO PARTICULAR 1

Extraer el aceite esencial del clavo de olor mexicano mediante una destilación por arrastre de vapor, para evaluar las características biológicas, que lo hacen atractivo en usos culinarios, farmacológicos y medicinales

OBJETIVO PARTICULAR 2

Determinar y caracterizar el compuesto biológico activo principal en el clavo de olor mexicano, a través de sus propiedades fisicoquímicas, para entender la razón por la cual este producto de uso cotidiano contribuye en la conservación de alimentos.

OBJETIVO PARTICULAR 3

Realizar un modelado molecular y cálculos teóricos del compuesto principal del clavo de olor mexicano, utilizando el software *Spartan '02* para *Windows* y *Molegro* en el docking o acoplamiento molecular, y así poder caracterizar a dicho compuesto y su interacción en los sitios activos de las proteínas, explicando su interacción y actividad en el efecto antiinflamatorio, entre otros resultados.

OBJETIVO PARTICULAR 4

Analizar la actividad biológica del extracto oleoso del clavo de olor mexicano, por medio de pruebas biológicas para comprobar su actividad bactericida.

6. METODOLOGIA

6.1 Metodología experimental

Extracción del aceite esencial

6.1.1 Materiales y equipos

- ✓ Matraz de bola 1L
- ✓ Condensador
- ✓ Mangueras y tapones
- ✓ Mechero Bunsen o Mantilla
- ✓ Espátula
- ✓ Matraz Erlenmayer 500 ml
- ✓ Termómetro
- ✓ Embudo de separación 500ml
- ✓ Probeta de 25ml
- ✓ Balanza
- ✓ Aro para embudo de separación

6.1.2 Reactivos

- ✓ 100 g de clavos de olor
- ✓ Agua destilada
- ✓ Sulfato de sodio anhídrido (Na_2SO_4)

6.1.3. Procedimiento de la destilación por arrastre de vapor por el método directo

Se ensambló el equipo de destilación con el matraz kitasato de 1L, en el cual se colocaron 100g de clavo que fueron previamente hidratados en agua destilada. Se adicionaron alrededor de 400ml de agua y se inició un calentamiento hasta alcanzar la ebullición. La mezcla se destiló por arrastre de vapor y se repuso el agua evaporada para evitar que se reseca la materia vegetal.

El destilado se recogió en un embudo de separación de 500ml, hasta que fue evidente la ausencia de gotas de aceite y luego de haber recogido un volumen aproximado de 500ml.

Se colocó de costado el embudo por unos segundos y se dejó en reposo colocándolo en un aro para permitir que el aceite precipitara, después se llevó a cabo un secado del aceite esencial.

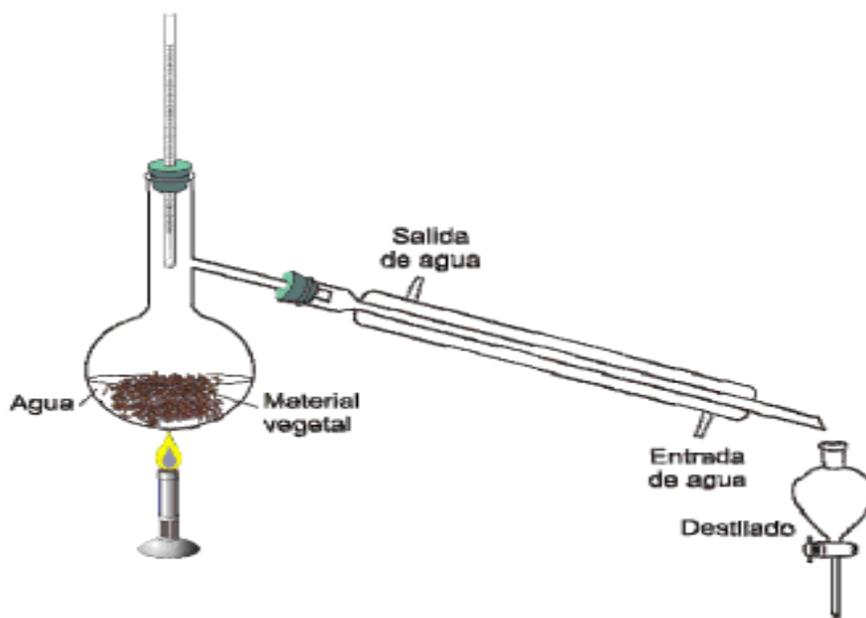


Figura 8. Destilación por arrastre de vapor

6.1.4. Secado del aceite esencial

El aceite obtenido en la destilación, se obtuvo desde el embudo de separación y se recogió en un matraz Erlenmayer, luego fue secado con sulfato de sodio anhidro, agregando una cantidad suficiente de esta sal para que el aceite quedara traslúcido y brillante. Después se transfirió a un tubo Eppendorf para medir su volumen y calcular su rendimiento en ml o g de aceite por g de clavos, utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Rendimiento} \left(\% v \frac{\text{aceite}}{g} \text{ de clavo} \right) = \frac{ml \text{ aceite}}{g \text{ clavo}} \times 100$$

$$\text{Rendimiento} \left(\% g \frac{\text{aceite}}{g} \text{ clavo} \right) = \frac{ml \text{ aceite} \times \rho \text{ aceite}}{g \text{ clavo}} \times 100$$

6.2. Metodología de pruebas biológicas

Antibiograma

6.2.1. Materiales para el medio de cultivo

- ✓ Agar Mueller Hinton
- ✓ Espátula
- ✓ Balanza
- ✓ Matraz Erlenmayer
- ✓ Agua destilada
- ✓ Vidrio de reloj
- ✓ Mechero Bunsen

6.2.2. Materiales para la prueba de sensibilidad

- ✓ Agar Mueller Hinton en caja Petri
- ✓ Discos de inoculación
- ✓ Incubadora
- ✓ Solución salina estéril
- ✓ Solución con bacteria
- ✓ Vernier
- ✓ Hisopos estériles

6.2.3. Procedimiento de la prueba de sensibilidad (Antibiograma)

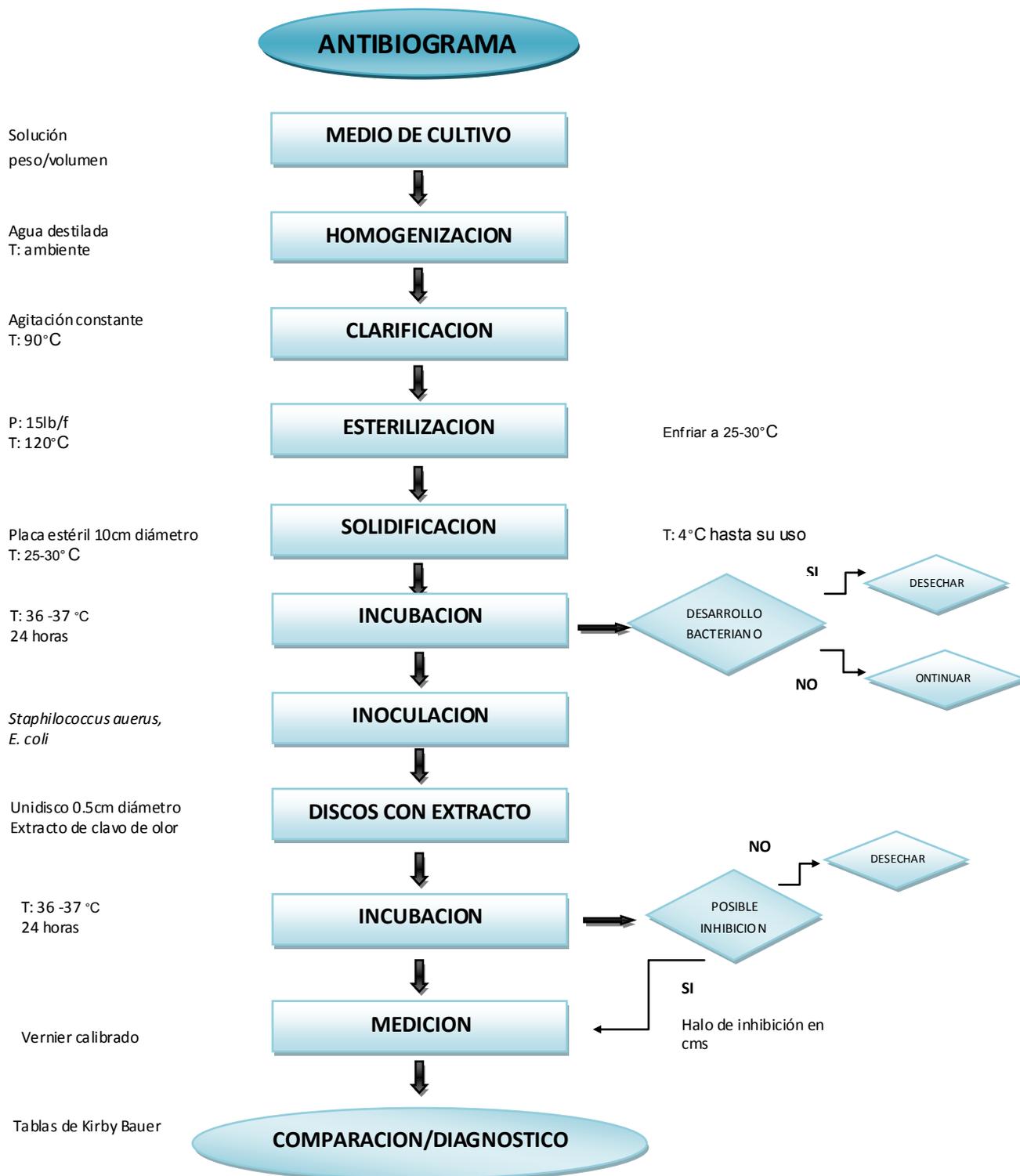


Figura 9. Diagrama de flujo de procedimiento de prueba de sensibilidad (antibiograma).

6.3 Metodología de cálculos teóricos

En el presente trabajo se emplearon métodos semiempíricos, los cuales hacen uso de parámetros obtenidos a partir de datos experimentales con el fin de simplificar el cálculo mediante un método computacional aplicado a un sistema molecular grande.

Los métodos empleados en la química computacional se caracterizan por la combinación de un método teórico con un conjunto de funciones base.

- Los programas de cálculo son un conjunto de diversos procedimientos teóricos llamados generalmente niveles de teoría y son descritos con acrónimos como:
 - HF Hartree- Fock en campo autoconsistente.
 - B3LYP Método híbrido.
- Otro componente es el conjunto de funciones base del cálculo o base simplemente, que permite obtener una representación de los orbitales moleculares de un sistema químico.

El método Hartree- Fock fue utilizado para describir a los electrones del sistema en una función mono electrónica observando el movimiento independiente de cada electrón para obtener la función de onda empleando HF.

Este operador tiene términos adicionales debido a que la energía del átomo contiene integrales de intercambio y de Coulomb en la que se describe el movimiento del electrón en el campo de todos los núcleos.

La función Hartree- Fock es una determinante de Slater de spin de orbitales, por tanto este método trata de minimizar la energía con la búsqueda de los orbitales

6.4 Metodología de modelado molecular

El modelo de geometría molecular y análisis conformacional de la molécula de Eugenol se realizó con el programa Spartan '08 para Windows.

En un nivel vertical o "single point" se determinó la energía para la especie catiónica y aniónica de la molécula, para obtener descriptores globales mediante el método de diferencias finitas de la TDF, como son potencial de ionización (I), afinidad electrónica (A), electronegatividad (χ), potencial químico (μ), dureza (η), y electrofilicidad global (ω).

De igual manera, a la molécula optimizada de menor energía se le determinó a nivel B3LYP/6-311G+ (d, p) propiedades como potencial electrostático molecular, orbitales moleculares HOMO y LUMO.

Se realizó un cálculo de las frecuencias vibracionales a la molécula optimizada en fase gas obteniéndose los espectros de IR y espectroscopia de Raman.

Una vez obtenida la molécula optimizada que es nuestro ligando, se llevó a interaccionar con las proteínas en donde se sabe que hay acción terapéutica, por ejemplo: la oxidasa y la prostaglandina (PGH) sintasa, entre otros.

Se realizó una búsqueda en la base de datos del Protein Data Bank en donde se cuenta con más de 100 mil estructuras cristalinas de proteínas, ya estudiadas por medio de RMN y refracción de Rx. De allí se obtuvo la proteína representativa de la oxigenasa PGH en su estructura tridimensional, junto con las coordenadas de los átomos que la conforman, en ellas existen sitios activos de interacción de mínima energía, estos sitios son llamados huecos o pockets.

Debido a que puede existir más de una proteína con la que el ligando puede interaccionar, el estudio se realizó con la proteína más simple y después con la más compleja, se seleccionó la que representaba menor energía y distancias más cortas entre el ligando y los residuos de aminoácidos con los que interactúa, y que forman la proteína.

6.5 Metodología del Docking

Una primera etapa en el complejo proceso del desarrollo de fármacos es la elección de la proteína de estudio, también conocido como molécula blanco, sobre la que actuará el medicamento para lograr el efecto terapéutico deseado.

La siguiente etapa del proceso en el diseño es la identificación de moléculas líder, que son aquellos compuestos que muestran tener una actividad significativamente alta sobre el blanco seleccionado. En este paso se generan derivados de las moléculas líder, y se determina su estructura tridimensional, así como la relación que existe entre la actividad biológica que manifiestan y algunas de sus propiedades moleculares; tarea que se lleva a cabo con el empleo de la técnica conocida como QSAR (siglas en inglés para Quantitative Structure-Activity Relationship)

La tercera etapa, que es la parte medular del método, consiste en un algoritmo de computadora que toma cada uno de los ligandos de la base datos y lo coloca dentro del sitio de unión en una gran cantidad de orientaciones. En la Figura 10 se muestra un esquema de las etapas de simulación del Docking de forma simplificada.

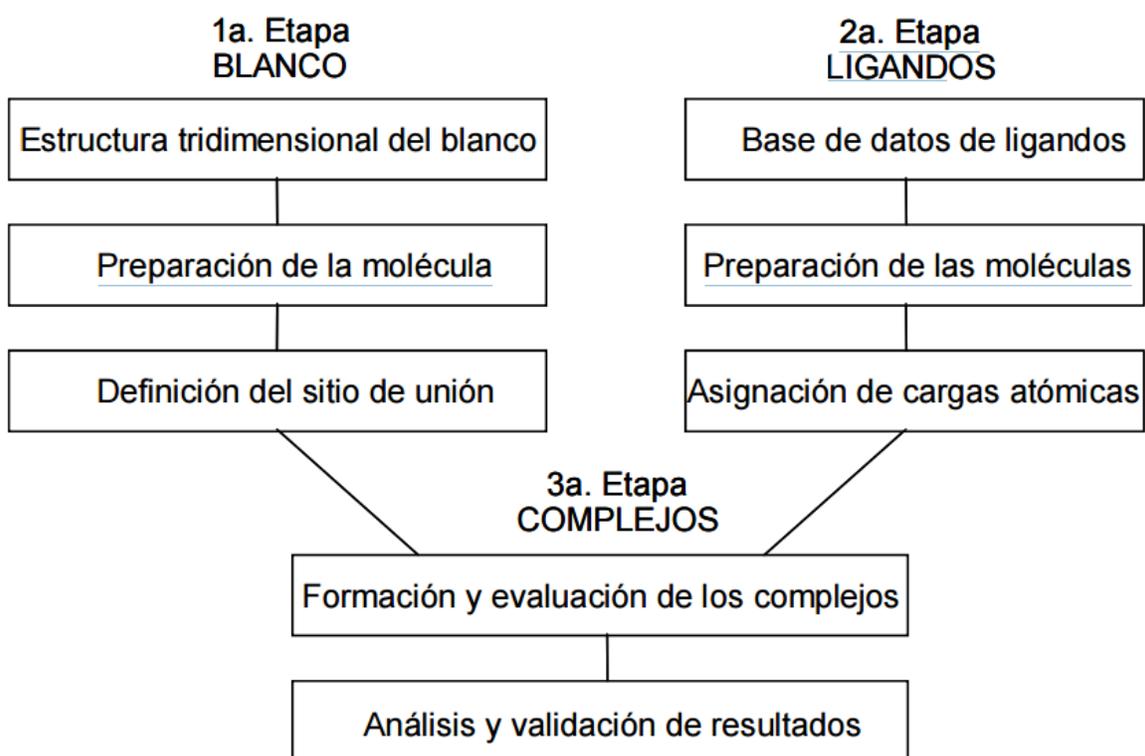


Figura 10. Diagrama simplificado de las etapas de simulación del reconocimiento molecular o docking.

7. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1 Extracción del aceite esencial

Se realizó la extracción del aceite esencial de clavo de olor, por medio de una destilación de vapor, posteriormente se hizo un secado para eliminar agua contenida en el aceite y emulsificada en el proceso de destilación, con el uso de las siguientes ecuaciones se calculó el rendimiento de la extracción, mostrándose el resultado en %.

$$\text{Rendimiento} \left(\%v \frac{\text{aceite}}{g} \text{ de clavo} \right) = \frac{\text{ml aceite}}{g \text{ clavo}} \times 100$$

$$\text{Rendimiento} \left(\% g \frac{\text{aceite}}{g} \text{ clavo} \right) = \frac{\text{ml aceite} \times \rho \text{ aceite}}{g \text{ clavo}} \times 100$$

$$\text{Rendimiento} = \frac{3.2 \text{ml aceite} \times 1.03 \text{g/cm}^3 \text{ aceite}}{100 \text{g clavo}} \times 100$$

Rendimiento de la extracción del aceite esencial de clavo de olor

| |
|--------------|
| 4.12% |
|--------------|

7.2. Pruebas de sensibilidad

Se realizó un antibiograma con el extracto de clavo de olor en un medio de cultivo Mueller Hinton el cual, es rico en proteínas y carbohidratos, lo que contribuye a un adecuado desarrollo de los microorganismos que se desean estudiar.

El extracto se enfrentó a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, los cuales, fueron proporcionados por el departamento de microbiología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Para impregnar los unidiscos utilizados para la prueba de sensibilidad, se utilizó una sola concentración de extracto (100%) la cual fue obtenida de la destilación por arrastre de vapor, eliminando impurezas por medio de un filtro de jeringa estéril de la marca Corning y agregando 10µg a cada disco.

Se realizaron dos repeticiones para cada una de las bacterias y posteriormente se midió el halo de inhibición con un vernier calibrado y con la caja de petri cerrada para el medio de cultivo, que tuvo resultados satisfactorios, mostrándose los resultados en la Tabla 3.

Tabla 4. Resultados del halo de inhibición de eugenol vs *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

| <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>E.coli</i> |
|-------------------------------------|-------------------------|
| Halo de inhibición (mm) | Halo de inhibición (mm) |
| 10 | No presente |
| 11 | No presente |

7.2.1. E.coli

Es el principal organismo anaerobio facultativo del sistema digestivo. Se trata de una entero bacteria que se encuentra generalmente en los intestinos animales, y por ende en las aguas negras, pero se lo puede encontrar en multitud de ambientes, dado que es un organismo ubicuo. En individuos sanos, es decir, si la bacteria no adquiere elementos genéticos que codifican factores virulentos, la bacteria actúa como un comensal formando parte de la flora intestinal y ayudando así a la absorción de nutrientes, Figura 12.

7.2.2. Staphylococcus aureus

Es una bacteria anaerobia facultativa, gram positiva, productora de coagulasa, catalasa, es un coco inmóvil y no esporulado que se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo. Puede producir una amplia gama de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de las mucosas relativamente benignas, tales como foliculitis, forunculosis o conjuntivitis, hasta enfermedades de riesgo vital, como celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis o neumonía.

En la Figura 11 se muestra el cultivo de *Staphylococcus aureus* el cual se enfrentó al extracto de Eugenol dando como resultado un halo de inhibición de 10 y 11 mm respectivamente después de 24 horas de incubación.



Figura 11. Medio de cultivo después de 24 horas de incubación con discos impregnados de extracto oleoso de clavo de olor y *Staphylococcus aureus*.



Figura 12. Medio de cultivo después de 24 horas de incubación con discos impregnados de extracto oleoso de clavo de olor y *E. coli*.

De acuerdo a las tablas de control del método de Kirby Bauer el extracto se aproxima a los datos bibliográficos de la Estreptomina, la cual a una concentración de $10\mu\text{g}$ tiene un diámetro de zona de inhibición de 14-22 mm como se observa en el apéndice 1.

7.3. Modelo molecular

Por medio de técnicas de modelaje molecular y usando el Spartan '08 para Windows se realizó la construcción de la molécula de Eugenol. Debido a las características del programa computacional de modelos moleculares, se realizó el cálculo de los parámetros geométricos del Eugenol y se optimizó su geometría como primer paso.

Con el proceso de optimización se determinó la estructura molecular con mayor estabilidad, esta estructura es fundamental ya que con ayuda de ésta, se complementa la comprensión de los procesos biológicos y químicos esenciales.

El aspecto tridimensional que se obtiene con Spartan es de suma importancia en disciplinas como la Bioquímica, donde el tamaño, la forma y la polaridad de las moléculas determinan su función biológica y terapéutica.

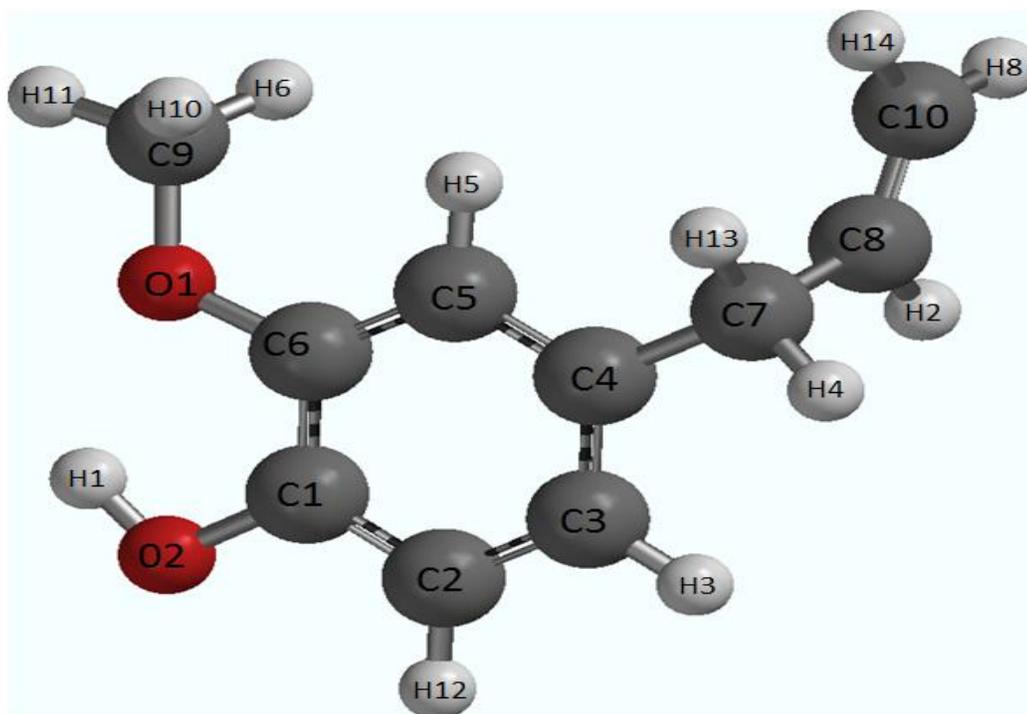


Figura 13. Molécula de Eugenol optimizada.

7.3.1 Parámetros Geométricos

En la tabla 5 se puede observar las distancias de enlace de la molécula de Eugenol, el enlace $C_8 = C_{10}$ presenta la distancia más corta lo cual es característico para un doble enlace.

Tabla 5. Ángulos de distancia entre átomos de la molécula de eugenol.

| Átomo | Angulo (Å) |
|-----------------|------------|
| C1 – C2 | 1.388 |
| C2 – C3 | 1.394 |
| C3 – C4 | 1.403 |
| C4 – C5 | 1.408 |
| C5 – C6 | 1.395 |
| C6 – C7 | 3.816 |
| C7 – C8 | 1.503 |
| C8 – C9 | 5.568 |
| C8 = C10 | 1.340 |
| C9 – C10 | 5.798 |
| O1 – C9 | 1.423 |
| O1 - C6 | 1.372 |
| O1 – C5 | 2.468 |
| O1 – C10 | 6.078 |
| O1 – C3 | 4.171 |
| O2 – C1 | 1.369 |
| O2 – C2 | 2.366 |
| O2 - C6 | 2.399 |
| O2 – C10 | 7.341 |
| O2 – C4 | 4.152 |

En la Figura 14 se presentan los ángulos entre átomos del eugenol de igual forma, en la tabla 6 se muestran los ángulos diedros de los átomos de carbono y oxígeno de la molécula de Eugenol.

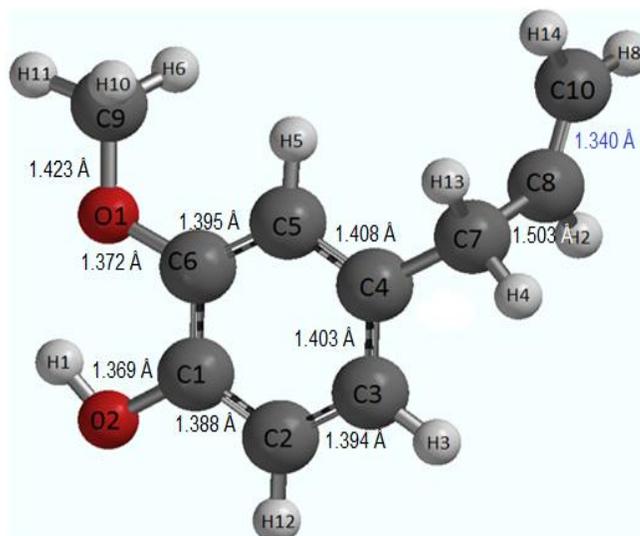


Figura 14. Molécula de Eugenol con ángulos entre átomos de carbono y oxígeno.

Tabla 6. Ángulos diedros entre átomos de la molécula de eugenol.

| Átomos que forman el ángulo diedro | Ángulo diedro (°) |
|------------------------------------|-------------------|
| C1 - C2 - C3 - C4 | 0.30 |
| C4 - C5 - C7 - C8 | 112.82 |
| C4 - C7 - C8 = C10 | 120.61 |
| C6 - C1 - C2 - C3 | 0.12 |
| C6 - C5 - C4 - C7 | 179.26 |
| C6 - C5 - C7 - C3 | 0.32 |
| C9 - O1 - C6 - C5 | 2.23 |
| O1 - C6 - C5 - C4 | -179.90 |
| O1 - C8 - C7 - C4 | 27.71 |
| O1 - C9 - C6 - C3 | 178.94 |
| O1 - C9 - C6 - C2 | 22.97 |
| O1 - C9 - C6 - C1 | 3.78 |
| O2 - C1 - C4 - C7 | 101.26 |
| O2 - C1 - C3 - C7 | 179.70 |
| O2 - C1 - C8 = C10 | 79.20 |
| O2 - C1 - C2 - C3 | 179.92 |
| O2 - C1 - C6 - C5 | 179.89 |
| O2 - C1 - C7 - C8 | 95.53 |

La longitud de enlace es la distancia media entre los núcleos de dos átomos unidos mediante un enlace químico en una molécula, en la tabla 7 se muestran las longitudes de enlace de los átomos de la molécula de Eugenol.

Tabla 7. Longitud de enlaces entre átomos de la molécula de eugenol.

| Átomos | Longitud de enlace (Å) |
|------------------|------------------------|
| C1 – C2 | 1.388 |
| C2 – C3 | 1.394 |
| C2 – H12 | 1.086 |
| C3 – C4 | 1.403 |
| C3 – H3 | 1.088 |
| C4 – C5 | 1.408 |
| C4 – C7 | 1.511 |
| C5 – C6 | 1.395 |
| C5 – H5 | 1.085 |
| C7 – C8 | 1.503 |
| C7 – H4 | 1.097 |
| C7 – H13 | 1.098 |
| C8 = C10 | 1.340 |
| C8 – H12 | 1.088 |
| C9 – H6 | 1.095 |
| C9 – H10 | 1.095 |
| C9 – H11 | 1.094 |
| C10 – H8 | 1.086 |
| C10 – H14 | 1.085 |
| O1 – C6 | 1.372 |
| O1 – C9 | 1.423 |
| O2 – C1 | 1.369 |
| O2 – H1 | 0.997 |

7.3.2 Espectros de infrarrojo y Raman

Mediante cálculos teóricos apoyados en los programas computacionales, se obtuvieron los espectros de infrarrojo de la molécula de eugenol, donde se muestran las bandas significativas de esta estructura, que por tratarse de sustancias con anillo aromático, sus espectros infrarrojo muestran las señales características de estos compuestos y dan información sobre el tipo de sustitución en el anillo aromático, además de los grupos funcionales presentes en la molécula, éstas bandas de absorción se pueden observar en el 3000 cm^{-1} que es debido al grupo Hidroxilo, en $1500 - 1550\text{ cm}^{-1}$ se observa una banda característica del grupo aromático perteneciente a la estructura del eugenol y en los $1000- 1200\text{ cm}^{-1}$ encontramos bandas características del grupo vinilo monosustituido.

La banda correspondiente al grupo vinilo mono sustituido $C_8 = C_{10}$, para la molécula de eugenol obtenida a nivel experimental, se encuentra en un intervalo de $1000-1200\text{ cm}^{-1}$, este resultado es ligeramente diferente a los reportados con anterioridad por algunos investigadores, esto posiblemente debido a que los extractos utilizados corresponden al clavo de olor mexicano y no al europeo, que es el que está reportado con resultados similares, ya que en ellos el espectro IR del eugenol muestra entre otras bandas en 3500 (ancha) debida al grupo hidroxilo, 1510 característica de aromáticos, y tres bandas en 990 , 920 y 938 cm^{-1} características de un grupo vinilo monosustituido. En la Figura 15 se presenta el espectro teórico de IR y en la Figura 15 el espectro de Raman del eugenol, respectivamente.

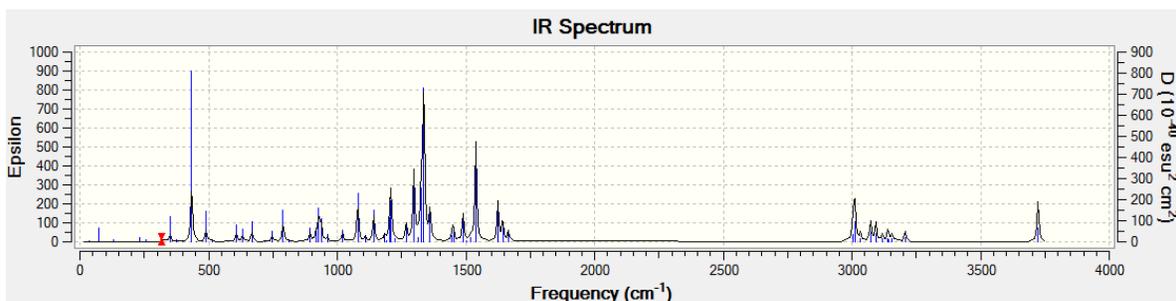


Figura 15. Espectro infrarrojo, obtenido con cálculos teóricos.

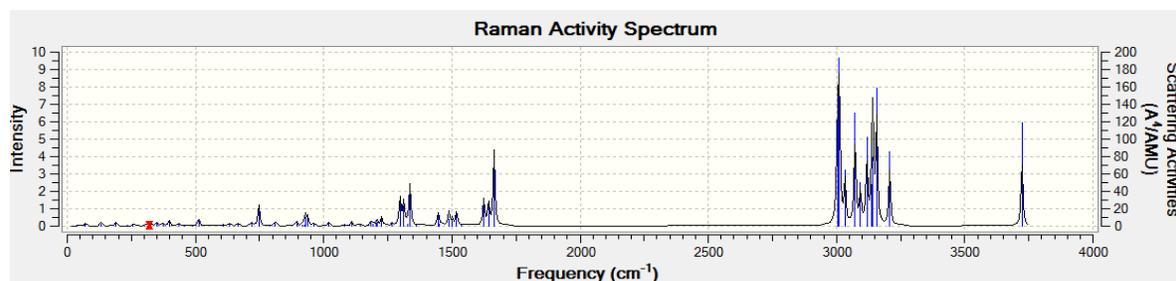


Figura 16. Espectro de Raman obtenido, mediante cálculos teóricos.

7.3.3 Diferencia de energía de los orbitales moleculares HOMO-LUMO

En las imágenes de la Figura 17, se puede observar las diferencias de energía de orbitales HOMO-LUMO, los valores obtenidos se encuentran en la Tabla 8. Los valores bajos favorecen la existencia de transiciones electrónicas, aspecto importante en la reactividad química. Se puede observar en el orbital molecular HOMO que los orbitales se deslocalizan sobre varios átomos como O2, O1, C4 y C3 y en su forma negativa en los átomos C1, C2, C3 y O1, Figura 18

Tabla 8. Diferencial de energía de los orbitales HOMO -LUMO

| Energía HOMO-LUMO de la molécula de eugenol determinado con el nivel de teoría B3LYP/6-311G+(d, p) | | |
|--|-------|--|
| HOMO | LUMO | Diferencia de energía HOMO-LUMO (eV) |
| -8.057 | 4.139 | 3.918 |

7.3.4. Estructuras LUMO del Eugenol



Figura 17. Orbitales LUMO y LUMO (+) de la molécula de Eugenol

7.3.5. Estructuras HOMO del Eugenol



Figura 18. Orbitales HOMO y HOMO (-) de la molécula de Eugenol

7.3.6. Superficie de potencial electrostático molecular

Con el fin de predecir sitios activos de la molécula para un ataque electrofílico y nucleofílico, se calculó el potencial electrostático molecular, Figura 19.

Los diferentes valores del potencial electrostático en la superficie molecular se representan con diferentes colores, en donde rojo corresponde a una superficie de potencial negativo y el color azul a una superficie de potencial positivo. Las regiones negativas son susceptibles a un ataque electrofílico y la positiva a un ataque nucleofílico.

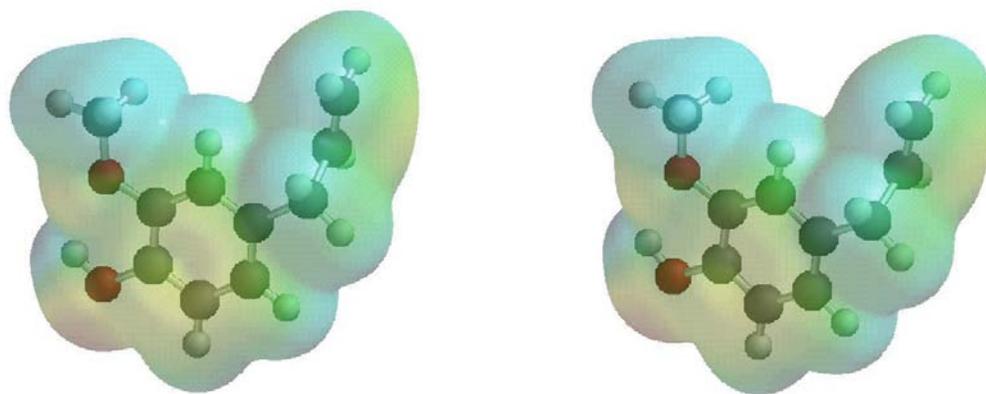


Figura 19. Potencial electrostático y densidad de la molécula de Eugenol.

7.3.7. Estructuras con densidad LUMO

En la Figura 20 se presentan las densidades de los orbitales LUMO y LUMO (+)

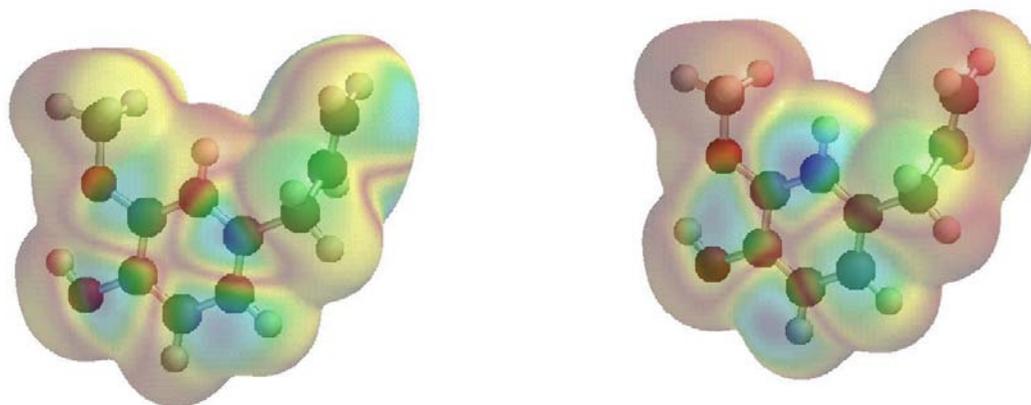


Figura 20. Densidad de los orbitales LUMO y LUMO (+).

7.3.8. Estructuras con densidad HOMO

En la Figura 21 se presentan las densidades de los orbitales HOMO y HOMO (+)

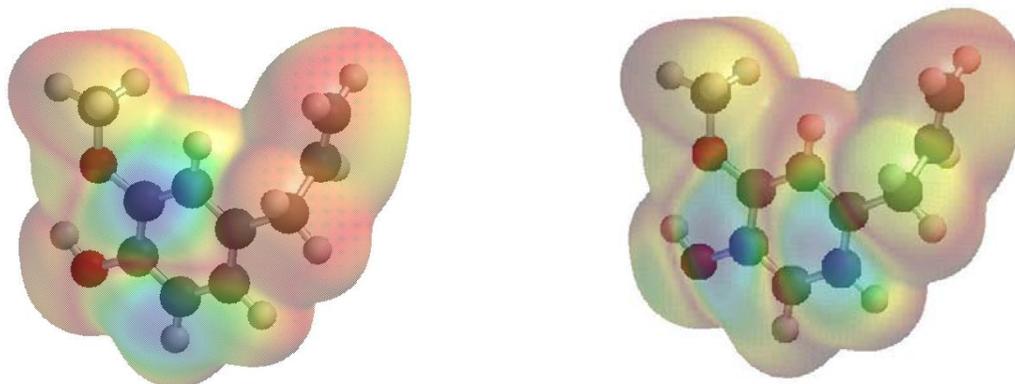


Figura 21. Densidad de los orbitales HOMO y HOMO (+).

7.4. Docking

En la figura 21 se muestra la interacción de la prostaglandina H sintatasa con el complejo de eugenol, la prostaglandina es una proteína periférica la cual está situada en la membrana de los cromosomas y del retículo endoplásmico y que se ve inhibida por los AINE (antiinflamatorios no esteroideos).

Los AINE inhiben la capacidad de adherencia de las células sanguíneas blancas, especialmente neutrófilos con la consecuente inhibición de la quimiotaxis y de la agregación de neutrófilos.

El eugenol muestra propiedades por las cuales se considera parte de los AINE, ya que este inhibe la quimiotaxis de los neutrófilos y la generación de anión superóxido a bajas concentraciones, ya que en concentraciones muy elevadas este presenta una reacción de carácter irreversible. Es un inhibidor competitivo de la PGH y previene el enlace del ácido arquidónico a esta enzima, con la consecuente formación de PGH, además de inhibir la formación de tromboxanos y agregación plaquetaria en sangre humana (in vitro). Tanto las PG como los leucotrienos (LT) son mediadores de la respuesta inflamatoria.

La PGE2 y LT1 aumentan el flujo sanguíneo y la permeabilidad vascular y a concentraciones fisiológicas sensibilizan las terminaciones nerviosas y el eugenol como inhibidor de estas, reduce los efectos ocasionados en las terminales nerviosas y así este produce la sensación de adormecimiento, solo a baja concentración produciendo un efecto claramente reversible. En la Figura 22 se muestra al ligando (CPK), en el sitio del receptor, en donde la energía de interacción es más negativa (favorable).

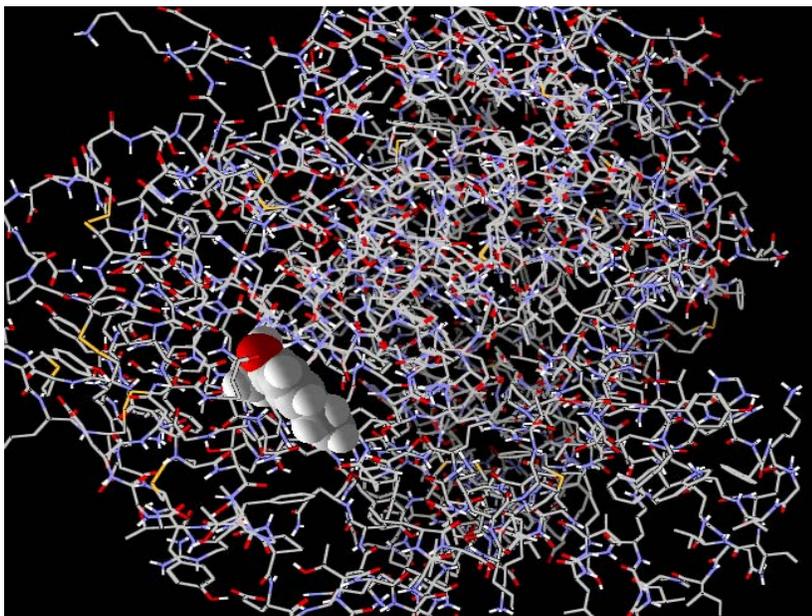


Figura 22. Complejo Eugenol – proteína de prostaglandina H Sintasa, que se produce en la inflamación, el ligando esta en volumen lleno.

Tabla 9. Ligandos principales de la interacción Eugenol-proteína 3p98.

| Ligandos para la proteína 3P98 | | | | | |
|--------------------------------|---------------|---------|--------------------------|----------|--------------------|
| Pose | Docking score | RMSD | Distancia de interacción | Residuo | Referencia Docking |
| 1 | -76.8024 | 32.8488 | -5.2592 | Ser ile | -66.7695 |
| 2 | -75.0536 | 32.9674 | -5.8830 | Ile, lys | -63.2479 |
| 3 | -72.2878 | 33.0080 | -2.5000 | Ser | -62.6241 |
| 4 | -70.2428 | 32.9921 | -2.2228 | Ser ile | -61.0564 |
| 5 | -67.9393 | 33.2362 | -3.3096 | Ser lys | -58.7959 |
| | | | | | |

En la Tabla 9 se presentan las poses o ligandos principales de la interacción eugenol proteína 3P98, y los valores correspondientes.

En la Figura 23 se muestra parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína 3p98 en la cual podemos observar en color naranja y representado con la letra S a la serina, uno de los residuos más cercanos a los ligandos de eugenol y con un 6.27% en la secuencia de esta proteína, en color verde fluorescente, con un 14.28% y representada con la letra L a la lisina y en color verde limón, un 5.92% y representado con una letra I a la isoleucina.

Estos aminoácidos se encuentran en un radio aproximado de 1.5 – 2.0 Å de distancia de la molécula de eugenol y dentro del sitio activo de la cavidad de la proteína y por tanto el lugar de mayor interacción.

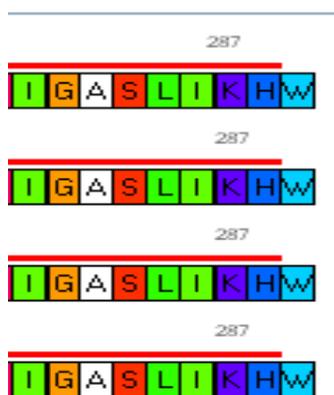


Figura 23. Fragmento de la secuencia de aminoácidos de la proteína 3p98.

En la Tabla 10 se presentan los ligandos que interactúan con los residuos de la proteína 1CX2.

Tabla 10. Ligandos principales de la interacción Eugenol-proteína 1cx2.

| Ligandos para la proteína 1CX2 | | | | | |
|--------------------------------|---------------|---------|--------------------------|----------|--------------------|
| Pose | Docking score | RMSD | Distancia de interacción | Residuo | Referencia Docking |
| 1 | -76.8024 | 32.8488 | -5.2592 | arg | -66.7695 |
| 2 | -75.0536 | 32.9674 | -5.8830 | Ser | -63.2479 |
| 3 | -72.2878 | 33.0080 | -2.5000 | ser | -62.6241 |
| 4 | -70.2428 | 32.9921 | -2.2228 | Ser, asn | -61.0564 |
| 5 | -67.9393 | 33.2362 | -3.3096 | arg | -58.7959 |

En la Figura 24 se muestra parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína 1CX2 en la cual podemos observar en color violeta representado con la letra N a la aspargina, la cual se encuentra en un 3.78% en la secuencia de aminoácidos de esta proteína también, es uno de los residuos más cercanos a los ligandos de eugenol, en color naranja, con un 5.15% y representado con la letra S a la serina y en color azul, un 4.63% y representado con una R a la arginina. Estos aminoácidos se encuentran en un radio aproximado de 1.5 – 2.0 Å de distancia de la molécula de eugenol y dentro del sitio activo de la cavidad de la proteína y por tanto el lugar de mayor interacción entre la molécula y la proteína.

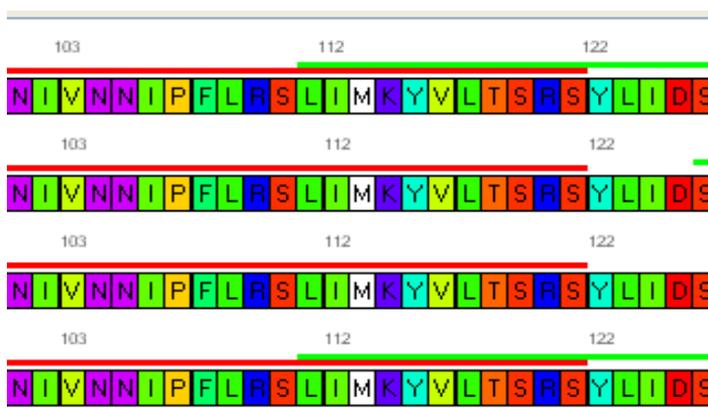


Figura 24. Fragmento de la secuencia de aminoácidos de la proteína 1cx2.

El eugenol muestra una interacción muy cercana a distintos aminoácidos encontrados en la proteína 3P98 como son: la isoleucina y la serina.

La primera, contribuye en el ciclo de Krebs, ya que mediante la transformación de alfa-cetoglutarato produce succinil Co A, que por oxidación en la glucogénesis da como producto oxaloacetato.

Por su parte la serina, la cual es sintetizada por el hombre a partir de gliceratos o 3-fosfogliceratos en la vía de la glucolisis, contribuye en la biosíntesis de las purinas y pirimidias y es un precursor de la glicina y cisteína, por tanto ambos muy importantes debido a sus funcionalidad a nivel metabólico. (Figura.25)

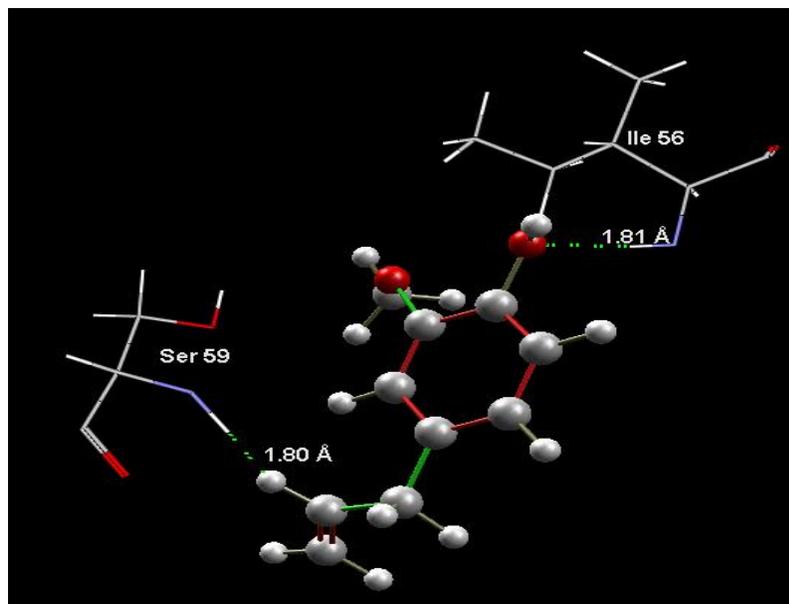


Figura 25. Molécula tridimensional de Eugenol con los residuos de aminoácidos más cercanos y sus distancias en Armstrongs.

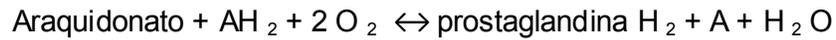
En la Figura 26 se muestra la interacción de la prostaglandina H2 (1CX-2) con el eugenol, la prostaglandina es una enzima clave en la biosíntesis de prostanoïdes implicados en respuesta inflamatoria y en mitosis.

Por medio de una serie de reacciones de oxidación se convierte el araquidonato en prostaglandina H2 (PGH2), un paso comprometido en la síntesis de prostanoïdes. Expresado constitutivamente en algunos tejidos en condiciones fisiológicas, tales como el endotelio, el riñón y el cerebro, y en condiciones patológicas, tales como en el cáncer.

PTGS2 es responsable de la producción de las prostaglandinas inflamatorias. Sobre regulación de PTGS2 también se asocia con un aumento de la adhesión celular, cambios

fenotípicos, la resistencia a la apoptosis y la angiogénesis tumoral que se ve inhibida por los AINE (antiinflamatorios no esteroideos).

En las células cancerosas, la PTGS2 es un paso clave en la producción de prostaglandina E2 (PGE2), que desempeña un papel importante en la modulación de la motilidad, la proliferación y la resistencia a apoptosis.



Prostaglandina ← ciclooxigenasa (COX)

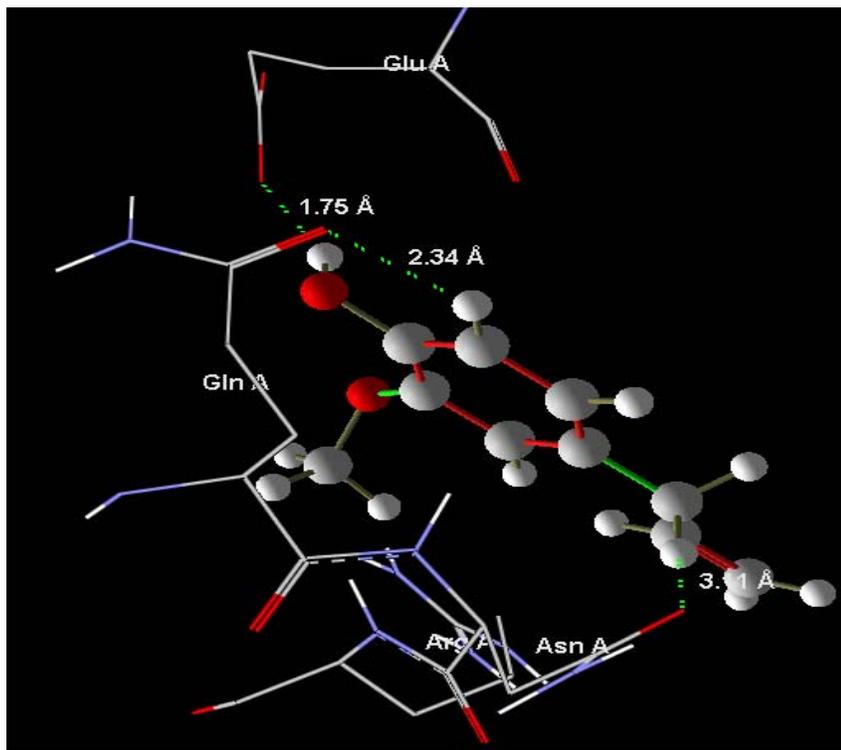


Figura 26. Distancia de interacción entre el Eugenol y los residuos de la proteína 1CX2-A, ya que es un tetrámero la proteína completa.

En la Figura 27 a) y b) se muestra el complejo Eugenol - 3P98 mostrando sus principales cavidades y centro de interacción en su estructura molecular completa y la estructura secundaria o backbone.

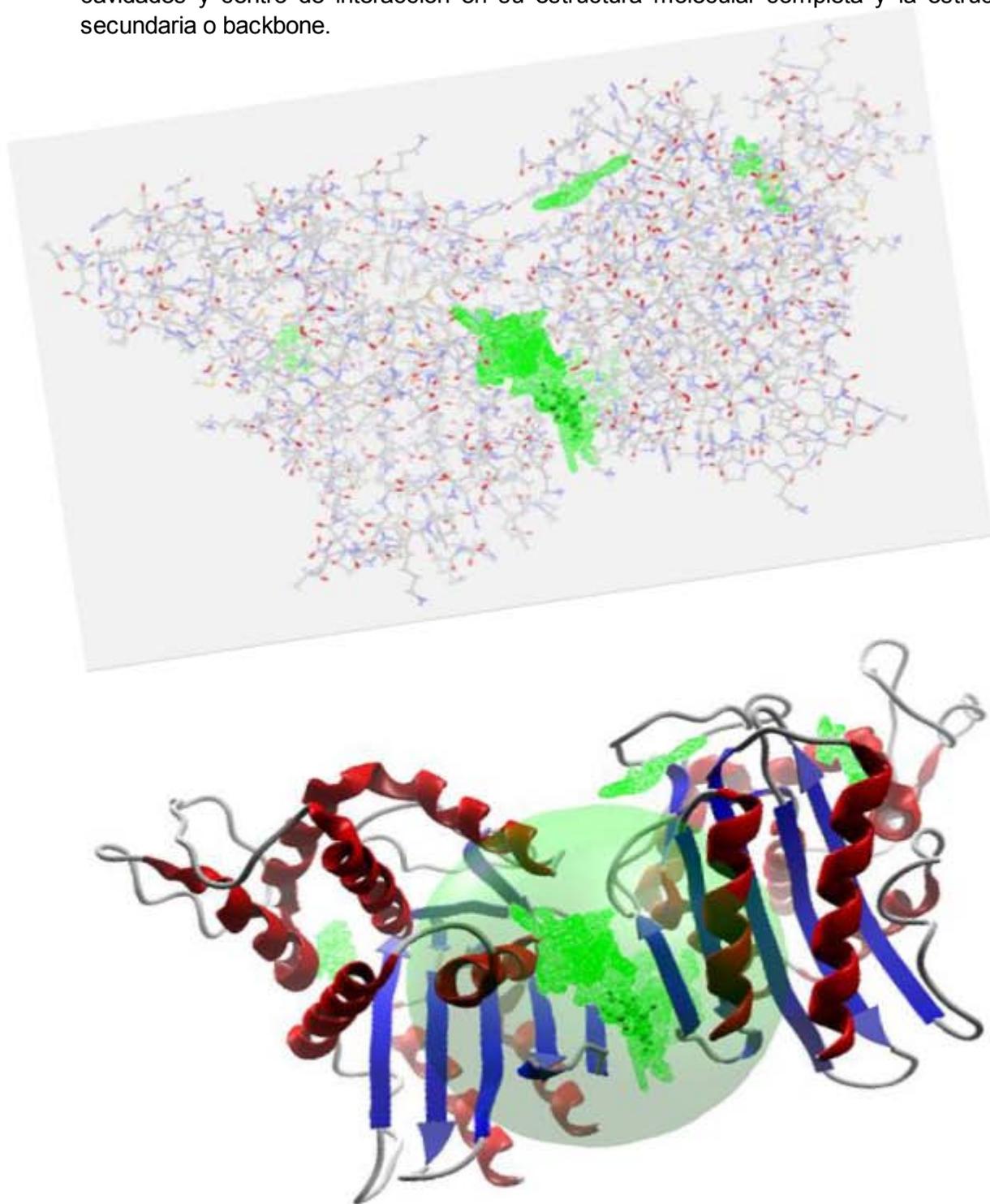


Figura 27. a) Cavidades de la 3P98-Eugenol b) Cavidades de la 3P98-Eugenol en estructura secundaria o backbone.

En la Figura 27 se muestra el complejo Eugenol-3p98 en su estructura backbone donde se puede apreciar el sitio activo principal (donde se encontraba la cavidad de la Figura 24) con los ligandos principales cada uno mostrado con un color diferente.

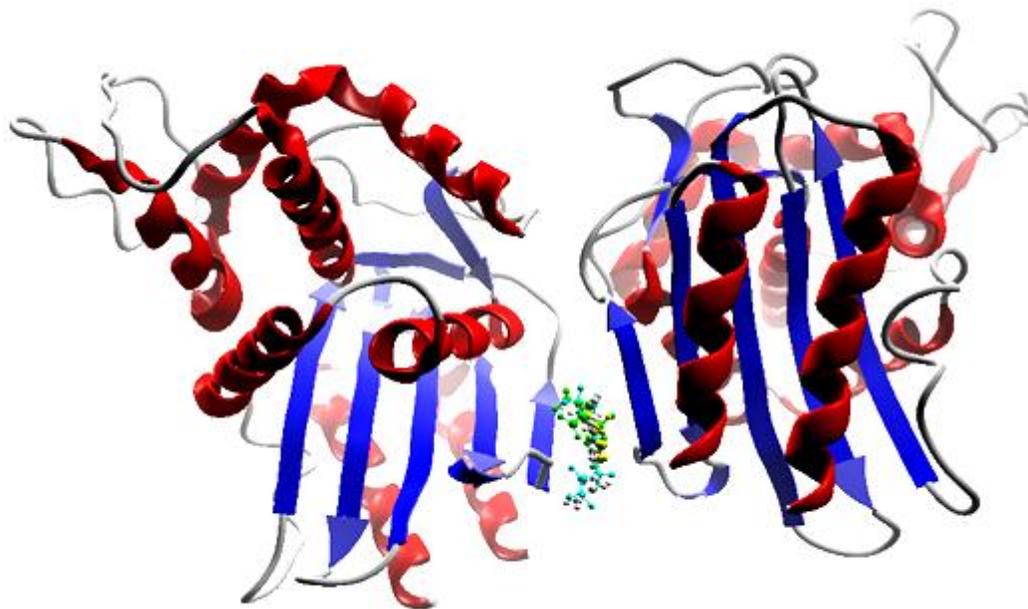


Figura 28. Estructura Backbone de la 3P98 con Eugenol en el sitio activo principal.

En la Figura 29 a) y 29 b) se muestra el complejo Eugenol -1CX2 mostrando sus principales cavidades y centro de interacción en su estructura molecular completa y backbone.

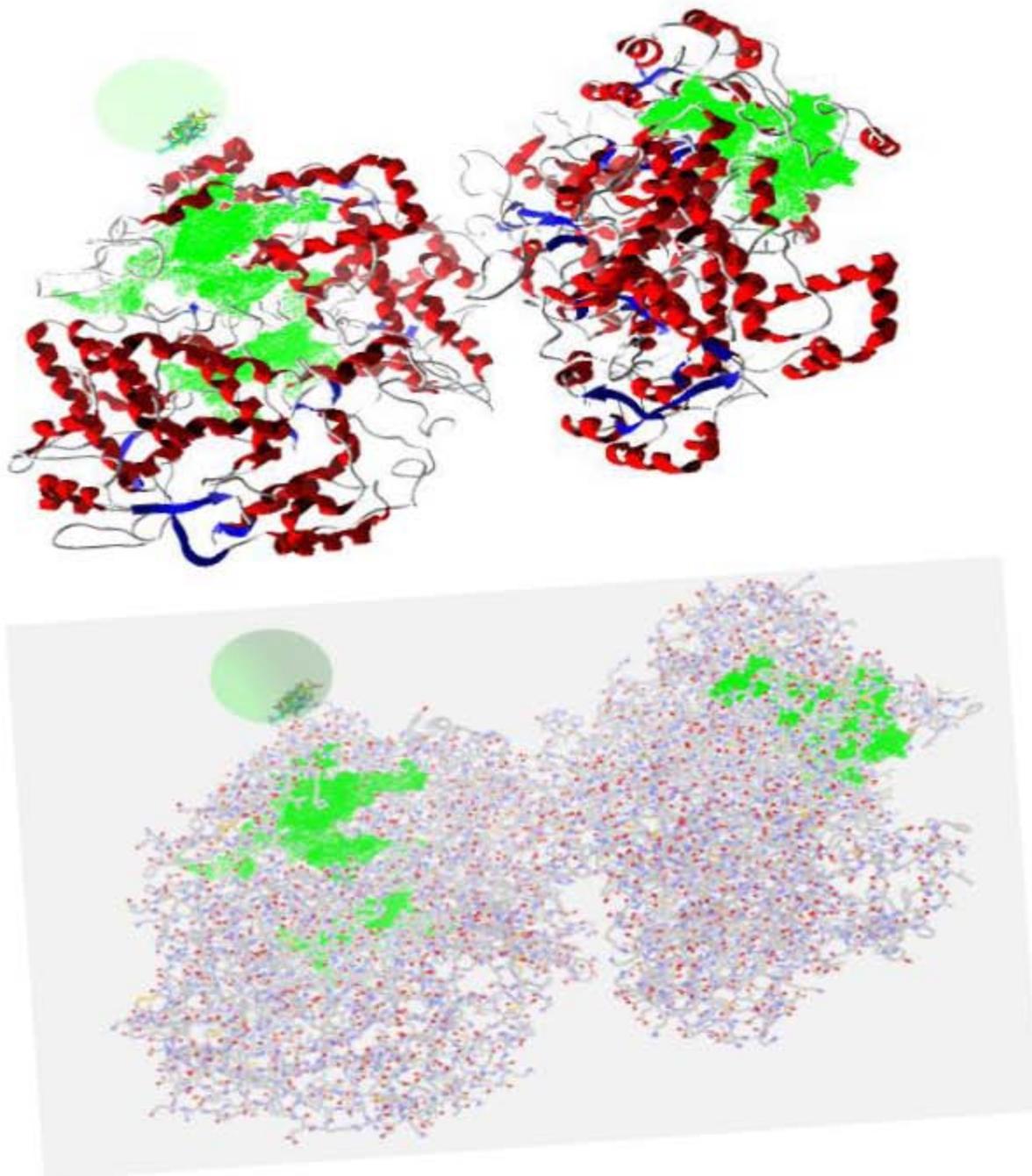


Figura 29. a) Cavidades de la 1Cx2-Eugenol en estructura backbone b) Cavidades de la 1Cx2-Eugenol

La Figura 30 muestra la estructura backbone del complejo Eugenol-1cx2 con las poses de los ligandos principales indicados con un color diferente cada uno y mostrándose así el sitio activo principal de interacción entre las moléculas.

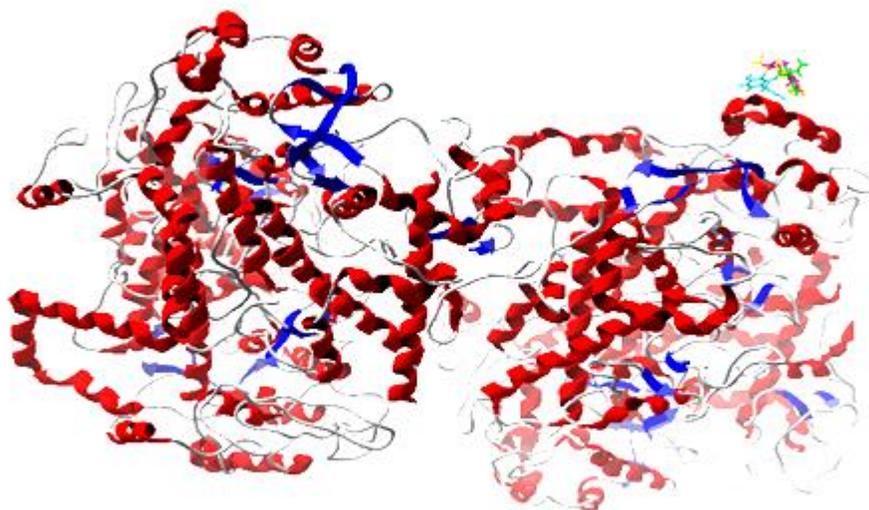


Figura 30. Estructura Backbone de la 1Cx2 con Eugenol en el sitio activo principal.

8. CONCLUSIONES

- ❖ Se realizó la extracción del aceite esencial de clavo de olor, en forma de solución por medio de la destilación de vapor, teniendo un buen rendimiento de la extracción, observándose un color amarillo tenue y apreciando también el olor que lo caracteriza.
- ❖ Con el modelado molecular en Spartan '08 de la molécula de Eugenol se optimizó y con los datos obtenidos de los cálculos conformacionales se realizó satisfactoriamente el acoplamiento en Docking con la proteína 3P98 y 1CX2 ubicándose los aminoácidos más cercanos y así los sitios activos de la molécula de eugenol.
- ❖ Con pruebas microbiológicas el extracto oleoso del clavo de olor, presentó actividad antimicrobiana, al enfrentarse con *Staphylococcus aureus* y *E. coli* por lo que podría utilizarse como aditivo para los envases de alimentos para inhibir el crecimiento y la contaminación por bacterias.
- ❖ Se sabe que el Eugenol se usa para inhibir la inflamación, que muchas veces es producto de la presencia de la enzima oxigenasa, de la prostaglandina (HPGH) Sintasa, por lo que se propuso un modelo por la técnica de Docking, que permite explicar la interacción del Eugenol con dichas proteínas.
- ❖ Se pudo comprobar que el eugenol tiene propiedades biológicas y que estas se pueden explicar científicamente por medio de modelos moleculares que explican su actividad biológica, y que la metodología de este trabajo se puede aplicar a otros productos naturales, eliminando la controversia que su uso provoca.
- ❖ Por otro lado, también los fármacos, y otros productos naturales que ya se encuentran en el mercado, se pueden estudiar de la misma manera para justificar su actividad biológica y utilidad terapéutica.
- ❖ Se pudo usar satisfactoriamente el modelado molecular y los cálculos teóricos para una tarea multidisciplinaria, ya que en el presente trabajo se usaron técnicas y métodos empleados en diferentes disciplinas, tales como la Microbiología, la Bioquímica, la Fisicoquímica, la Farmacología, entre otras.

- ❖ Por todo lo anterior, recomendamos categóricamente esta metodología para que las nuevas generaciones de egresados de esta Facultad las usen en las carreras y laboratorios correspondientes.

9. REFERENCIAS

1. Adil Mohd, Verma Praveen K. (2014). Eugenol-induced suppression of biofilm-forming genes in *Streptococcus mutans*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2(4), 286-292.
2. Anderson Guarnizo. F. (2009). Experimentos de química orgánica. Armenia: Ed. Elizcom.
https://books.google.com.mx/books?id=Otm5wsEeKYEC&pg=PA89&lpg=PA89&dq=EXTRACCION+DE+aceite+esencial+de+clavo&source=bl&ots=BQze1S5kRt&sig=MFQGV4Pzj9L-dk-km_jj76wqeiw&hl=es-419&sa=X&ei=bwv2VJaIC8WOyAT-zoGQBg&ved=0CCIQ6AEwAQ#v=onepage&q=EXTRACCION%20DE%20aceite%20esencial%20de%20clavo&f=false
3. Anderson, M.P. and Uval P. (2005). New Scale Factors for Harmonic Vibrational Frequencies Using the B3LYP Density Functional Method with the Triple- Basis Set 6-311+G (d, p). *The Journal of Physical Chemistry*, (109), 2937-2941.
4. Aula fácil (España). Principales métodos de extracción de aceites esenciales (Fecha de consulta: 22 febrero de 2015). Disponible desde:
<http://www.aulafacil.com/cursos/l232/salud/terapia/aromaterapia-i/principales-metodos-de-extraccion-de-aceites-esenciales>
5. Biblioteca digital UNAM (México). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, (Fecha de consulta: 20 febrero de 2015). Disponible desde:
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7066>
6. Bissantz C, Folkers G y Rognan D (2000). Protein-based virtual screening of chemical databases. 1. Evaluation of different docking/scoring combinations. *Journal Medicinal Chemistry*, 43, 4759-4767.
7. Burgstaller. C, Carlos. H. (1986). La vuelta a los vegetales. (10ª ed.). Argentina. Ed. Machete.
8. Cáceres Rueda de León I. (2014). Actividad Antifúngica *in vitro* de Extractos Acuosa de Especies contra *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma spp.*, *Penicillium digitatum* y *Aspergillus niger*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31 (2), 105-112
9. Chaieb, K. Hajjaoui H, Zmantar T, Kahla-Nabki AB. (2007). The Chemical Composition and Biological Activity of Clove Essential Oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae). *Phytother Research*, 21(6), 501-506. Doi: 10.1002/ptr.2124.
10. Chang, R. (2010). Química. (7ª ed.). Colombia. Ed. Mc Graw Hill.
11. Claramunt, Rosa Ma. (2013). Química biorgánica y productos naturales (versión digital) Disponible desde:

<https://books.google.com.mx/books?id=wUdGAgAAQBAJ&pg=PA204&dq=productos+naturales&hl=es-419&sa=X&ei=-lQIVf-8BlEuyQTsoYHoDA&ved=0CCAQ6AEwAQ#v=onepage&q=productos%20naturales&f=false>

12. Clark RD, Strizhev A, Leonard JM, Blake JF y Matthew JB. **(2002)**. Consensus scoring for ligand/protein interactions. *Journal Molecular Graphics Modelling*. (20): 281-295.
13. Cortés-Rojas, Diego. F., Souza, Claudia F. y Oliveira Wanderley P. **(2014)**. Encapsulation of eugenol rich clove extract in solid lipid carriers. *Journal of food Engineering*. (127): 34-42.
14. Cuevas. Cortes, F. **(2003)**. Introducción a la química computacional. México D.F., ed. FCE.
15. Eglén RM, Schneider G, y Böhm HJ. **(2000)**. High-throughput screening and virtual screening: Entry points to drug discovery. In: Virtual screening for bioactive molecules Böhm HJ y Schneider, G (eds.) Wiley-VCH. Weinheim, Alemania. pp. 1- 14.
16. Ewing JA. y Kuntz ID **(1997)**. Critical evaluation of search algorithms for automated molecular docking and database screening. *Journal Computational Chemistry*. (9): 1175-1189.
17. Gao XG, Maldonado E, Garza-Ramos G, de Gómez-Puyou MT, Gómez-Puyou A. y Rodríguez-Romero, A. **(1999)**. Crystal structure of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* in hexane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. (96): 10062-10067.
18. García Mejjide, Juan A., Gómez-Reino Carnota, Juan J. **(2000)**. Fisiopatología de la ciclooxigenasa-1 y ciclooxigenasa-2. *Revista Española Reumatol*, 27 (1): 5-33.
19. Gasteiger J y Marsili M **(1980)**. Iterative partial equalization of orbital electronegativity. A rapid access to atomic charges. *Tetrahedron*. (36): 3219-3228.
20. Goodman, JM. **(1998)**. Chemical applications of molecular modeling. Cambridge, Inglaterra, ed. The Royal Society of Chemistry.
21. Gómez-Puyou A, Saavedra-Lira E, Becker I, Zubillaga RA, Rojo-Domínguez, A. y Pérez-Montfort, R. **(1995)**. Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action. Studies with triosephosphate isomerase, *Chemical Biology*, (2): 847-855.
22. Hakki, Alma M, Murat E, Sigfried, N, Hubert K. **(2007)**. Chemical Composition and content of essential oil from the bud of cultivated Turkish clove (*Syzygium aromaticum*, L), *Bioresources*, 2(2): 265-269.
23. Jiménez Merino. Alberto. **(2012)**. Herbolaria Mexicana. México, ed. Mundi-Prensa. pp 531.
24. Kramer B, Rarey M. y Lengauer T. **(1999)**. Evaluation of the Flex incremental construction algorithm for protein-ligand docking. *Proteins Structure Functions and Genetics*. (37): 228-241.
25. Jaqueline Padilla Z. y Arturo Rojo D. **(2002)**. Simulación del reconocimiento entre proteínas y moléculas orgánicas o docking, aplicación al diseño de fármacos, *Mensaje Bioquímico*, Vol XXVI. 129-143.
(<http://laguna.fmedic.unam.mx/mensajebioquimico>).

26. Jones G, Willett P. y Glen RC. (1995). Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *Journal Molecular Biology*. (245): 43-53.
27. Leach AR. (1996). Molecular modeling. Principles and applications. Essex, Inglaterra, Addison Wesley-Longman Ltd.
28. Lengauer T. y Rarey M (1996). Computational Methods for Biomolecular Docking. *Current Opinion in Structural Biology*. (6): 402-406.
29. León, Jorge. (1988). Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales. (versión electrónica). Disponible desde:
<https://books.google.com.mx/books?id=gJiVVBk-vWMC&pg=PA403&dq=CLAVO+DE+OLOR&hl=es&sa=X&ei=m3nrVJLsN8ybyASV5IDADQ&ved=0CBsQ6AEwAA#v=onepage&q=CLAVO%20DE%20OLOR&f=false>
30. Levine, N.I. (2005). Química cuántica, (5ª ed.), España. Pearson Prentice Hall.
31. Nassar, Mahmoud I, Ahmed H. Gaara, Ahmed H. El-Ghorab, Abdel-Razik H., Hui Shen. (2007). Chemical Constituents of Clove (*Syzygium aromaticum*, Fam. Myrtaceae) and their Antioxidant Activity, *Revista Latinoamericana Quimica*, 3, 35.
32. Maldonado E, Soriano-García M, Moreno A, Cabrera N, Garza-Ramos G, de Gómez-Puyou MT, Gómez-Puyou A y Pérez-Montfort R. (1998). Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. *Journal Molecular Biology*. (283): 193-203.
33. Mattos C. y Ringe D. (1996). Locating and characterizing binding sites of proteins. *Nature Biotechnol* (14): 595-599.
34. National Cancer Institute. (USA). (Fecha de consulta: 25 de agosto de 2015). Disponible desde: <http://cactus.cit.nih.gov/>
35. NMX-F-349-1983. Alimentos. (México). Especies y condimentos. clavo de especia, foods- spices and condiments- spice clove. *Normas Mexicanas. Dirección General de Norma*.
36. Pedrique, M. (Chile). Laboratorio de Microbiología. Antibiograma (Fecha de consulta: 25 de febrero de 2015). Disponible desde:
http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Antibiograma.pdf
37. Rarey M, Wefing S, y Lengauer , T. (1996). Placement of medium-sized molecular fragments into active sites of proteins. *Journal of Computer Aided Molecular Design* (10): 41-54.
38. Rarey M, Kramer B, Lengauer T, y Klebe G. (1996). Predicting receptor-ligand interactions by an incremental construction algorithm. *Journal Molecular Biology* (261): 470-489.
39. Saez, J. C. (2007). Estudio teórico de los mecanismos de reacciones orgánicas. Valencia España.
40. SANAT Internacional. (2008). (México) (Fecha de consulta: 19 febrero de 2015). Disponible desde: <http://www.sanat.tv/es/plants/syzygium-aromaticum.html>

41. SENA, (2006). (Colombia). Introducción a la industria de los aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas (Fecha de consulta: 20 febrero de 2015). Disponible desde:
[http://repositorio.sena.edu.co/bitstream/11404/1144/1/ACEITES ESENCIALES EXTRAIDOS DE PLANTAS MEDICINALES Y AROMATICAS.pdf](http://repositorio.sena.edu.co/bitstream/11404/1144/1/ACEITES_ESENCIALES_EXTRAIIDOS_DE_PLANTAS_MEDICINALES_Y_AROMATICAS.pdf)
42. Simplified Molecular Input Line Entry Specification. (2009). (USA) (Fecha de consulta: 19 mayo de 2015). Disponible desde:
<http://www.daylight.com/>
43. Techniques for Organic Reactions Visualization and Spectroscopy (TORVS). (2010). (Fecha de consulta: 20 febrero de 2015). Disponible desde:
<http://www2.chemie.uni-erlangen.de/>
44. Weiner S.J, Kollman P. A, Nguyen D. T y Case D, A. (1986). An all atom force field for simulation of proteins and nucleic acids. *Journal Computer Chemistry*. (7): 230.
45. Weininger, D. (1998). SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules. *Journal of Chemistry Information Computer Science*. (28): 31- 36.
46. <http://www.iqb.es/monografia/fichas/ficha113.htm>

10. APENDICE

Tabla 11. Control del método de Kirby Bauer

| ANTIBIÓTICO | CONCENTRACIÓN DEL DISCO | DIÁMETRO DE LA ZONA DE INHIBICIÓN (en mm) | |
|---------------|-------------------------|---|-------------------------------|
| | | CON <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | CON <i>E. coli</i> ATCC 25922 |
| Ampicilina | 10 µg | 24-35 | 15-20 |
| Bacitracina | 10 U | 17-22 | --- |
| Cefalotina | 30 µg | 25-37 | 18-23 |
| Cloramfenicol | 30 µg | 19-26 | 21-27 |
| Colistina | 10 µg | - | 11-15 |
| Eritromicina | 15 µg | 22-30 | 8-14 |
| Gentamicina | 10 µg | 19-27 | 19-26 |
| Kanamicina | 30 µg | 19-26 | 17-25 |
| Meticilina | 5 µg | 17-22 | - |
| Neomicina | 30 µg | 18-26 | 17-23 |
| Novobiocina | 30 µg | 22-31 | - |
| Oleandomicina | 15 µg | 19-28 | - |
| Penicilina G | 10 U | 26-37 | - |
| Polimixina B | 300 U | 7-13 | 12-16 |
| Estreptomina | 10 µg | 14-22 | 12-20 |
| Tetraciclina | 30 µg | 19-28 | 18-25 |
| Vancomicina | 30 µg | 15-19 | - |