



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE INCLUSIÓN DE 1,8-CINEOL Y CITRAL
CON β -CICLODEXTRINA.

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. I. Jeovani González Barbosa

TUTORA: DRA. MARÍA DEL ROSARIO MOYA HERNÁNDEZ.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO. JUNIO 2020.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán** (Campo Uno) por los conocimientos y la formación gratuita que me brindo.

Al proyecto titulado “Complejos de inclusión de ciclodextrinas con moléculas orgánicas de interés biológico” con clave PIAP11846, FES-C, UNAM.

Al proyecto titulado, “Complejos de Cu (II) y Zn (II) con fármacos antiinflamatorios” con clave PAPIIT IN218118.

Al CONACYT por el apoyo económico brindado a través del número de becario 884265.

A la Doctora María del Rosario Moya Hernández, por aceptar ser mi asesora, brindarme su apoyo y tiempo para que pudiera realizar este trabajo.

Al M. C. Adrián Ricardo Hipólito Nájera por su apoyo en el uso del equipo ITC y por el tratamiento de los datos obtenidos de este.

A mi familia fuente de apoyo constante e incondicional en toda mi vida y en especial quiero expresar mi más grande agradecimiento a mis padres por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de los logros se los debo a ustedes, en los que incluyo esté, por apoyarme para alcanzar mis anhelos. Sin su ayuda este momento no hubiera sido posible.

A mi hermana por estar siempre en los buenos, malos momentos, por brindarme su apoyo incondicional y evidentemente por el regalo adelantado.

A Karina Herrera García la mejor amiga que he podido encontrar, gracias por estos 9 años (creo) sabes que mi memoria no es la mejor y lo más importante recuerda “tú y yo somos uno mismo”.

A los miembros del jurado por sus sugerencias las cuales resultaron de gran utilidad en este trabajo:

- Dr. Miguel Antonio Costas Basín.
- Dr. Rodolfo Gómez Balderas.
- Dra. Yareli Rojas Aguirre.
- Dra. Ana María Velázquez Sánchez.
- Dr. Alberto Rojas Hernández.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 10, Laboratorio de Fisicoquímica Analítica, Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Bajo la tutela de la Dra. María del Rosario Moya Hernández.

Los resultados de este trabajo se presentaron en:

“Determinación de la constante de inclusión de Citral con β -Ciclodextrina”, Congreso de la Sociedad de Química de México, Puebla, México, septiembre 2019. Cartel.

CONTENIDO.

1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. MARCO TEÓRICO.....	8
2.1. Aceites esenciales.....	8
2.1.1. Citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal).....	9
2.1.2. 1,8-cineol (1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo(2,2,2)-octano).....	11
2.2. Ciclodextrinas.....	12
2.3. Complejos de Inclusión.....	13
2.4. Métodos de obtención Complejos de Inclusión.....	14
2.5. Métodos de Caracterización.....	15
2.5.1. Calorimetría de titulación isotérmica.....	16
2.5.2. Espectrofotometría de absorción molecular UV-Visible.....	18
2.6. Equilibrio químico.....	20
2.6.1. Constante de equilibrio.....	20
2.6.2. Método de relaciones molares.....	21
2.7. Programa SQUAD.....	23
2.8. Programa TRIANG.....	24
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	26
3.1. Hipótesis.....	26
3.2. Objetivo General.....	26
3.3. Objetivos Particulares.....	26
4. METODOLOGÍA.....	27
4.1. Procedimiento para determinación de la estabilidad de soluciones de Citral en medio ácido, básico y neutro.....	27
4.2. Procedimiento para la determinación de la constante de inclusión del Citral con β -CD por espectrofotometría UV-Vis.....	27
4.3. Procedimiento para la determinación de la constante de inclusión de las reacciones de terpenos (Citral, 1,8-cineol) con β -CD por calorimetría.....	28
4.4. Determinación de ΔC_p de la complejación de los terpenos (Citral, 1,8-cineol) con β -CD.....	29
4.5. Estabilidad del complejo de inclusión Citral— β -CD, por espectrofotometría UV-Vis.....	30
4.6. Determinación de la solubilidad del complejo de inclusión Citral— β -CD.....	31
4.7. Determinación de la actividad antioxidante del complejo de inclusión Citral— β -CD.....	32

4.8. Determinación de la capacidad antioxidante del complejo de inclusión 1,8-cineol— β -CD.	33
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS.	35
5.1. Estabilidad del Citral.	35
5.2. Determinación de la constante de inclusión del Citral mediante espectrofotometría UV-Vis.	36
5.3. Determinación de la constante de inclusión del Citral mediante ITC.	41
5.4. Determinación de la constante de inclusión del 1,8-cineol mediante ITC.	43
5.5. Determinación del ΔC_p de los complejos de inclusión terpeno— β -CD.	46
5.6. Determinación de la estabilidad del complejo de inclusión (Citral— β -CD) por espectrofotometría UV-Vis.	50
5.7. Solubilidad del complejo de inclusión (Citral— β -CD).	51
5.8. Actividad antioxidante de los terpenos y los complejos de inclusión terpeno— β -CD.	52
6. CONCLUSIONES.	55
REFERENCIAS.	56
Anexos.	60
Anexo 1: Materiales, equipos y reactivos.	60
Anexo 2: Curva de calibración de Citral.	61

1. INTRODUCCIÓN

En la industria alimentaria se han usado empaques y contenedores hechos de plásticos derivados del petróleo, lo que ha generado serias preocupaciones ambientales debido a la contaminación que generan, ya que son muy difíciles de degradar. Es por esto, que las películas y revestimientos biodegradables representan una alternativa a los materiales convencionales, debido a que ofrecen una solución para la reducción del impacto ambiental, además, de ser una opción reutilizable y reciclable para la fabricación de nuevos envases y películas comestibles. Las películas comestibles son capas delgadas de materiales, que una vez formados pueden colocarse sobre o entre componentes de los alimentos cuya finalidad es la de ayudar a proteger, creando una barrera entre el alimento y la atmósfera que lo rodea. Los materiales más comunes para la formulación de películas y recubrimientos comestibles son polisacáridos, proteínas y lípidos (Atarés & Chiralt, 2016) y la combinación de estos permite producir mezclas de características mejoradas. A estas películas biodegradables se les puede incluir algún tipo de aditivo (conservador), y así ser una opción más viable que los plásticos habituales para reducir el impacto ambiental (Atarés & Chiralt, 2016).

A fin de eliminar el uso de aditivos químicos en la industria alimentaria, se ha aumentado el interés por el uso de aditivos de origen natural con propiedades antimicrobianas y antioxidantes para inhibir el crecimiento de patógenos y así extender la vida útil de los productos alimenticios, los cuales no tienen ningún efecto negativo sobre la salud humana. Esto debido a que los consumidores cada vez son más conscientes de los posibles problemas de salud asociados con los aditivos sintéticos (Ribeiro Santos, Andrade, Ramos de Melo, & Regiane dos Santos, 2017).

Es por eso que los aceites esenciales se han convertido en aditivos interesantes para la industria alimentaria, ya que cuentan con las propiedades antes mencionadas. Sin embargo, su uso como conservantes de alimentos a menudo es limitado debido principalmente a su fuerte sabor, olor y a su difícil manejo (baja solubilidad, alta volatilidad, fácilmente atacados por factores ambientales, etc.), para evitar estos problemas, se han buscado diversas soluciones, las cuales van desde ser incorporados en películas comestibles (Atarés & Chiralt, 2016), o bien, buscar alternativas para mejorar las propiedades físicas y químicas de los aceites esenciales o de sus componentes; una de estas opciones es, el uso de ciclodextrinas para mejorar dichas propiedades y poder ser

utilizados con mayor facilidad, de esta forma poder explorar los beneficios que estos productos naturales pueden brindar (Restrepo, Vinasco, Jaramillo, & Colmenares, 2009).

La complejación de aceites volátiles con ciclodextrinas se ha aplicado para protegerlos de los efectos ambientales. En este proceso, cada componente volátil se mantiene firmemente dentro de la molécula de ciclodextrina sin alterar la estructura original del huésped, que ofrece una protección efectiva contra los efectos dañinos del medio ambiente (Xavier Júnior, y otros, 2018). En la industria alimentara las ciclodextrinas son usadas para mejorar la retención del sabor en los alimentos procesados térmicamente, para la liberación controlada del ajo o del aceite esencial de tomillo, para mejorar el color y / o el aroma de diferentes jugos de frutas, en el envasado de alimentos para retener los ingredientes no deseados. Además, la microencapsulación de aceite esencial con β -CD se ha aplicado en la gastronomía para mejorar las propiedades sensoriales de los alimentos (Ciobanu, Landy, & Fourmentin, 2013). Además, las ciclodextrinas (α , β , y γ ciclodextrinas) son reconocidas como seguras (GRAS) por la FDA (Food and Drug Administration) y aprobado como aditivo en la unión europea (Xiao, Hou, Kong, Niu, & Kou, 2019).

Por lo anterior el conocimiento de la termodinámica de la formación de este tipo de complejos de inclusión es de suma importancia, ya que así se puede predecir de una forma precisa que tan cuantitativas son este tipo de reacciones de complejación (constantes de equilibrio), de igual forma conocer otros parámetros relevantes como lo son: entalpía, energía libre de Gibbs y entropía.

2. MARCO TEÓRICO.

2.1. Aceites esenciales.

Los aceites esenciales pueden definirse como mezclas de compuestos orgánicos volátiles aromáticos que pueden ser extraídos de diferentes partes de las plantas como flores, brotes, hojas, tallos y corteza (Restrepo, Vinasco, Jaramillo, & Colmenares, 2009). Las plantas producen naturalmente aceites esenciales como metabolitos secundarios que proporcionan varias propiedades a la misma, como actividad antimicrobiana y antioxidante (Ribeiro Santos, Andrade, Ramos de Melo, & Regiane dos Santos, 2017), esto se debe a la presencia de sustancias bioactivas como: flavonoides, terpenos, cumarinas y carotenos (Stojkovic, Dzamic, Ciric, Ristic, & Grubisic, 2011). Algunas de las plantas más utilizadas a nivel industrial son el romero, eucalipto, árbol de té y limoncillo (Fonnegra G & Jimenez R, 2007), las cuales se describen a continuación:

- *Cymbopogon citratus*: es una hierba conocida en todo el mundo como limoncillo (Figura 1). El té hecho de sus hojas se usa popularmente como antiespasmódico, analgésico, antiinflamatorio, antipirético, diurético y sedante. El aceite esencial obtenido de hojas frescas de esta planta tiene como principal componente el citral, es ampliamente utilizado por las industrias de perfumes y cosméticos (Rauber, Guterres, & Schapoval, 2005).



Figura 1. *Cymbopogon citratus*

- *Rosmarinus officinalis*: Comúnmente conocido como romero (Figura 2) es un arbusto, que se origina en el área del mediterráneo. Las hojas de romero tienen un intenso olor aromático y sabor amargo, ligeramente picante (Wollinger, y otros, 2016), con varios usos medicinales por lo que ha sido ampliamente utilizada. El estudio de esta planta ha revelado su riqueza en moléculas con actividad biológica, como compuestos fenólicos. Por esta razón, los extractos de romero o su aceite esencial exhiben muchos efectos beneficiosos para la salud como actividades

neuroprotectoras, antimicrobianas, anticancerígenas y antidiarréicas (Selmi, Rtibi, Grami, Sebai, & Marzouki, 2017). El componente principal del aceite esencial de esta planta es el 1,8-cineol en un 35.32%.



Figura 2. *Rosmarinus officinalis*.

- *Melaleuca alternifolia*: se distribuyen a lo largo de todo el mundo, la población principal se centra en Australia, Tasmania, Nueva Guinea y el sur de Asia. Es conocido como árbol del té (Figura 3), el aceite esencial está constituido en mayor proporción por 1,8-cineol (Padalia, Verma, Chauhan, & Goswami, 2015).



Figura 3. *Melaleuca alternifolia*.

El uso de aceites esenciales en la industria alimentaria se ha visto mermado por las razones antes mencionadas. Una forma de solucionar este conflicto, es utilizar solo los componentes de mayor presencia en el aceite esencial del limoncillo, romero y árbol de té. Dichos componentes son el 1,8-cineol y el Citral.

2.1.1. Citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal).

El Citral (Figura 4) es un aldehído monoterpeno compuesto por los isómeros geométricos geranial (fuerte olor a limón) y neral (olor menos intenso pero más dulce) en una proporción

3:2 (Wang, Khelissa, Chihib, Dumas, & Gharsallaoui, 2019), que se genera naturalmente en hierbas, plantas y frutas cítricas, es un compuesto líquido, incoloro, es el componente de muchos aceites esenciales como el del romero, limón, lima y naranja, tienen un fuerte olor a limón, presenta fuertes cualidades antimicrobianas, antifúngica, insecticidas, desodorantes, expectorantes, estimulantes del apetito y espasmolíticas; tiene efectos diuréticos y antiinflamatorios débiles, de igual forma es uno de los más importantes sabores cítricos de la industria alimentaria (Lu, y otros, 2018).

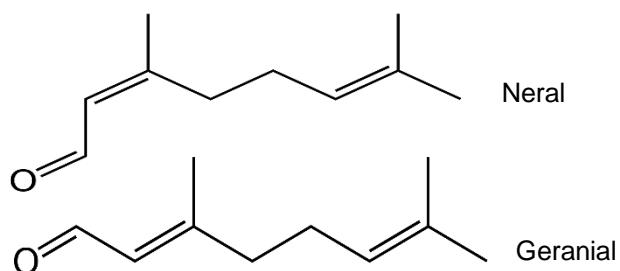


Figura 4. Estructura de los isómeros del Citral (Astray, Mejuto, Morales, Rial-Otero, & Simal-Gándara, 2010).

Sin embargo, el Citral se degrada químicamente durante el almacenamiento a condiciones de pH bajo y ambientes oxidantes, dichas condiciones generan una serie de reacciones de ciclación y oxidación que producen muchos compuestos que reducen el olor fresco a limón, lo que limita su aplicación como saborizante y conservador (Tian, Lu, Li, & Hu, 2018).

Para poder demostrar la degradación del Citral se han llevado a cabo diversas reacciones usando una variedad de catalizadores ácidos y diferentes temperaturas de reacción. En todas las condiciones, se ha desarrollado un único producto final estable, aislado el cual es el p-cimeno (IV). También se ha encontrado que en condiciones de pH de 1.8 y atmósfera de oxígeno, se lleva a cabo la ciclación del Citral (Figura 5) obteniendo el p- α -dimetilestireno (V) (Baines, Jones, Webb, & Campion Smith, 1970).

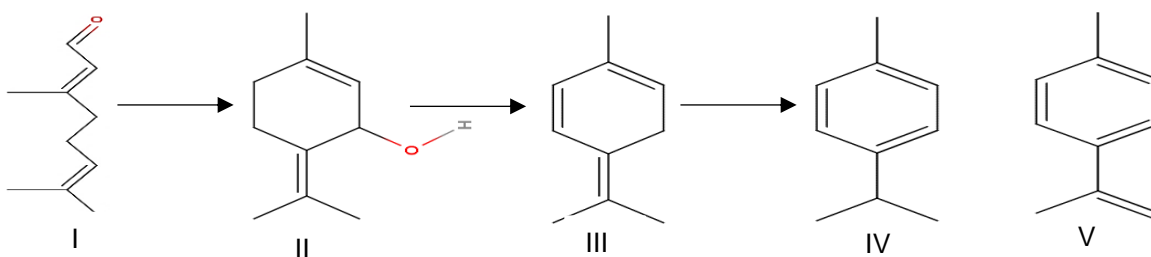


Figura 5. Ciclación del Citral (Baines, Jones, Webb, & Campion Smith, 1970).

Además, es una feromona y las abejas obreras lo segregan para marcar las flores aptas para la polinización. Se usa en perfumería y en la síntesis de la Vitamina A. Se utiliza también como aditivo en detergentes para añadirles el olor a limón. En la siguiente tabla (Tabla 1) se muestran las principales propiedades de este compuesto.

Tabla 1. Propiedades del Citral (Merck, Merck Millipore, 2012).

PROPIEDAD	RESULTADO
Masa molar	152.23 g/mol
Densidad	0.89 g/cm ³ (20°C)
Punto de ebullición	98°C
Punto de fusión	-20°C
Solubilidad en agua	0.42 g/L

2.1.2. 1,8-cineol (1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo(2,2,2)-octano).

Es encuentra presente en el aceite de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), romero (*Rosmarinus officinalis*) y árbol de té (*Melaleuca alternifolia*). Se trata de monoterpenoide con estructura de éter bicyclico (Figura 6) incoloro y miscible en alcohol, su olor varía entre el de la menta y la trementina. Se utiliza para dar sabor a los alimentos, como fragancia en cosméticos, como insecticida y repelente de insectos, se encuentra en muchos medicamentos (por su acción antiperitica, expectorante y antimicrobiana) como: ungüentos, cremas, inhaladores para aliviar la congestión nasal, medicamentos para el dolor en encías, boca y garganta y enjuagues bucales (Dorsam, Wu, Efferth, Kaina, & Fahrner, 2016), este terpeno inhibe el crecimiento celular del carcinoma hepatocelular (Rodenak-Kladniew, Castro, Starkel, Galle, & Crespo, 2020). Las características más relevantes se muestran en la Tabla 2.

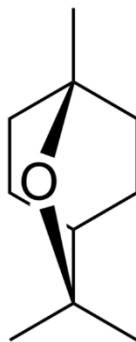


Figura 6. Estructura del 1,8-cineol.

Tabla 2. Propiedades del 1,8-cineol (Merck, Acerca de nosotros: Merck Millipore, 2017).

PROPIEDAD	RESULTADO
Masa molar	154.25 g/mol.
Densidad	0.925 g/cm ³ (20°C)
Punto de ebullición	49°C
Punto de fusión	1.5°C
Solubilidad en agua	3.5 g/L

En busca de resolver las limitaciones presentadas con anterioridad (estabilidad, solubilidad, volatilidad), se decidió usar las ciclodextrinas, debido a que son sustancias que poseen propiedades muy especiales que permiten mejorar la solubilidad, punto de ebullición, estabilidad, etc. de los compuestos, por lo que se convierten en una opción viable para resolver las limitantes que presentan los aceites esenciales y sus componentes.

2.2. Ciclodextrinas.

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos producidos por la degradación enzimática del almidón mediante la acción de la glucosiltransferasa proveniente del *Bacillus macerans* (Restrepo, Vinasco, Jaramillo, & Colmenares, 2009). Consisten en una serie de oligosacáridos cíclicos formados por 6 (α), 7 (β) u 8 (γ) unidades de α -D-[1,4] glucosa en forma de piranosa con una conformación de silla (Ol'khovich, Sharapova, Perlovich, Skachilova, & Zheltokhin, 2017), las unidades de glucopiranososa de una molécula están interconectadas por enlaces α -D-1,4-glucosídicos, que dan lugar a una estructura molecular toroidal (Figura 7), rígida y con una cavidad interior de volumen específico (Peraro, Aconi, & Aconi, 2018). La orientación especial de los grupos hidroxilo le da a la molécula propiedades físico-químicas únicas, ya que es capaz de contener moléculas hidrófobas en su interior, mientras que puede solubilizarse en medio acuoso (Andrade, Fredas, & Araujo, 2017).

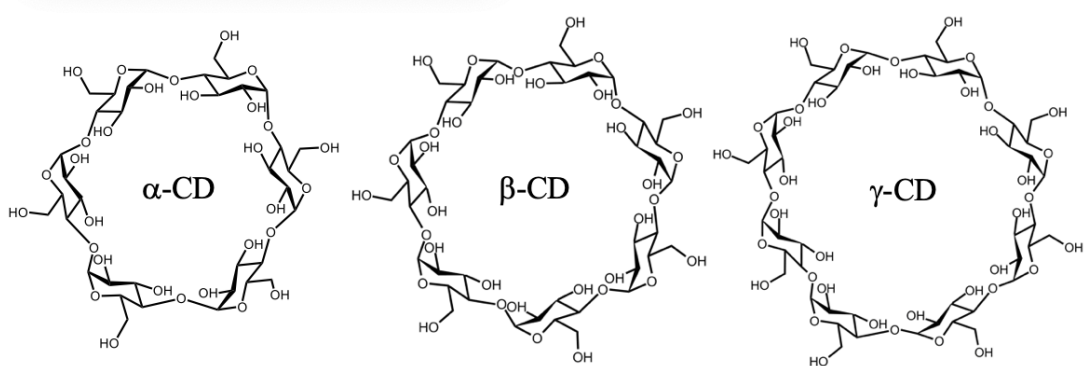


Figura 7. Estructura de α, β, γ-Ciclodextrina.

Las ciclodextrinas pueden incorporar moléculas apolares o partes de moléculas dentro de su cavidad hidrofóbica dando como resultado un complejo de inclusión (Peraro, Aconi, & Aconi, 2018), dentro de las ventajas que tienen los complejos de inclusión están: una mejor estabilidad, disminuir olor y sabor, una mayor solubilidad en agua y una mayor biodisponibilidad de las moléculas huésped o una disminución de los efectos secundarios indeseables de las moléculas hidrófobas en el caso de fármacos, así como convertir sustancias líquidas en polvos estables solubles en agua (Fourtaka, Chistoforides, Mentzafos, & Bethanis, 2018).

2.3. Complejos de Inclusión.

El proceso de complejación depende de varios factores como son: fisicoquímicos, estructura del huésped, el tipo de ciclodextrina, la temperatura y el pH. Las moléculas huésped pueden incluirse completa o parcialmente dentro de la cavidad según las fuerzas involucradas, incluidas las interacciones electrostáticas, van der Waals e hidrófobas, la formación de puentes de hidrogeno, la exclusión de las moléculas de agua de alta energía unidas a la cavidad y la interacción de transferencia de carga (Xavier Júnior, y otros, 2018).

La cavidad interior de las ciclodextrinas es hidrófoba, por lo que estos compuestos son capaces de albergar moléculas hidrófobas más pequeñas para formar complejos “anfitrión-huésped” (Figura 8), en los que la molécula huésped queda encapsulada. De esta forma, las ciclodextrinas pueden formar compuestos cristalinos a partir de moléculas orgánicas huésped en estado sólido, líquido e incluso gaseoso. En consecuencia, moléculas

insolubles en agua pueden llegar a ser completamente solubles mediante un tratamiento con disoluciones acuosas de ciclodextrina, sin que se produzca modificación química alguna en la molécula huésped, ya que no se origina ningún enlace covalente durante la interacción entre la ciclodextrina y la molécula huésped (Astray, Gonzalez Barreira, Mejuto, Rial Otero, & Simal Gándara, 2009).

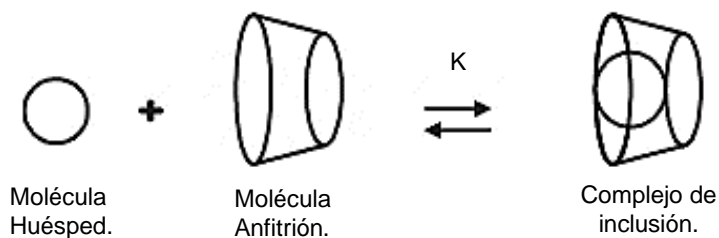


Figura 8. Formación de los complejos de inclusión.

La complejación se puede llevar a cabo con una gran variedad de aceites esenciales y sus aplicaciones van desde su encapsulación para incluirse en carne de res y así aumentar su vida útil (Lin, Dai, & Cui, 2017), ser agregados a diversos alimentos como verduras o frutas para protegerlo de los factores ambientales y del ataque de microorganismos, incluir el complejo en películas biodegradables y ser utilizados en empaques de alimentos (Días Antunes, Da Silva Dannenberg, Fiorentini, & Zanella Pinto, 2017).

2.4. Métodos de obtención Complejos de Inclusión.

Para la formación de estos complejos se han implementado diversos métodos de obtención, cada uno de ellos presentando diversas ventajas por lo que a continuación se describirán los más usados:

- **Complejación por Co-precipitación:** es el método más utilizado a nivel laboratorio. La complejación ocurre en un medio donde la ciclodextrina se disuelve por completo, a dicha solución se le agrega el aceite esencial, conforme la reacción avanza y cuando se aplica enfriamiento, se excederá la solubilidad del complejo de ciclodextrina-huésped causando la formación de precipitado el cual se puede recoger por decantación, centrifugación o filtración (Marreto R. N., y otros, 2008).

- Complejación por formación de pasta: en este tipo de método que usa cantidades pequeñas de agua, por lo tanto, la complejación ocurre en un medio donde la ciclodextrina no está completamente disuelta. La principal ventaja del método de pasta es la reducción de la cantidad de agua necesaria y el tamaño del reactor, lo que conduce a un proceso de escalamiento más sencillo y menores costos de producción (Marreto R. N., y otros, 2008).
- Complejación por Liofilización: es una variante del método de co-precipitación ya que se debe preparar una solución de ciclodextrina para después agregar el aceite esencial, una vez terminada la reacción se lleva a cabo la liofilización para eliminar la humedad y así obtener el complejo en estado sólido (Rakmai, Cheirsilp, Mejuto, Torrado Agrasar, & Simal Gondasa, 2017).
- Complejación con fluidos supercríticos: las ventajas que se obtienen al utilizar estos fluidos como el CO₂ es que son ecológicamente compatibles, se eliminan fácilmente e inclusive pueden ser reusados. El principal problema que se presenta al querer utilizar este método es el equipo que se requiere para obtener los fluidos supercríticos. El disolvente más utilizado para la preparación de complejos de inclusión es el CO₂-SC. (Restrepo, Vinasco, Jaramillo, & Colmenares, 2009).

2.5. Métodos de Caracterización.

Una vez que se ha llevado a cabo la complejación se deben de realizar una serie de pruebas para poder demostrar que los complejos de inclusión se formaron con éxito, si los complejos obtenidos son sólidos se caracterizan mediante: microscopía electrónica de barrido (SEM), difracción de rayos X. Si el complejo obtenido se encuentra en solución las técnicas que se pueden utilizar son: espectroscopia ultravioleta, calorimetría de barrido diferencial (DSC), calorimetría de titulación isotérmica (ITC) y espectroscopia infrarroja para ambos casos (Abarca, Rodriguez, Guarda, Galatto, & Bruna, 2016).

El presente trabajo se enfocará en la determinación de las constantes de equilibrio de los complejos de inclusión por medio de las técnicas de ITC y espectrofotometría de UV-Vis, por lo cual a continuación se describen a detalle estas dos últimas técnicas.

2.5.1. Calorimetría de titulación isotérmica.

La técnica de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) se basa en la medición del calor generado o absorbido debido a la interacción entre dos moléculas a lo largo de una titulación en una celda termostataada. La técnica ITC es considerada como una metodología muy conveniente para cuantificar la cantidad de moléculas reactivas, ya que casi todas las reacciones químicas producen o absorben calor. Una de las principales ventajas que presenta esta técnica es que las mediciones calorimétricas se pueden realizar con especies que son espectroscópicamente silenciosas, así como en soluciones heterogéneas o turbias y en un rango de condiciones amplio como: temperatura, concentración de sal, pH, entre otras (Mazzei, Ciurli, & Zambell, 2016).

ITC es un método sensible disponible para la determinación de la estequiometría de reacción (N), la constante de equilibrio (K) (también llamada constante de estabilidad o asociación) y el cambio de entalpía (ΔH), que refleja el calor liberado o absorbido durante la interacción. Además, también proporciona datos de entropía (ΔS) y la energía libre de Gibbs del proceso (ΔG) (Bouchemal & Mazzaferro, 2012).

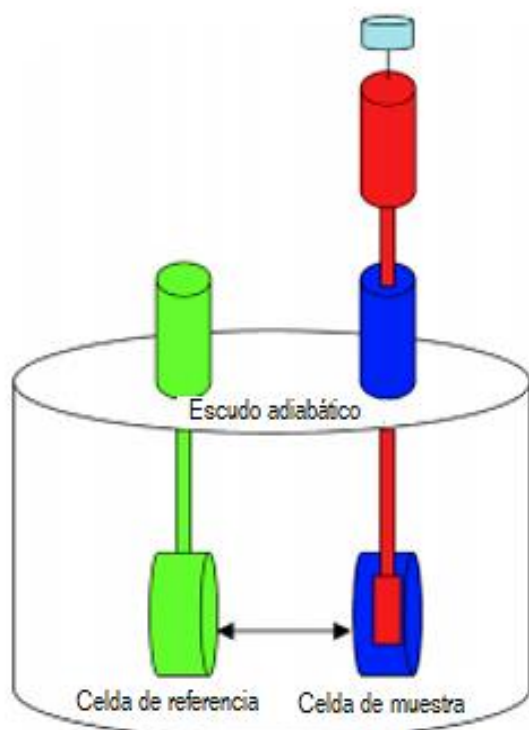


Figura 9. Esquema de calorímetro de titulación isotérmica (Mazzei, Ciurli, & Zambell, 2016).

El instrumento (Figura 9) está hecho de un escudo adiabático que contiene dos celdas de forma acuñada, conectadas al exterior con tubos de acceso estrechos. La celda de medición se carga con la solución receptora, mientras que la celda de referencia generalmente se llena con agua o con el disolvente utilizado para el análisis. Una jeringa giratoria con una aguja larga y una paleta de agitación adjunta que se monta en la celda de muestra y realiza inyecciones consecutivas de pequeños volúmenes (5–10 μL) de la solución de ligante (Bouchemal & Mazzaferro, 2012). Un dispositivo termoelectrónico mide la diferencia de temperatura entre la muestra y la celda de referencia, y al usar una red de

retroalimentación de celda, mantiene esta diferencia en cero agregando o restando calor a la celda de muestra.

Durante la experimentación, el ligante se inyecta con la jeringa a la solución receptora a una temperatura constante. Conforme se va agregando el ligante a la muestra, las dos moléculas interactúan y el calor es proporcional a la cantidad de sustrato agregado a la solución receptora. A medida que la cantidad de analito se satura con el ligante, la señal de calor ira disminuyendo gradualmente (Figura 10a). Con los datos de calor del sistema se genera una isoterma de enlace, la cual representa el grado de saturación de la muestra con base a la relación molar del sustrato adicionado sobre la muestra, por lo tanto, el grado de saturación será definido en función del calor de la reacción. La diferencia del calor total de la titulación indicará el cambio de entalpía, la pendiente de la curva en el punto de inflexión está asociada el valor de la constante de equilibrio y el valor de la relación molar en el punto de inflexión de la curva corresponderá a la estequiometría de la reacción (Figura 10b), siempre y cuando se forme un solo complejo en él sistema (Martínez Mendoza, 2015).

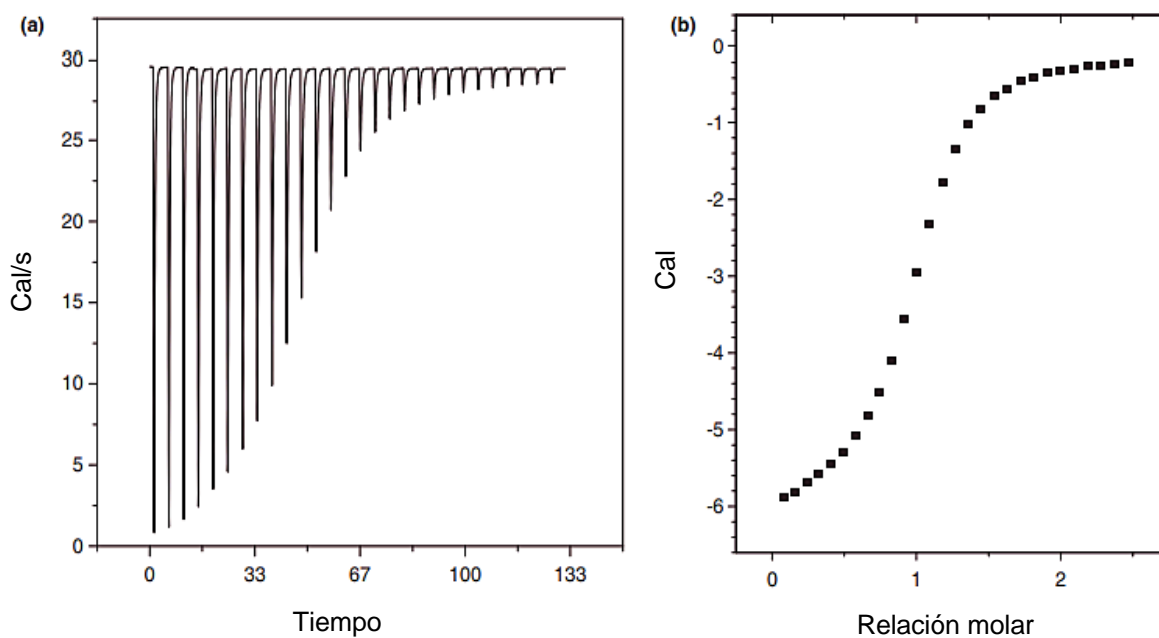


Figura 10. a) Termograma, reacción exotérmica; b) Isotherma de enlace (Bouchemal & Mazzaferro, 2012).

2.5.2. Espectrofotometría de absorción molecular UV-Visible.

Es una de las técnicas más ampliamente utilizadas para el análisis químico, se utiliza para distintos estudios de caracterización, entre ellos la determinación de la estequiometría de los complejos y de las constantes de equilibrio (Harvey, 2002).

El espectrofotómetro es un instrumento utilizado para medir la cantidad de luz que absorbe un compuesto (Figura 11), está diseñado para medir entre 200 a 1000 nm, lo que comprende la región de UV-Vis (Skoog & West, 1986):

- Fuente de luz: las fuentes más empleadas son la lámpara de tungsteno y la de deuterio.
- Monocromador: El colimador se ubica entre la rendija de entrada y salida. Es un lente que lleva el haz de luz que entra con una determinada longitud de onda hacia un prisma el cual separa todas las longitudes de onda de ese haz y la longitud deseada se dirige hacia otra lente que direcciona ese haz hacia la rendija de salida.
- Compartimento de muestra: lugar donde se da la interacción del haz de luz con la muestra.
- Celda: son los recipientes donde se depositan las muestras líquidas a analizar, el material del cual están hechas varía de acuerdo a la región donde se va a trabajar de vidrio o plástico si se trabaja en la región del visible y cuarzo si se trabaja en el ultravioleta.
- Detector: encargado de captar la radiación y transformarla en datos que puedan ser analizados.

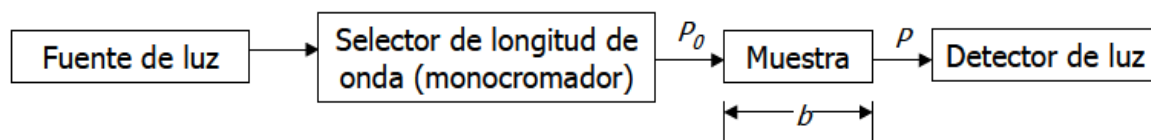


Figura 11. Principio de la medición espectrofotométrica (Skoog & West, 1986).

Para que una sustancia sea activa en el rango del visible (380-750 nm) debe ser colorida. La Tabla 3 nos da una relación entre rango de longitudes de onda en que absorbe el compuesto, color absorbido y color observado o transmitido (Domínguez Castañeda, 2012).

Existen dos regiones en el rango del Ultravioleta, el ultravioleta del vacío (100-190 nm) y el ultravioleta cercano (190-380 nm). El primero se conoce así debido a que el nitrógeno atmosférico absorbe este tipo de radiación, por lo que se debe llevar a cabo el vacío para poder excluir las absorbancias del nitrógeno de las del compuesto en estudio, la complicación de llegar a condiciones de vacío, es una de las principales razones por la cual el que este rango del espectro electromagnético (100-190 nm) no tiene una aplicación.

El espectro Ultravioleta y Visible de las moléculas está asociado a transiciones electrónicas entre los diferentes niveles energéticos en ciertos grupos o átomos de la molécula y no caracterizan a la molécula como entidad. En contraste la absorción de energía en la región Infrarroja estimula a la molécula completa y causa cambios vibracionales y rotacionales en esta lo cual caracteriza la entidad estructural de dicha molécula (Harvey, 2002).

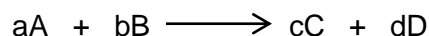
Los grupos de átomos que dan origen a la absorción en el UV cercano, se conocen como grupos cromóforos. La mayoría de los grupos insaturados y heteroatómicos que tienen pares de electrones no compartidos, son cromóforos potenciales y estos grupos son la base de la elucidación de grupos estructurales en las moléculas activas en el UV cercano.

Tabla 3. Diferentes regiones del espectro Ultravioleta y visible y sus longitudes de onda comprendidas.

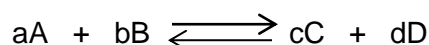
Longitudes de onda (nm)	Color absorbido	Color observado
100-190	Ultravioleta del vacío	Ninguno
190-380	Ultravioleta cercano	Ninguno
380-435	Violeta	Amarillo-Verde
435-480	Azul	Amarillo
480-500	Verde-Azul	Naranja-Rojo
500-560	Verde	Purpura
560-580	Amarillo-Verde	Violeta
580-595	Amarillo	Azul
595-650	Naranja	Verde-Azul
650-780	Rojo	Azul-Verde

2.6. Equilibrio químico.

Una reacción química es un proceso mediante el cual una o varias sustancias (reactivos) se transforman en otra u otras de una composición diferente (productos). De forma general:



Se debe de considerar que la mayoría de las reacciones químicas son reversibles, lo que significa que los productos de reacción son capaces de reaccionar entre sí para dar lugar a los reactivos. Es por eso que normalmente el proceso se escribe de la siguiente manera:



Lo que indica que existe reacción química tanto entre A y B para dar lugar a C y D, como entre estos para producir A y B, esto quiere decir, que una vez que la reacción inicia siempre existe una mezcla de las cuatro sustancias. Con el paso del tiempo la cantidad de C y D que se forma como consecuencia de la reacción entre A y B queda exactamente compensada por la cantidad de C y D que desaparece debido a su reacción para dar lugar a A y B. en esta situación se dice que se ha alcanzado el “equilibrio químico” y a partir de este momento las cantidades de todas las especies presentes permanecen constantes (Belarra Piedrafita, 2002).

2.6.1. Constante de equilibrio.

Al estudiar reacciones químicas es de suma importancia conocer la cantidad existente de cada una de las sustancias cuando se ha alcanzado el equilibrio químico. La relación entre ellas cumple la “ley de acción de masas” la cual establece que, a una temperatura y presión constante, el producto de las concentraciones molares de los productos de reacción elevadas a sus coeficientes estequiométricos, dividido por el producto de las concentraciones molares de los reaccionantes elevadas a sus coeficientes estequiométricos, es un valor constante, que se denomina como constante de equilibrio (K) (Harris, 2001).

$$K = \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b}$$

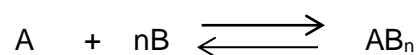
Donde [A], [B], [C] y [D] son las concentraciones molares de las especies al alcanzarse el equilibrio químico de la reacción y se denominan comúnmente como “concentraciones en el equilibrio”.

El valor de la constante de equilibrio nos indica la reacción que es predominante, de forma que cuanto mayor sea su valor, mayor es la tendencia a que se formen los productos de la reacción y menor será la cantidad de los reactivos que permanezcan como tales (Belarra Piedrafita, 2002).

La determinación de constantes de equilibrio se puede realizar usando los métodos de relaciones molares y variaciones continuas. En el presente trabajo se utilizó el método de relaciones molares.

2.6.2. Método de relaciones molares.

Consideremos la siguiente reacción para explicar el método:



En este método, el número de moles de uno de los reactivos (A o B) se mantienen constante, mientras que los de la otra especie varía. La absorbancia se fija en una longitud de onda en la que el complejo de interés absorbe.

La representación gráfica de este método (Figura 12) está dada por la absorbancia en función de la relación molar de los reactivos (n_A/n_B) la cual se calcula a partir del número de moles de cada reactante. Se obtienen dos rectas que se cruzan en el punto de la relación molar correspondiente al punto estequiométrico del complejo, en el caso de que el complejo se encuentre muy poco disociado (Harvey, 2002).

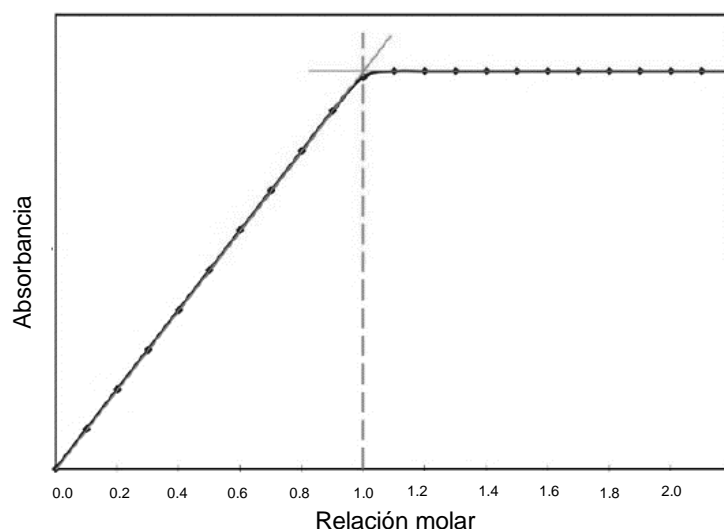


Figura 12. Representación gráfica del método de relaciones molares.

En un inicio este método se consideró aplicable solo para sistemas en los que se forma un solo complejo. Sin embargo, se puede usar para reacciones de complejación en las que se producen de manera progresiva varios complejos, con la condición que las absorptividades molares de los complejos sean diferentes y que las constantes de formación sean también lo suficientemente distintas, en la Figura 13 se muestra una gráfica típica de la relación molar para la formación progresiva de AB y AB₂ (Harvey, 2002).

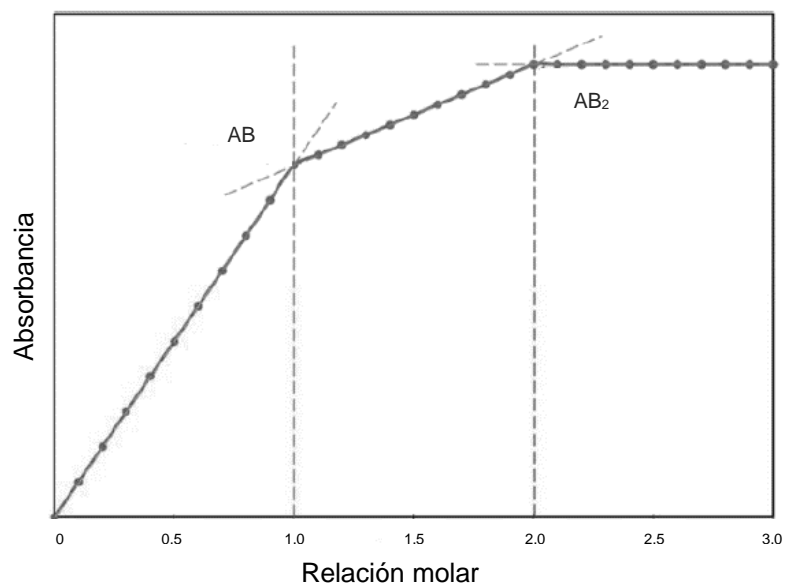


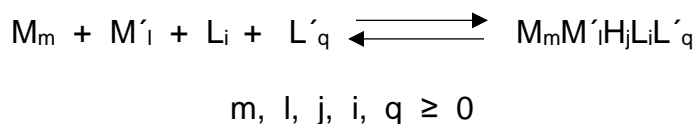
Figura 13. Gráfica de la formación de más de un complejo.

El método gráfico de Relaciones Molares presenta varias limitaciones, como el uso de pocos puntos experimentales, que el complejo formado absorba en una longitud de onda diferente a la de los reactivos, que la cuantitatividad de la o las reacciones sea grande, si se forma más de un complejo, puede generar interferencia si no tiene una banda de absorción característica, etc. Sin embargo, los resultados experimentales obtenidos con la metodología de Relaciones Molares, utilizados junto con potentes programas computacionales como SQUAD y TRIANG, que permitan utilizar todos los datos del espectro, pueden ser muy útiles para determinar los valores de constantes de equilibrio en sistemas multicomponentes y poco cuantitativos.

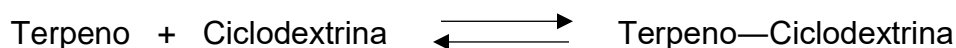
2.7. Programa SQUAD.

SQUAD (Stability Quotients from Absorbance Data) es un programa escrito en lenguaje FORTRAN. Es capaz de calcular simultánea o individualmente, las constantes de estabilidad global para cualquier especie formada en sistemas que contienen hasta dos metales y dos ligandos. El programa es capaz de producir, a partir de datos de absorbancia apropiados a diferentes composiciones químicas, constantes de asociación ácida (pKa), constantes de hidrólisis de iones metálicos, constantes de estabilidad de complejos simples (ML, ML₂, etc.) y constantes de estabilidad de complejos polinucleares (M₂L₃, M₂L₂H, M₃L₄(OH)₂, etc.) (Leggett & McBryde, 1975).

El modelo químico propuesto puede ser dependiente o independiente del pH y puede tener especies del tipo, si j es positivo (protón), negativo (ion hidróxido) (Leggett, 1985)



En este trabajo, SQUAD será ocupado para la siguiente interacción general:



SQUAD calcula los valores de la (s) constante (s) de formación general que minimizan la suma de los cuadrados residenciales entre los valores de absorbancia observados y calculados (Leggett, 1985).

$$U = \sum_{i=1}^I \sum_{k=1}^{NW} (A_{l,k}^{obs} - A_{l,k}^{cal})^2$$

Donde:

I= todas las soluciones.

NW= todas las longitudes de onda.

A^{cal}_{l,k}= absorbancia calculada por SQUAD en la i-ésima disolución a la k-ésima longitud de onda.

A^{obs}_{l,k}= absorbancia experimental en la i-ésima solución a la k-ésima longitud de onda.

La resolución de la minimización requiere del cálculo de las absorbancias a la k-ésima longitud de onda en la i-ésima solución (Leggett, 1985).

La convergencia se da si la diferencia en la minimización de un ciclo iterativo a otro, difiere como máximo 0.001. que el criterio se cumpla no significa que se tiene el mejor refinamiento de constantes, debido a que se puede caer en el caso de una convergencia en un mínimo relativo (Domínguez Castañeda, 2012).

Los parámetros estadísticos que emplea SQUAD para determinar si el modelo químico propuesto explica la información experimental alimentada son los siguientes:

- Parámetros de correlación (matriz).
- La desviación estándar sobre los datos de absorbancia (σ_{datos}) y de las constantes (σ_{ctes}).
- La desviación estándar por espectro (σ_{espectro}).
- La desviación estándar sobre los coeficientes de absortividad molar (σ_{coef}).

El proceso de selección del mejor modelo químico no se basa solamente en la obtención de los mejores parámetros estadísticos, también se debe verificar la consistencia del mismo. Es decir, los coeficientes de absortividad molar calculados para cada una de las especies sean congruentes con el comportamiento experimental y que las especies refinadas puedan predominar bajo las condiciones experimentales trabajadas (Cedillo Flores, 2019).

2.8. Programa TRIANG.

Este programa está escrito en lenguaje FORTRAN. El listado de este programa se reporta en el libro “Solution equilibria” (Domínguez Castañeda, 2012). TRIANG determina el número más probable de especies químicas que absorben radiación electromagnética de un conjunto de absorbancias a diferentes longitudes de onda (Castañeda Ovando, Galán Vidal, Contreras López, & Páez Hernández, 2014).

La forma de establecer si una especie química absorbe radiación electromagnética involucra una comparación entre valores de absorbancia y los errores asociados a las mismas, suponiendo el cumplimiento de la ley de Beer y ley de aditividades.

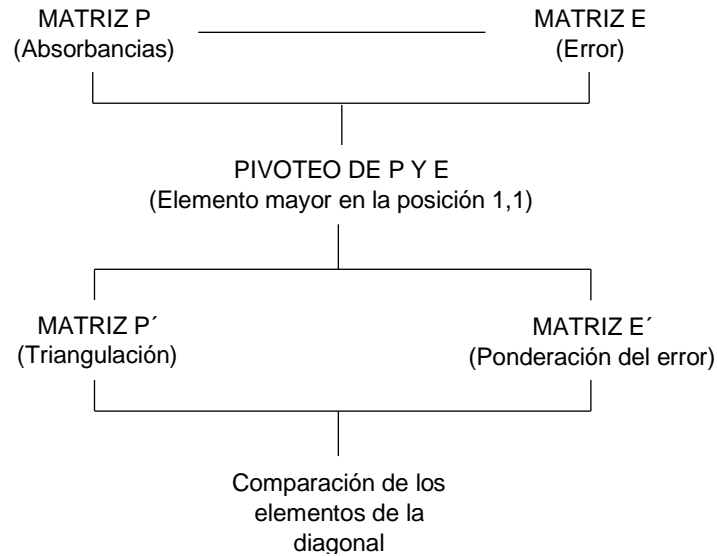


Figura 14. Algoritmo del programa TRIANG.

Al comparar las diagonales (Figura 14), verifica si el elemento E' (ponderación del error) de la matriz del error multiplicado por 3 es menor que el elemento P' (triangulación) de la matriz de absorbancias, entonces se concluye que este elemento diagonal de la matriz de absorbancias es diferente de cero. En caso contrario se concluye que este elemento es igual a cero (Resendiz Gonzalez, 2005).

El número de especies que informa el programa depende del valor de ΔT , que debe evaluarse a partir de los errores involucrados en la preparación de soluciones y los instrumentos aplicando la teoría de la propagación de errores. Considerando un ΔT de 0.003 a 0.010 (Castañeda Ovando, Galán Vidal, Contreras López, & Páez Hernández, 2014).

El error en las lecturas de transmitancia (ΔT) es igual a:

$$\Delta T = \left(Error_{instrumental}^2 - Error_{volumetrico}^2 \right)^{1/2}$$

El error experimental es igual al error que se comete en las lecturas de absorbancia y está en función directa del espectrofotómetro usado. El error volumétrico asociado fundamentalmente al material utilizado en el experimento para la manipulación y medición de líquidos (Resendiz Gonzalez, 2005).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

3.1. Hipótesis.

Si se obtienen los perfiles termodinámicos de las inclusiones del Citral y el 1,8-cineol con β -Ciclodextrina empleando las técnicas de espectrofotometría UV-Vis y calorimetría ITC, entonces será posible establecer las condiciones óptimas para la preparación del complejo de inclusión y evaluar el efecto de la inclusión sobre la estabilidad, solubilidad y actividad antioxidante de los complejos de inclusión.

3.2. Objetivo General.

Determinar los parámetros termodinámicos de la inclusión de los terpenos Citral y 1,8-cineol con β -Ciclodextrina (β -CD), mediante espectrofotometría UV-Vis y calorimetría ITC. Demostrar los efectos de la inclusión sobre la estabilidad, solubilidad y actividad antioxidante de los aceites esenciales.

3.3. Objetivos Particulares.

- Estudiar el sistema Citral— β -CD en agua para la determinación de la estequiometría y constante de inclusión.
- Determinar los perfiles termodinámicos para las reacciones de Citral— β -CD y 1,8-cineol— β -CD.
- Determinar ΔC_p de la interacción de los terpenos con β -CD.
- Estudiar el efecto de la ciclodextrina sobre la estabilidad del Citral.
- Realizar pruebas de solubilidad a los productos de la inclusión entre el Citral con β -CD.
- Determinar la actividad antioxidante de los terpenos y de los complejos de inclusión.

4. METODOLOGÍA.

4.1. Procedimiento para determinación de la estabilidad de soluciones de Citral en medio ácido, básico y neutro.

- Preparación de disoluciones.

Citral: preparar 100 mL de disolución con una concentración de 10^{-4} M.

HCl: preparar 100 mL de disolución con una concentración 10^{-2} M.

NaOH; preparar 100 mL de disolución con una concentración 10^{-2} M.

- Procedimiento para la determinación de estabilidad de Citral.

Preparar tres sistemas de Citral a partir de la solución de 10^{-4} M, a diferentes valores de pH (2.60, 7.30 y 11.06) en matraces de 10 mL, como se muestra en la Tabla 4

Tabla 4. Preparación de sistemas para prueba de estabilidad.

	HCl (mL)	NaOH (mL)	Citral (mL)
Medio ácido	1	0	5
Medio neutro	0	0	5
Medio básico	0	1	5

Los sistemas se protegieron del aire y la luz cada vez que se tome el barrido de cada sistema.

A los sistemas se les determinó el espectro de absorción UV-Vis en un rango de longitud de onda de 200 a 300 nm, el barrido se llevó a cabo cada 24 h por un periodo de 7 días. Pasado este tiempo se determinó el porcentaje de degradación del Citral en cada sistema.

4.2. Procedimiento para la determinación de la constante de inclusión del Citral con β -CD por espectrofotometría UV-Vis.

- Preparación de disoluciones.

Buffer de fosfatos (pH= 7.00): preparar 1 L de disolución con una concentración 0.1 M, a partir de Na_2HPO_4 .

β -CD: preparar 100 mL de disolución en buffer de fosfatos con una concentración 0.01 M.

Citral: preparar 100 mL de disolución en buffer de fosfatos con una concentración 10^{-4} M y protegerla del aire y luz.

Citral: preparar 10 mL de disolución en buffer de fosfatos con una concentración 5×10^{-5} M a partir de la disolución de Citral 10^{-4} M.

- Método de relaciones molares para sistema de Citral.

El procedimiento se realizó manteniendo la concentración de Citral constante. Se tomaron 10 mL de la solución de Citral 5×10^{-5} M y se fue adicionando la solución de β -CD en volúmenes de 0.1 en 0.1 mL hasta llegar a 2 mL, de 0.5 en 0.5 mL hasta llegar a los 5 mL y de 1 en 1 mL hasta alcanzar los 9 mL de β -CD, manteniendo un pH fijo de 7 y una temperatura de 25 °C, obteniendo los espectros de absorción UV-Vis en cada adición en un rango de longitud de onda de 200 a 300 nm. Una vez obtenidos los espectros, se realizó el análisis de resultados.

El procedimiento se ejecutó por triplicado. Este procedimiento solo fue posible realizarlo con el Citral debido a que el 1,8-cineol es una especie que no absorbe en el rango UV-Vis y por lo tanto es espectroscópicamente silenciosa.

4.3. Procedimiento para la determinación de la constante de inclusión de las reacciones de terpenos (Citral, 1,8-cineol) con β -CD por calorimetría.

- Preparación de disoluciones.

β -CD: preparar 100 mL de disolución en buffer de fosfatos con una concentración 4.003×10^{-3} M.

Citral: preparar 100 mL de disolución en buffer de fosfatos con una concentración 10^{-4} M.

1,8-cineol: preparar 100 mL de disolución en buffer de fosfatos con una concentración 10^{-4} M.

- Micro titulación por ITC.

Las condiciones de la titulación fueron las mismas para ambos terpenos las cuales se muestran en Tabla 5. El procedimiento se realizó por triplicado para cada uno de los terpenos a 25 °C.

Tabla 5. Condiciones de experimentación para ITC.

[Terpeno] (mM)	[β -CD] (mM)	Vol./inyección (μ L)	Duración/ Inyección (segundos)	Núm. De Inyecciones	Espaciado (segundos)
0.1	4.003	8	16	29	400

Se coloca la solución de terpeno en buffer de fosfatos (pH= 7) en la celda de reacción y se titula con la disolución de β -CD, para estos experimentos se realizan dos titulaciones:

1. La titulación del terpeno con la β -CD.
2. La titulación del disolvente con la β -CD (titulación de dilución).

La titulación de dilución se realiza para corregir el calor generado por la ciclodextrina al momento de ser agregada a la celda de reacción.

4.4. Determinación de ΔC_p de la complejación de los terpenos (Cital, 1,8-cineol) con β -CD.

- Preparación de disoluciones.

Se utilizaron las disoluciones de terpenos (10^{-4} M) y β -CD (4.003×10^{-3} M) descritas en el apartado 4.3.

- Procedimiento para la micro-titulación por ITC.

Para la determinación del ΔC_p de cada complejo de inclusión se obtuvieron los valores de ΔH a cuatro diferentes temperaturas (20, 25, 30 y 35 °C) para cada compuesto. Las condiciones experimentales son las mismas que se ocuparon para la determinación de la constante de inclusión (apartado 4.4, Tabla 5). De igual forma cada una de las titulaciones se realizaron en medio amortiguado con buffer de fosfatos (pH= 7) tanto en las soluciones de los terpenos como en la de β -CD.

Se llevaron a cabo dos titulaciones por experimento (la titulación del terpeno con β -CD y titulación del buffer con β -CD). Cada experimento se llevó a cabo por triplicado y se procedió para realizar el análisis de resultados.

4.5. Estabilidad del complejo de inclusión Citral— β -CD, por espectrofotometría UV-Vis.

- Preparación de disoluciones.

β -CD: preparar 100 mL de disolución con una concentración 1.3674×10^{-2} M.

Se ocuparon las mismas disoluciones (Citral 10^{-4} M, HCl 10^{-2} M y NaOH 10^{-2} M) del apartado 4.1.

- Procedimiento.

Se prepararon 3 sistemas del complejo de inclusión a partir de la solución de Citral (10^{-4} M) y β -CD (1.3674×10^{-2} M) a diferentes valores de pH (ácido, neutro y básico), en matraces de 10 mL el procedimiento para la preparación se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Preparación para la estabilidad del complejo de inclusión.

	Citral (mL)	β -CD (mL)	HCl (mL)	NaOH (mL)
Complejo ácido	5	4	1	0
Complejo neutro	5	4	0	0
Complejo básico	5	4	0	1

Los sistemas se protegieron del aire y la luz cada vez que se tome el barrido de cada sistema.

Se realizó un monitoreo a cada sistema similar al descrito en el apartado 4.2, una vez concluido el tiempo de monitoreo se procedió a calcular el porcentaje de degradación del complejo de inclusión (Citral— β -CD) para ser comparados con los porcentajes calculados para los sistemas de Citral.

4.6. Determinación de la solubilidad del complejo de inclusión Citral— β -CD.

- Preparación de soluciones.

β -CD: preparar 100 mL de disolución con una concentración de 10^{-3} M.

- Procedimiento.

Se prepararon 10 sistemas de concentraciones crecientes de β -CD a partir de la solución 10^{-3} M a las cuales se les agregó un exceso de Citral (55 μ L) en matraces de 10 mL, la preparación se muestra en la siguiente tabla (Tabla 7).

Tabla 7. Preparación para prueba de solubilidad.

Sistema.	Volumen β -CD (μ L).	Citral (μ L).	Concentración final β -CD (M).
0	0	55	0
1	100	55	1×10^{-5}
2	200	55	2×10^{-5}
3	300	55	3×10^{-5}
4	400	55	4×10^{-5}
5	500	55	5×10^{-5}
6	600	55	6×10^{-5}
7	700	55	7×10^{-5}
8	800	55	8×10^{-5}
9	900	55	9×10^{-5}

Cada sistema se protegió del aire y luz, se mantuvo en agitación durante 48 horas.

Pasado el tiempo se filtró por gravedad cada uno de los sistemas, se tomaron 150 μ L de la solución filtrada y se aforo a 10 mL, se realizó un barrido espectrofotométrico a cada sistema desde 200 a 300 nm. Tomando la longitud máxima del espectro citral (244 nm) y con ayuda de la ecuación de la recta, se calculó la cantidad disuelta del complejo de inclusión en cada sistema.

4.7. Determinación de la actividad antioxidante del complejo de inclusión Citral— β -CD.

- Preparación de disoluciones.

Azul de cresilo brillante (ACB): preparar 100 mL de disolución con una mezcla etanol-agua en relación 3:1 y 165 μ L del colorante.

Hipoclorito comercial: preparar 10 mL de disolución con 5.5 mL de la muestra comercial de hipoclorito (Cloralex).

Citral: preparar 100 mL de disolución con una concentración de 10^{-3} M.

- Procedimiento.

Se utilizó cada una de las soluciones filtradas de cada sistema en la prueba de solubilidad apartado (4.6), formando los siguientes sistemas (Tabla 8).

Tabla 8. Prueba de capacidad antioxidante del complejo de inclusión de Citral.

Sistema	Volumen ACB (mL)	Volumen de Complejo (mL)	Citral— β -CD (M)
0	7.5	2.5	4.68×10^{-5}
1	7.5	2.5	4.87×10^{-5}
2	7.5	2.5	5.14×10^{-5}
3	7.5	2.5	5.20×10^{-5}
4	7.5	2.5	5.27×10^{-5}
5	7.5	2.5	5.33×10^{-5}
6	7.5	2.5	5.38×10^{-5}
7	7.5	2.5	5.48×10^{-5}
8	7.5	2.5	5.78×10^{-5}
9	7.5	2.5	5.85×10^{-5}

A cada sistema se les agregaron 100 μ L de la solución de hipoclorito y se dejó en agitación durante 5 min de acuerdo al procedimiento reportado (Noacco, Rodenak Kladniew, García de Bravo, Castro, & Islan, 2018), pasado ese tiempo se procedió a realizar barrido espectrofotométrico de 400 a 800 nm. Se tomó el valor de absorbancia a la longitud de onda (630 nm) para poder realizar los cálculos de degradación del colorante.

Para poder comparar la efectividad del complejo de inclusión, se realizó la misma prueba de actividad antioxidante, con 7.5 mL de la solución de ACB y cantidades crecientes de Citral a partir de la solución de 10^{-3} M, la preparación se muestra en la Tabla 9, una vez preparadas las soluciones se siguió el mismo procedimiento para el complejo de inclusión.

Tabla 9. Actividad antioxidante Citral.

Sistema	Volumen ACB (mL)	Volumen Citral (mL)	Citral (M)
1	7.5	0.1	1×10^{-5}
2	7.5	0.5	5×10^{-5}
3	7.5	1	1×10^{-4}
4	7.5	2.5	2.5×10^{-4}

4.8. Determinación de la capacidad antioxidante del complejo de inclusión 1,8-cineol— β -CD.

- Preparación de disoluciones.

Solución de β -CD: preparar 100 mL de disolución con una concentración de 10^{-2} M.

ACB: se utilizó la solución descrita en el apartado 4.7.

Hipoclorito: se utilizó la solución descrita en el apartado 4.7.

1,8-cineol: preparar 100 mL de disolución con una concentración de 10^{-3} M.

- Procedimiento.

Para la cuantificación de la actividad antioxidante del complejo de inclusión, se procedió a preparar en matraces de 10 mL, los sistemas mostrados en la Tabla 10, una vez preparado cada sistema, se le colocó un exceso de 1,8-cineol (55 μ L), los sistemas se dejaron en agitación durante 48 hrs. Pasado el tiempo, se procede a filtrar cada uno de los sistemas.

Tabla 10. Preparación de Sistemas β -CD con 1,8-cineol.

Sistema	Volumen β -CD (mL)	Concentración final β -CD (M)	1,8-cineol (μ L)
0	0	0	55
1	1	9.997×10^{-4}	55
2	2	1.9995×10^{-3}	55
3	3	2.9992×10^{-3}	55

4	4	3.9990×10^{-3}	55
5	5	4.9987×10^{-3}	55
6	6	5.9985×10^{-3}	55

Una vez filtradas las soluciones con el sobrenadante (complejo disuelto), se prepararon los sistemas con el colorante ACB (Tabla 11).

Tabla 11. Prueba de Actividad antioxidante del complejo de inclusión de 1,8-cineol.

Sistema	Volumen ACB (mL)	Volumen complejo (mL)	Volumen final (mL)
0	7.5	2.5	10
1	7.5	2.5	10
2	7.5	2.5	10
3	7.5	2.5	10
4	7.5	2.5	10
5	7.5	2.5	10
6	7.5	2.5	10

Ya preparados los sistemas se siguió el mismo procedimiento descrito en el apartado 4.7.

Para poder tener un punto de referencia se realizó la misma prueba de actividad antioxidante en varias soluciones de diferentes concentraciones de 1,8-cineol, a partir de la solución de 10^{-3} M (Tabla 12), cada matraz contenía 7.5 mL de la solución de ACB, los cuales se aforaron con agua, hasta tener un volumen final de 10 mL.

Tabla 12. Actividad antioxidante 1,8-cineol.

Sistema	Volumen 1,8-cineol (mL)	Colorante ACB (mL)	Concentración final 1,8-cineol (M)
1	0.1	7.5	1.01×10^{-5}
2	0.5	7.5	5.05×10^{-5}
3	1	7.5	1.09×10^{-4}
4	2.5	7.5	2.52×10^{-4}

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS.

5.1. Estabilidad del Citral.

Para determinar las condiciones óptimas de trabajo se prepararon tres sistemas de Citral a la misma concentración (5×10^{-5} M) en medio ácido, básico y neutro los cuales se monitorearon por un periodo de 7 días (Figura 15). Como se puede observar en medio ácido la absorbancia máxima (244 nm) decae pasadas las primeras 24 horas (51.73%) lo que indica que el terpeno se está degradando, sin embargo, en medio neutro y básico la absorbancia no cambia significativamente (7.46 y 5.73 %, respectivamente) en los primeros 2 días. Sin embargo, conforme va pasando el tiempo se puede observar que en estos dos medios (neutro y básico) la absorbancia también decae indicativo que el compuesto termina por degradarse. Para la determinación de la constante de inclusión se decidió trabajar en medio neutro y con soluciones hechas el mismo día de la determinación, para evitar la degradación oxidativa que puede ocurrir en este compuesto se tomó como medida preventiva, agregar nitrógeno gaseoso en cada solución para de esta manera mantener una atmósfera inerte y así alargar la vida útil de las soluciones.

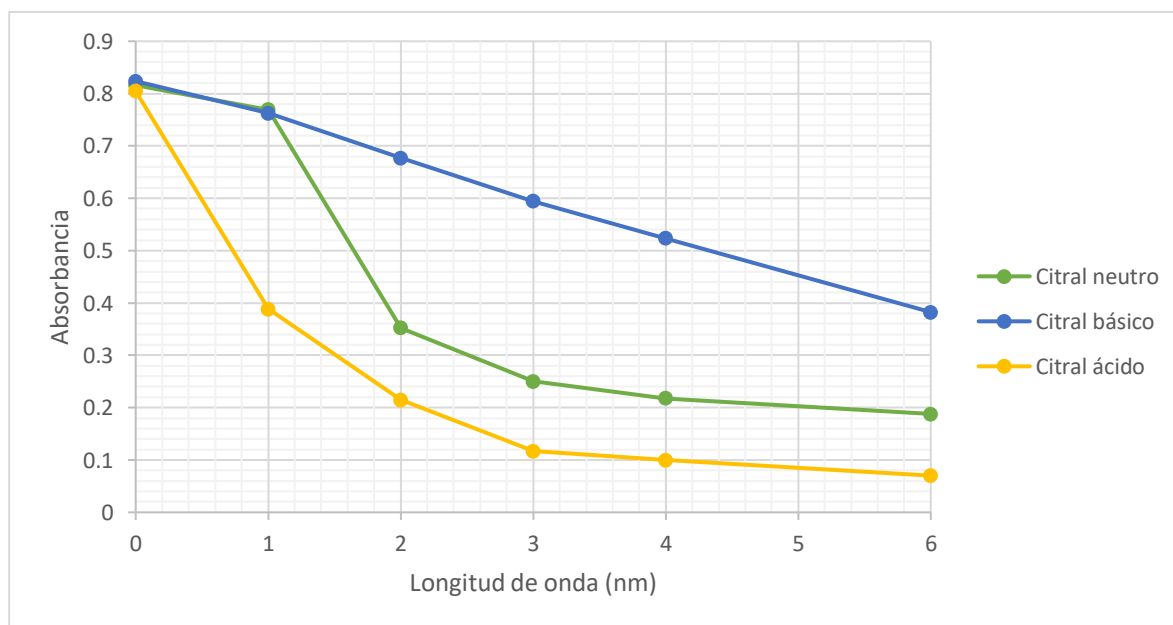


Figura 15. Estabilidad del Citral en función del tiempo y pH.

5.2. Determinación de la constante de inclusión del Citral mediante espectrofotometría UV-Vis.

Una vez realizado el método de relaciones molares se efectuaron los gráficos de absorbancia en función a la longitud de onda en un intervalo de 200 a 300 nm y así observar las modificaciones en las bandas a causa de la inclusión del Citral a la β -CD, como se puede apreciar conforme aumenta la cantidad de β -CD la absorbancia va disminuyendo (Figura 16).

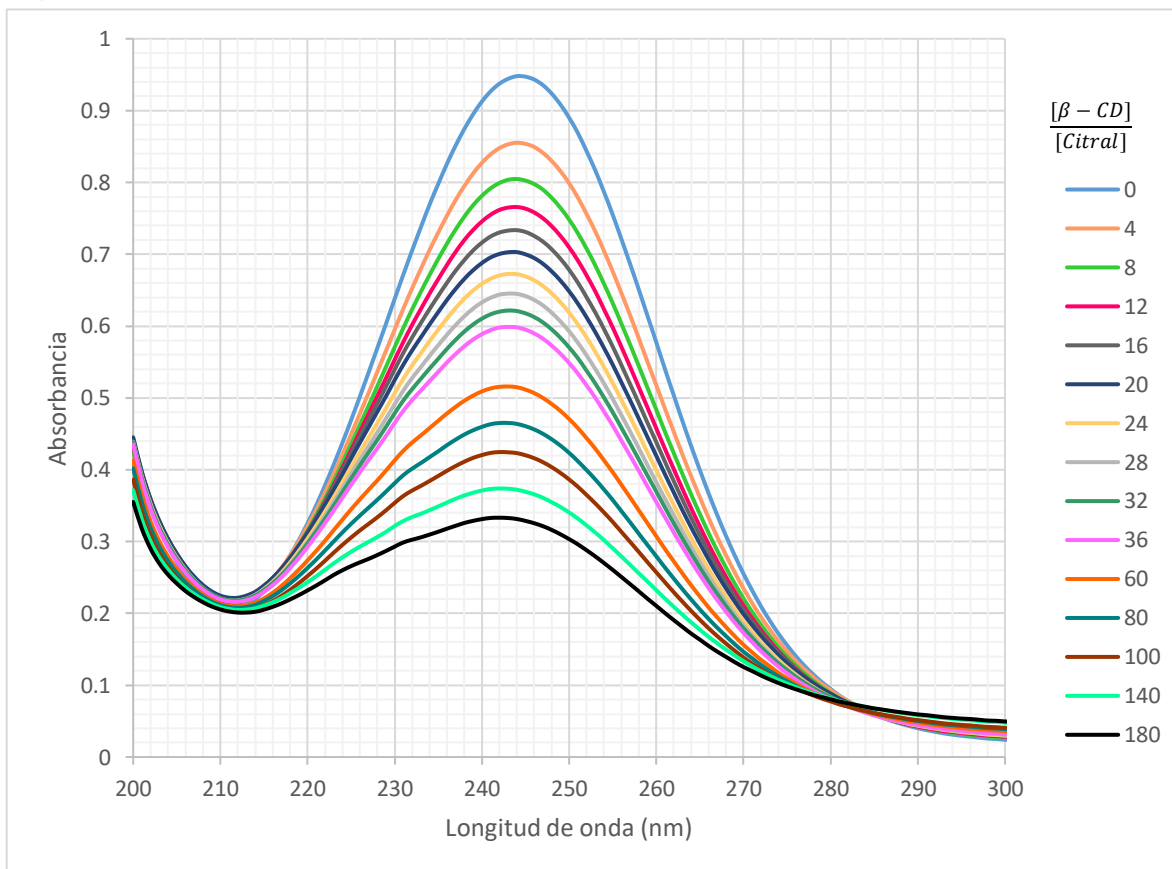


Figura 16. Espectros de absorción de la valoración de Citral con β -CD.

En la Figura 16 se puede observar un punto isobéptico a 284 nm, esto indica la presencia de al menos un equilibrio, lo que puede interpretarse por la presencia de un complejo. Se graficó (Figura 17) la absorbancia máxima corregida por efecto de dilución de cada espectro a una longitud de onda de 244 nm contra el pβCD, en este gráfico se puede observar en un pβCD aproximado de 3.0 un cambio de pendiente, este dato nos muestra el valor aproximado en el cual se puede encontrar el logaritmo de la constante de inclusión.

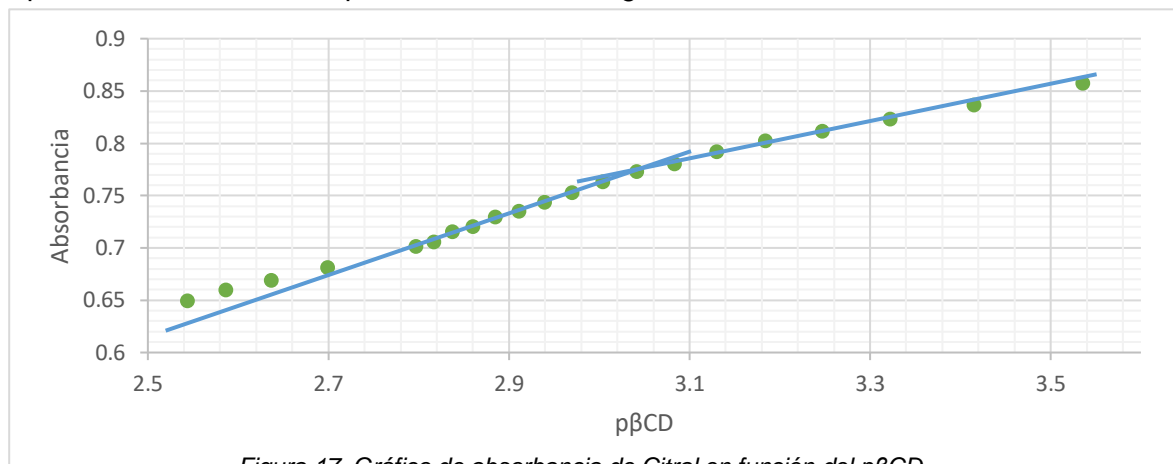


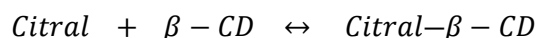
Figura 17. Gráfico de absorbancia de Citral en función del pβCD.

Los datos de absorbancia obtenidos se introdujeron en los programas computacionales TRIANG y SQUAD.

Tabla 13. Resultados obtenidos por TRIANG.

ΔT	No. De especies
0.001	2
0.002	2
0.003	2
0.004	2
0.005	2
0.006	2

El programa TRIANG calcula 2 especies absorbentes en el sistema (Tabla 13), lo que corresponde al Citral y al complejo de inclusión (Citral-β-CD). Por lo que se puede proponer el siguiente equilibrio:



Siguiendo la metodología descrita por Astray, se tomaron 5 espectros de absorción de la valoración de Citral con β -CD para determinar la constante de inclusión (Astray, Mejuto, Morales, Rial-Otero, & Simal-Gándara, 2010), utilizando la absorbancia máxima de cada espectro (Ecuación 2), dando como resultado un $\log K = 2.44$, este dato difiere del reportado por Astray ($\log K = 1.49$).

$$\text{Ecuación 2} \quad K = \frac{A_T - A_G}{A_{G-CD} - A_T}$$

Donde:

- A_T : absorbancia total ($A_T = A_G + A_{G-CD}$).
- A_G : absorbancia de Citral sin β -CD.
- A_{G-CD} : absorbancia de Citral con β -CD.

Sin embargo, se puede hacer uso del programa SQUAD para el cálculo de la constante de inclusión, por lo que el programa se alimentó con los espectros obtenidos de la valoración del Citral con β -CD (Figura 16), un total de 24 espectros en un intervalo de 200 a 294 nm tomando valores de absorbancia a cada 2 nm. Los experimentos se realizaron por triplicado, a continuación, se muestra el promedio de los tres experimentos realizados (Tabla 14), los cuales incluyen la desviación estándar y la suma de cuadrados (U), este valor indica la variación que existe entre los datos experimentales con respecto al modelo propuesto, por lo que se busca que el valor sea pequeño.

Tabla 14. Resultados obtenidos por SQUAD.

Repeticiones	log K	U
1	2.78 ± 0.01	1.95x10 ⁻²
2	2.83 ± 0.02	5.24x10 ⁻²
3	2.80 ± 0.02	6.20x10 ⁻²
Promedio	2.80 ± 0.02	4.46x10 ⁻²

Con el valor de la constante de inclusión (2.80) se procede a construir el diagrama de zonas de predominio (Figura 18), el cual muestra que a pesar de que la reacción tiene una estequiometría 1:1 es necesario que la concentración de β -CD sea al menos de 10^{-2} M, para que el complejo predomine aproximadamente en un 86%, si la concentración de β -CD es menor al valor mencionado la cantidad de Citral libre aumentará.

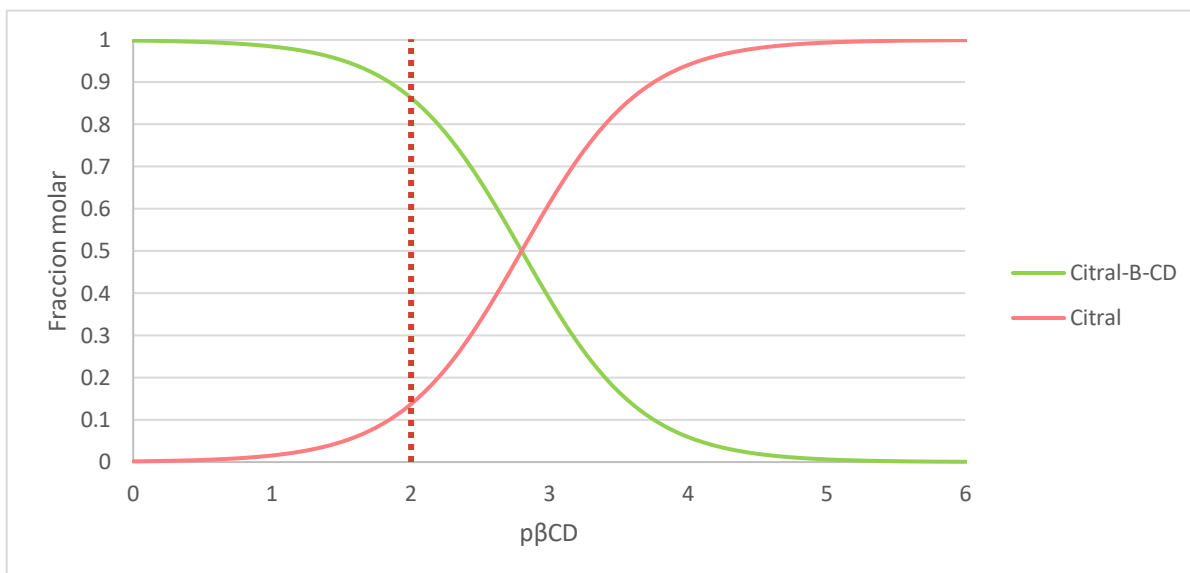


Figura 18. Diagrama de distribución de especies de Citral en función del $p\beta CD$.

El programa SQUAD también calcula los coeficientes de absorptividad molar de cada especie absorbente presente en el sistema, por lo que puede dilucidar la forma que tendrá del espectro de absorción del complejo de inclusión. Los gráficos de los coeficientes de absorptividad molar en función de la longitud de onda (Figura 19) muestran las dos trayectorias correspondientes al Citral libre (rosa) y al complejo Citral— β -CD (verde). Se encontró que la longitud de onda máxima del Citral se encuentra en 244 nm lo que concuerda con los espectros experimentales.

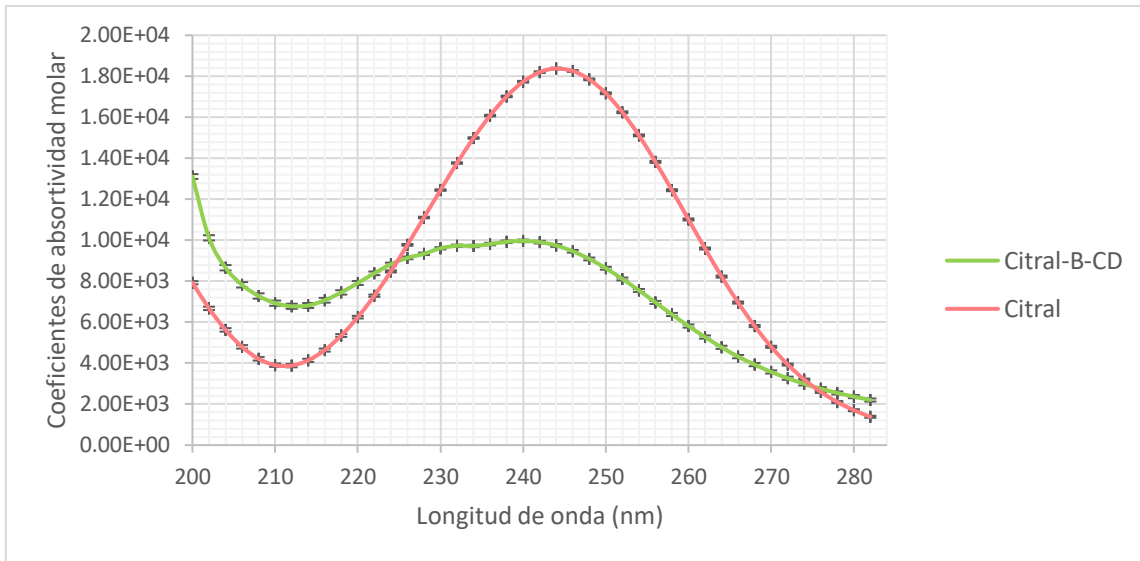


Figura 19. Gráficos coeficientes de absorptividad molar en función de la longitud de onda.

Con los valores de coeficiente de absorptividad molar refinados por el programa SQUAD se construyeron los gráficos comparativos entre los espectros de absorción experimentales y los teóricos (Figura 20). Como se puede observar, los espectros simulados a partir de los resultados de SQUAD se encuentran superpuestos con los datos experimentales lo que comprueba que tanto el modelo como los resultados explican el comportamiento experimental.

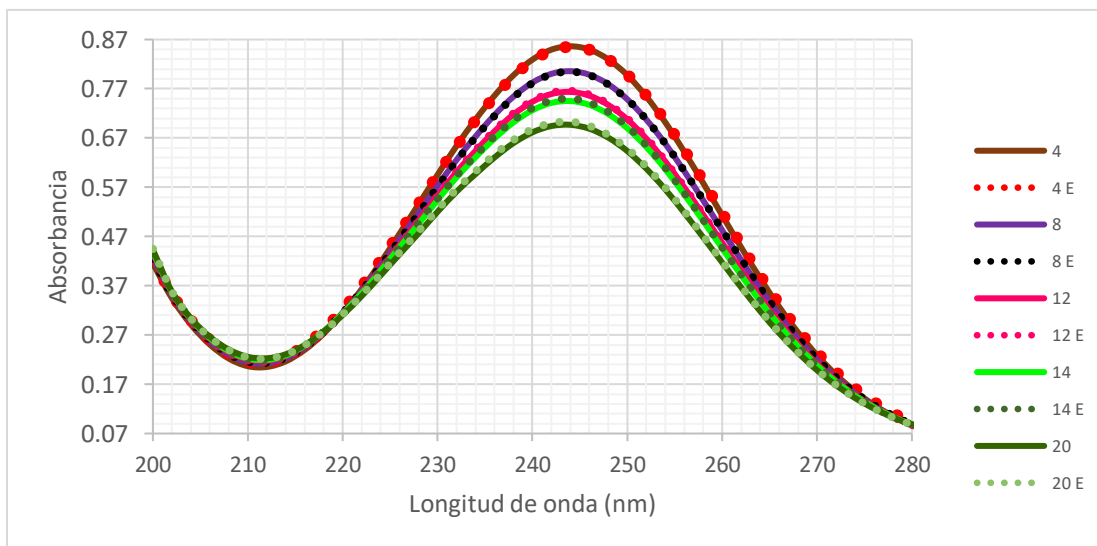
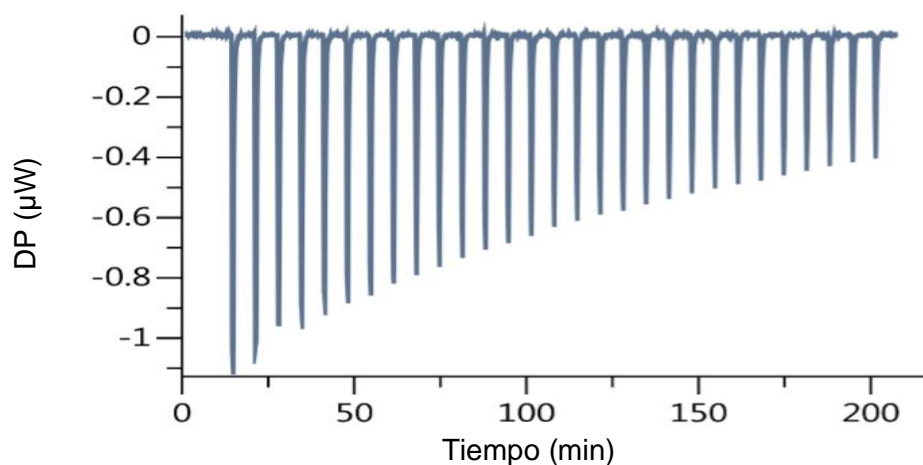


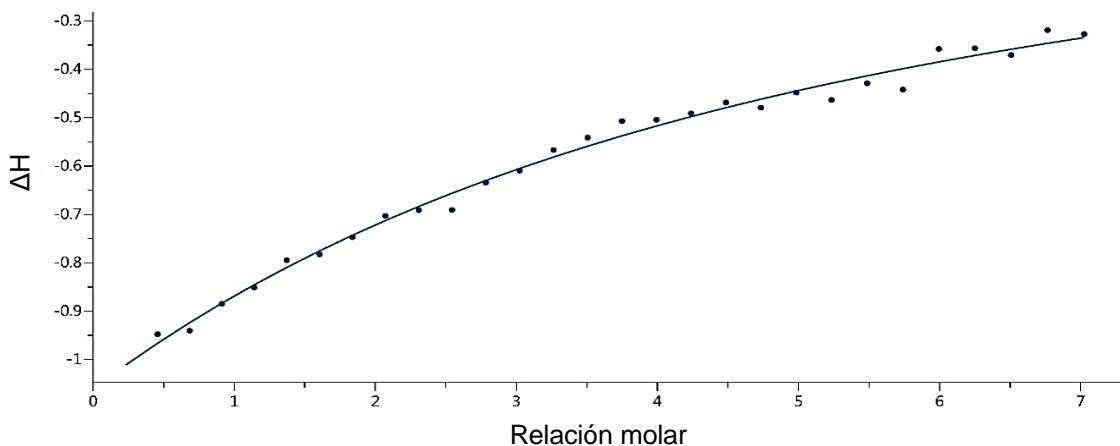
Figura 20. Espectros de absorción Citral—β-CD experimentales (marcadores) y teóricos (línea).

5.3. Determinación de la constante de inclusión del Citral mediante ITC.

Para la determinación de la constante de inclusión, la titulación se llevó a cabo bajo las condiciones mencionadas en el apartado 4.4, utilizando la constante calculada por espectrofotometría UV-Vis, se realizó una simulación para poder fijar las concentraciones que se usaron en la experimentación y de esta manera alcanzar una relación molar de 7, se mantuvo la concentración de Citral es prácticamente constante ya que el volumen agregado de la β -CD es mucho menor. Dando como resultado el termograma que se muestra a continuación (Figura 21), el cual ya considera la resta del calor de dilución.



A partir del termograma (Figura 21) se puede obtener la isoterma de enlace en función de la relación molar de β -CD/Citral obtenida por el programa computacional PEAQ-ITC (Figura 22).



El experimento se realizó por triplicado, los datos obtenidos por el equipo fueron tratados en el programa PEAQ-ITC, dando como resultado los valores de K, ΔH , ΔG mostrados en la Tabla 15.

Tabla 15. Resultados obtenidos por ITC.

	logK	ΔH (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)	$-T\Delta S$ (kJ/mol)
Resultados	$2.98 \pm 1.6 \times 10^{-4}$	-11.08 ± 0.31	$-17.0 \pm 5.4 \times 10^{-3}$	-5.20 ± 0.33

En el termograma (Figura 21) se observa que al momento de hacer la adición de la Ciclodextrina sobre el Citral se eleva la temperatura con respecto a la celda de referencia, por lo que el sistema disminuye la temperatura de la celda de reacción para igualarla con la de referencia, esto señala que la reacción es exotérmica y por lo tanto tendrá una entalpía negativa, este valor de entalpía indica que las interacciones que predominan en la inclusión del Citral en la β -CD son de van der Waals, hidrofóbicas y el rompimiento de puentes de hidrógeno, (Xavier Júnior , y otros, 2018), el valor de entropía indica la liberación de moléculas de agua de la cavidad de la β -CD y a la deshidratación del terpeno y el ΔG es negativo esto indica que la reacción es espontánea en el sentido de la formación del complejo (Kurlkov & Loftsson, 2012). En la Figura 23 se pueden observar los valores termodinámicos en forma de barras.

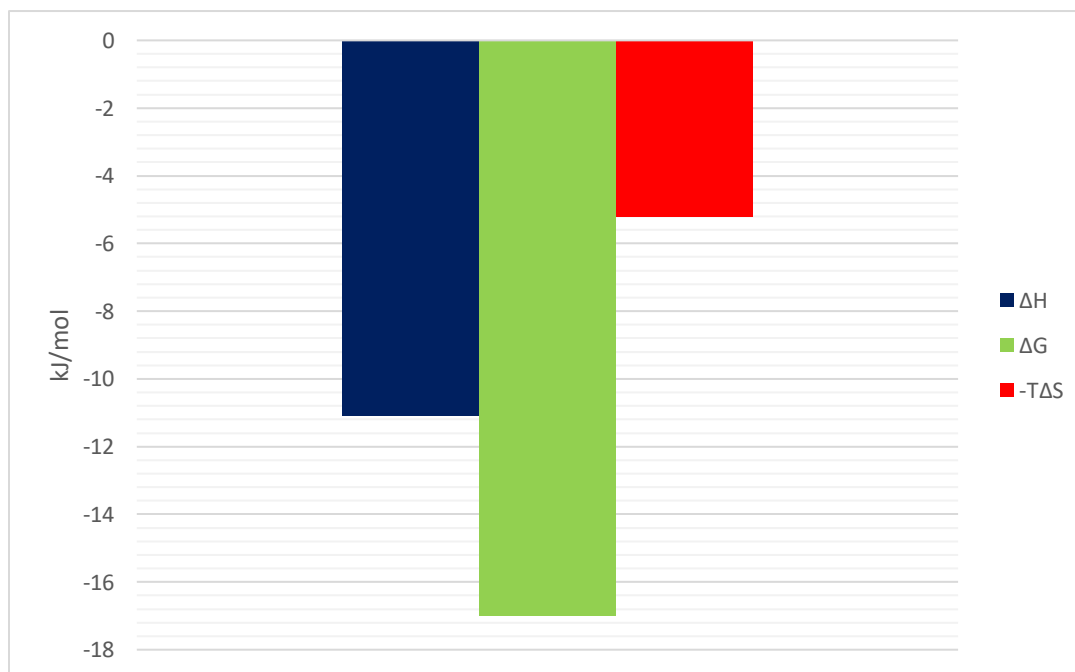


Figura 23. Perfil termodinámico de la inclusión de Citral con β -CD.

Con la constante de inclusión calculada por ITC se procedió a construir el diagrama de distribución de especies (Figura 24) en el cual se puede observar que para que el complejo Citral— β -CD predomine en un 90 % se debe tener un $p\beta$ CD igual o menor a 2, si se tuviera un valor mayor la cantidad de Citral libre aumentará.

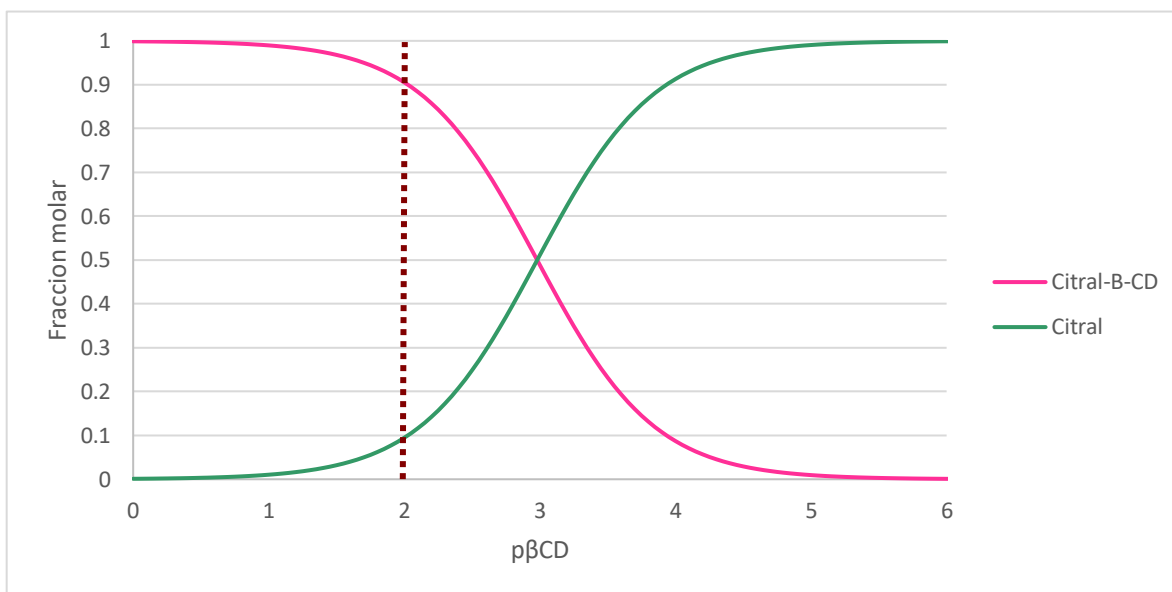


Figura 24. Diagrama de distribución de especies de Citral.

El diagrama de distribución de especies obtenido con la constante determinada por espectrofotometría de UV-Vis (Figura 18) presenta diferencia con el diagrama que se realizó con la constante obtenida por ITC (Figura 24) esto se debe a que el valor de la constante de ITC es mayor que la de UV-Vis.

5.4. Determinación de la constante de inclusión del 1,8-cineol mediante ITC.

Debido a que el 1,8-cineol es una especie espectroscópicamente silenciosa no fue posible determinar la constante de inclusión por medio de espectroscopia UV-Vis.

Las condiciones de la experimentación fueron las mismas que en el caso del Citral para la determinación de la constante de inclusión por ITC, del mismo modo se alcanzó una relación molar de aproximadamente 7, manteniendo la concentración de 1,8-cineol constante (celda de reacción) dando como resultado el siguiente termograma (Figura 25) al cual se le resta el calor de dilución.

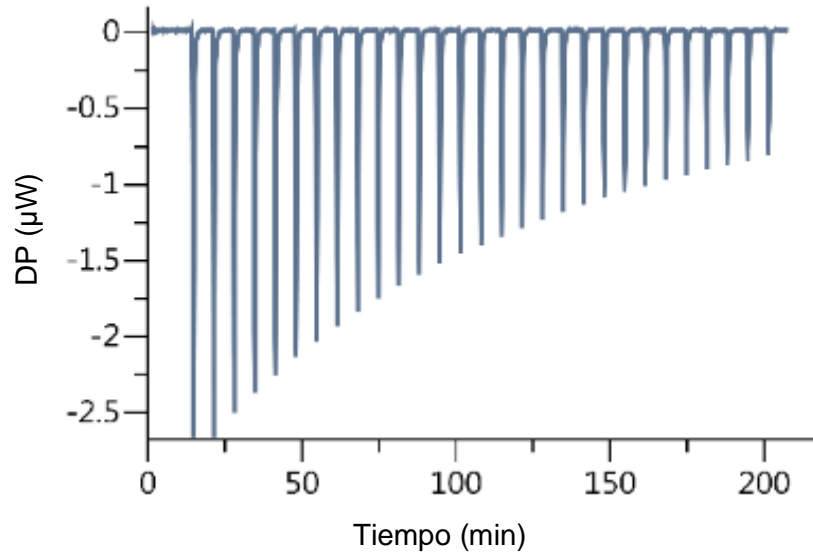


Figura 25. Termograma de la titulación 1,8-cineol con β -CD.

Como se puede apreciar en la Figura 25 la reacción de inclusión es exotérmica esto se puede ver en la orientación de los picos, lo que indica que el equipo tuvo que enfriar la celda de reacción para igualar su temperatura a la de la celda de referencia. Por medio del termograma se construyó la isoterma de enlace (Figura 26) en función de la relación molar de β -CD/1,8-cineol.

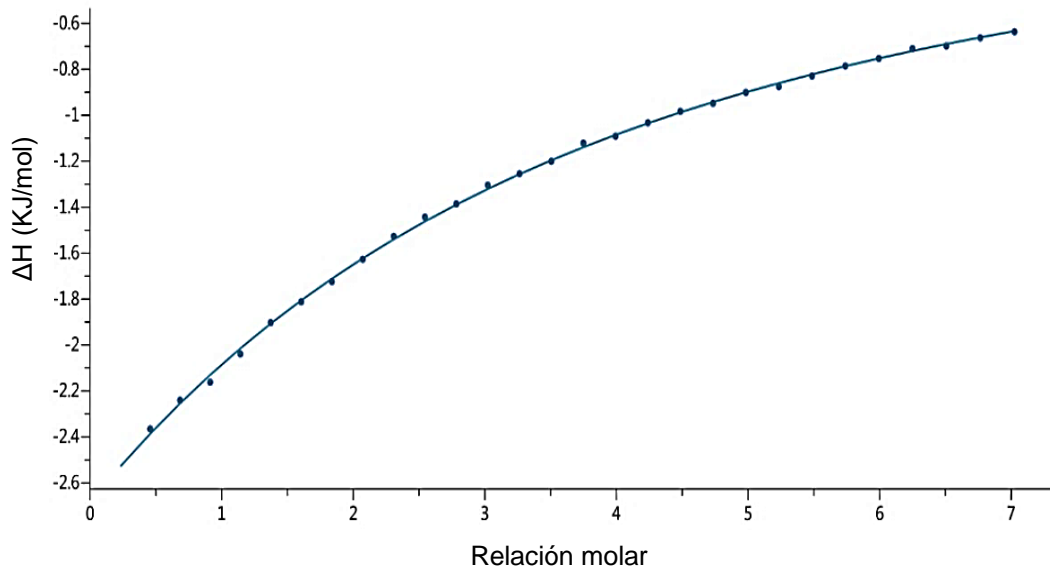


Figura 26. Isotherma de enlace 1,8-cineol con β -CD.

El experimento se realizó por triplicado y los datos fueron tratados en el programa PEAQ-ITC dando como resultados los valores de K , ΔG , ΔH , $-T\Delta S$ (Tabla 16), la forma de la

isoterma de enlace sugiere que solo se forma un complejo de inclusión, por lo que se puede proponer la siguiente reacción de inclusión.

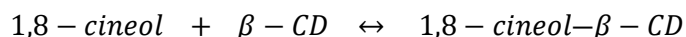


Tabla 16. Resultados obtenidos por ITC.

	logK	ΔH (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)	$-\Delta S$ (kJ/mol)
Resultados	$3.20 \pm 2.82 \times 10^{-4}$	-16.8 ± 0.07	$-18.3 \pm 8.85 \times 10^{-3}$	-1.47 ± 0.08

En la Figura 27 se muestran los valores termodinámicos en forma de barras. Como se puede observar tanto el ΔG y ΔH tienen valores negativos, esto muestra que la reacción de inclusión es espontánea en el sentido de la formación del producto y exotérmica, el ΔH negativo al igual que en el caso de la reacción de Citral indica que en esta reacción las interacciones que predominan hidrofóbicas y de van der Waals, las interacciones electrostáticas y de transferencia de carga se descartan debido a que las especies trabajadas son neutras (Xavier Júnior , y otros, 2018).

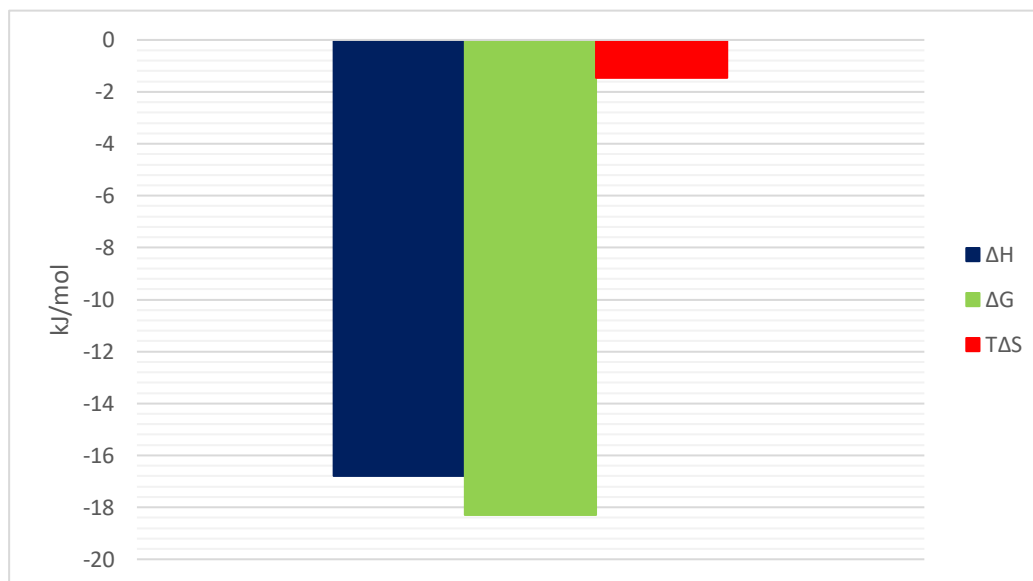


Figura 27. Perfil termodinámico de la inclusión 1,8-cineol con β -CD.

Con la constante de inclusión calculada por ITC se procedió a construir el diagrama de distribución de especies (Figura 28), en el cual se puede observar que a partir de un $p\beta\text{CD}$ de 2.0 el complejo de inclusión estará presente en un 94%, por lo que si se tienen valores mayores de $p\beta\text{CD}$ la cantidad de 1,8-cineol libre comenzara a aumentar.

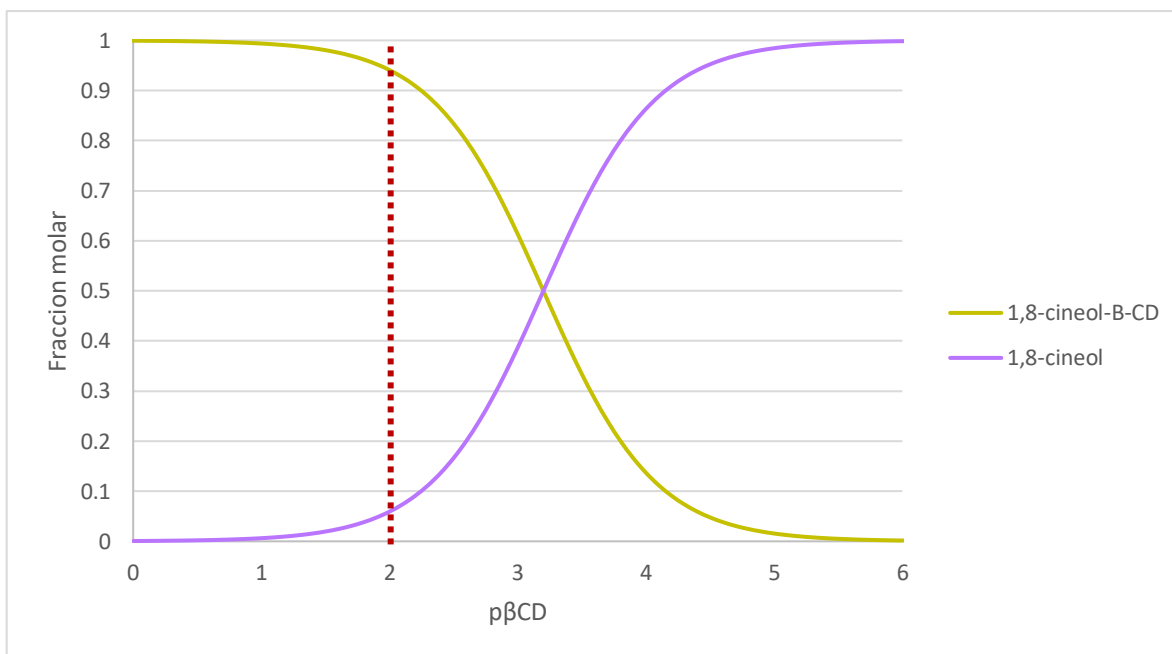


Figura 28. Diagrama de distribución de especies del 1,8-cineol.

En la literatura se encuentra reportada una constante de inclusión de 2.78, la cual fue determinada mediante cromatografía de gases, manteniendo la concentración del terpeno constante y variando la concentración de $\beta\text{-CD}$ (Ciobanu, Landy, & Fourmentin, 2013). La constante determinada por ITC tiene un valor de $3.20 \pm 2.82 \times 10^{-4}$. La diferencia entre las constantes se puede atribuir a las técnicas instrumentales que fueron ocupadas al igual de las condiciones experimentales que también son diferentes. En comparación, con el uso de ITC se pudo determinar los parámetros termodinámicos de la inclusión del 1,8-Cineol con $\beta\text{-CD}$.

5.5. Determinación del ΔC_p de los complejos de inclusión terpeno— $\beta\text{-CD}$.

Para la determinación del ΔC_p de ambos terpenos se llevaron a cabo pruebas a 4 temperaturas diferentes de 20, 25 (obtenidos en la determinación de las constantes de inclusión de los terpenos), 30, 35 °C de los cuales se obtuvieron los valores de ΔH que se

muestran en la Tabla 17, acorde a estos datos se observa que al realizar la inclusión de los terpenos variando la temperatura, la reacción se fue volviendo más exotérmica con el aumento de la temperatura, por lo tanto, el valor de ΔH se fue haciendo más negativo.

Tabla 17. Resultados de ΔH a diferentes temperaturas.

Temperatura (K)	ΔH (kJ/mol)	
	Citral— β -CD	1,8-cineol— β -CD
293.15	-9.28 ± 0.16	-14.75 ± 0.22
298.15	-11.08 ± 0.31	-16.80 ± 0.07
303.15	-13.30 ± 0.28	-18.10 ± 0.11
308.15	-14.80 ± 0.29	-19.35 ± 0.23

Con los datos anteriores se construyeron los gráficos (Figura 29, 30) con los valores de ΔH contra la temperatura, como se puede observar para ambos terpenos se aprecia un comportamiento lineal.

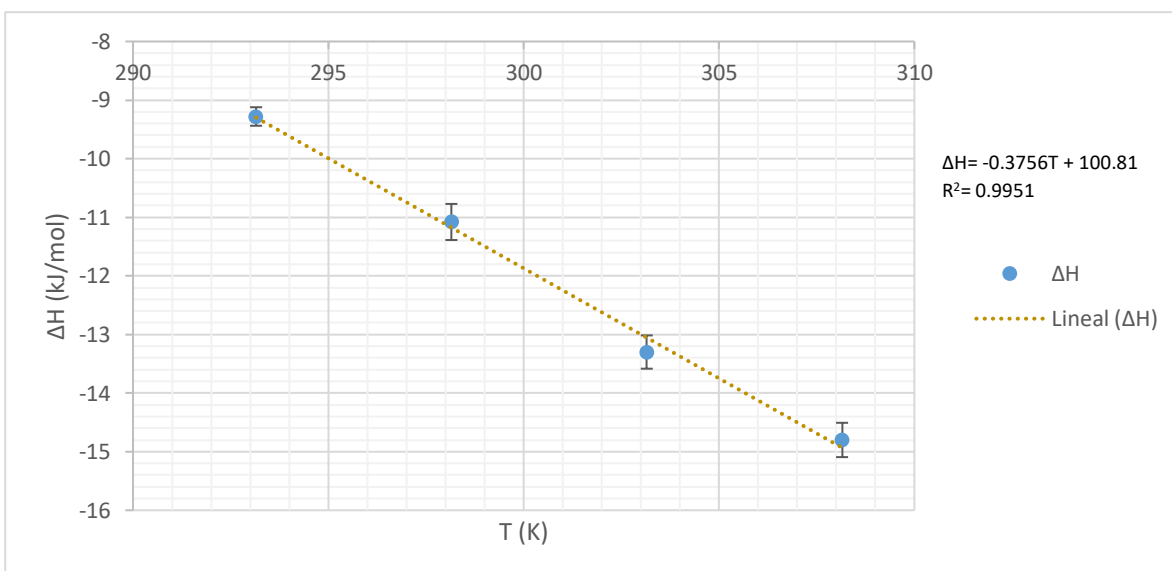


Figura 29. Gráfico ΔH vs Temperatura del complejo de inclusión de Citral— β -CD.

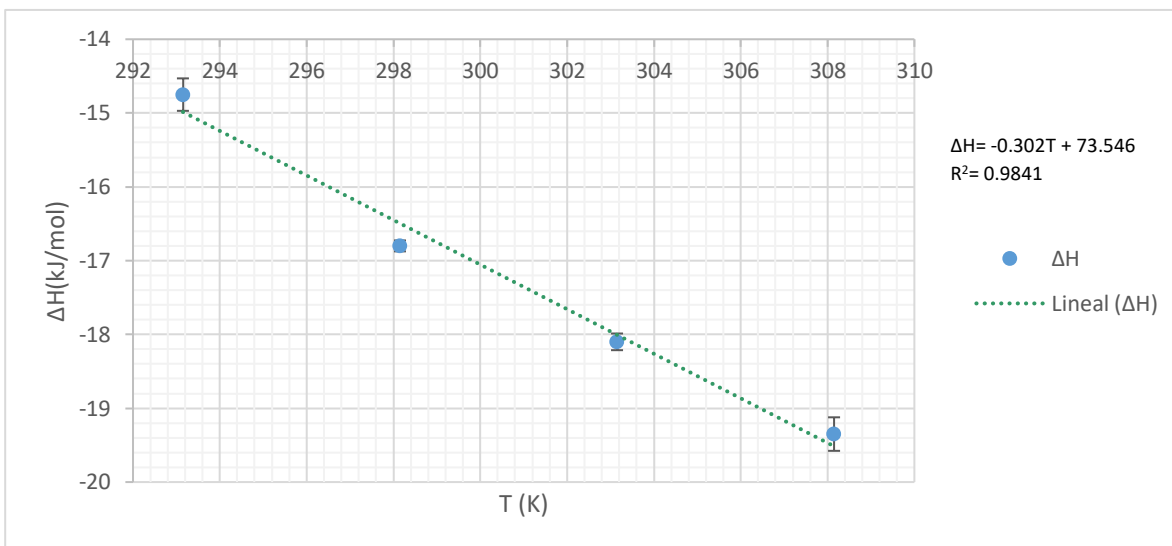


Figura 30. Gráfico ΔH vs Temperatura del complejo de inclusión de 1,8-cineol- β -CD.

Con ambos terpenos se obtuvieron rectas de pendiente negativa, el valor de ΔC_p se puede obtener calculando la ecuación de la recta de cada terpeno (Illapakurthy, Wyandt, & Stodghill, 2005), los valores obtenidos se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. ΔC_p de los complejos de inclusión.

	Citral- β -CD	1,8-cineol- β -CD
ΔC_p (kJ/mol K)	-0.376	-0.302

Los valores negativos de la capacidad calorífica (ΔC_p) con frecuencia pueden ser tomados como evidencia de una interacción hidrófoba significativa, esto se puede relacionar con el cambio de la molécula huésped de un medio polar a uno no polar, como lo es la cavidad de la β -ciclodextrina (McPhail & Cooper, 1997). En relación a los datos obtenidos, se construyeron las gráficas ΔH vs $T\Delta S$ (Figura 31, 32), los datos obtenidos de $T\Delta S$ y ΔG se muestran en la Tabla 19. En las gráficas se puede observar que se tiene una respuesta lineal, esto indica la existencia de una compensación entalpía-entropía (Illapakurthy, Wyandt, & Stodghill, 2005).

Tabla 19. Resultados de ΔG a diferentes temperaturas.

Temperatura (K)	ΔG (kJ/molK)	
	Citral- β -CD	1,8-cineol- β -CD
293.15	$-16.90 \pm 4.12 \times 10^{-3}$	$-18.35 \pm 1.64 \times 10^{-3}$
298.15	$-17.00 \pm 5.4 \times 10^{-3}$	$-18.30 \pm 8.85 \times 10^{-3}$
303.15	$-17.90 \pm 5.25 \times 10^{-3}$	$-18.50 \pm 1.39 \times 10^{-3}$
308.15	$-18.00 \pm 9.46 \times 10^{-3}$	$-19.00 \pm 3.17 \times 10^{-3}$

Otra forma de corroborar que existe una compensación entalpía-entropía es observando los cambios que existen en el ΔG al ir variando la temperatura, en caso de existir este efecto los valores de ΔG no cambiarían significativamente (Cooper, 1999). En el caso de cada terpeno, se puede observar (Tabla 19) que los datos no cambian conforme cambia la temperatura.

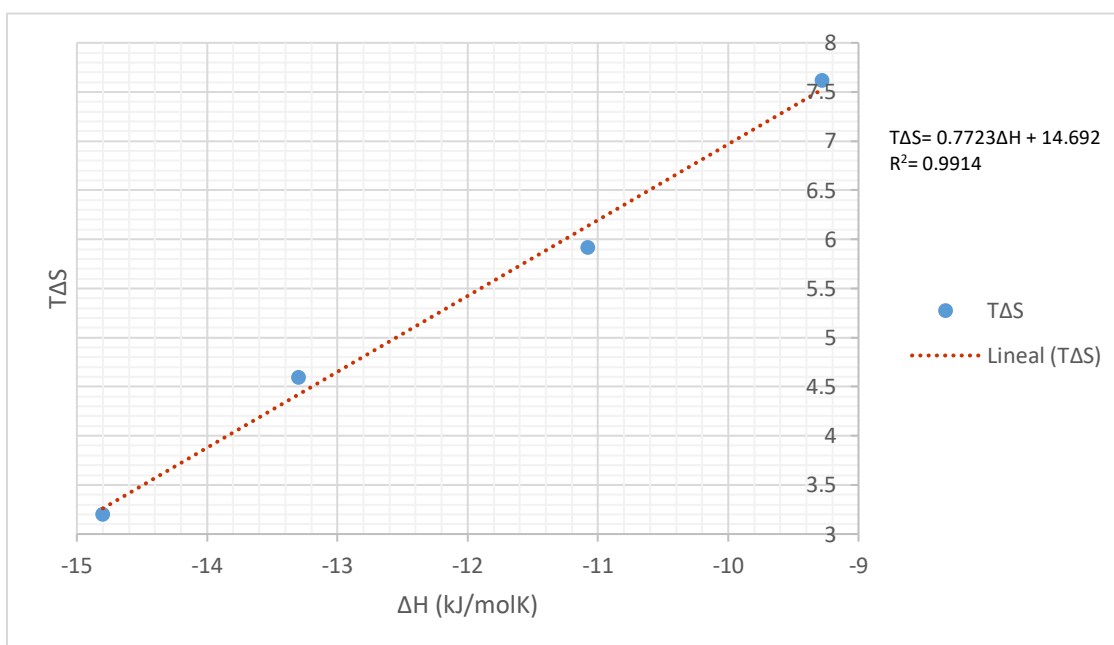


Figura 31. $T\Delta S$ vs ΔH complejo de inclusión de Citral- β -CD.

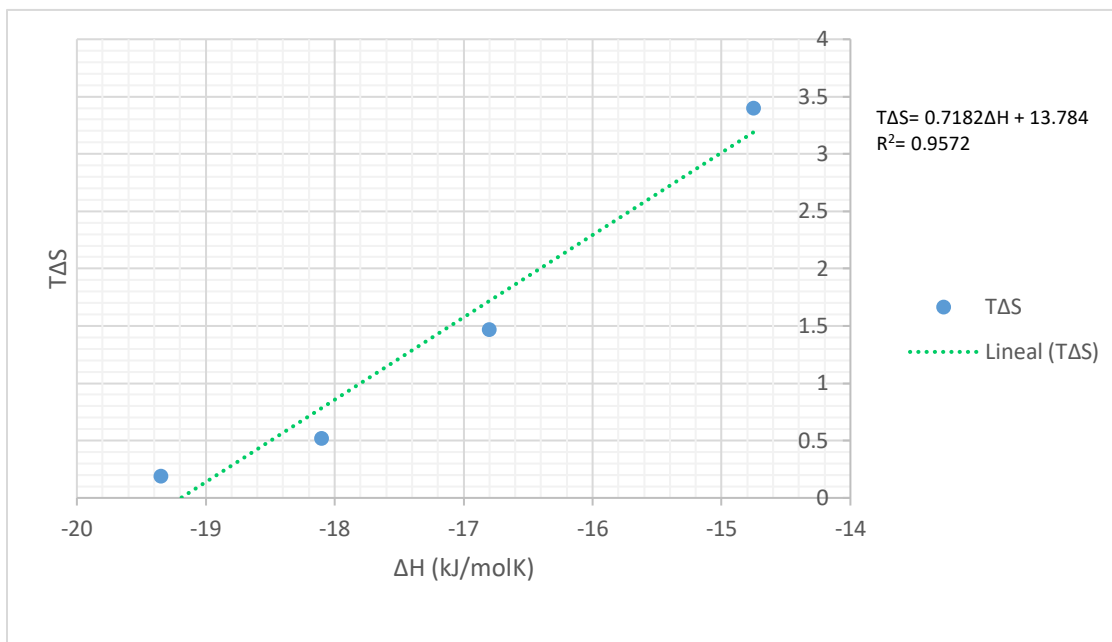


Figura 32. $T\Delta S$ vs ΔH complejo de inclusión de 1,8-cineol- β CD.

5.6. Determinación de la estabilidad del complejo de inclusión (Citral- β -CD) por espectrofotometría UV-Vis.

Una vez pasado los 7 días del monitoreo se revisó el porcentaje de degradación de la solución del Citral a diferentes pH mediante la diferencia de la absorbancia máxima (244 nm) a lo largo del tiempo (Figura 33), tanto para el Citral como para el compuesto Citral- β -CD, los valores de la degradación de ambos compuestos se muestran en la Tabla 20.

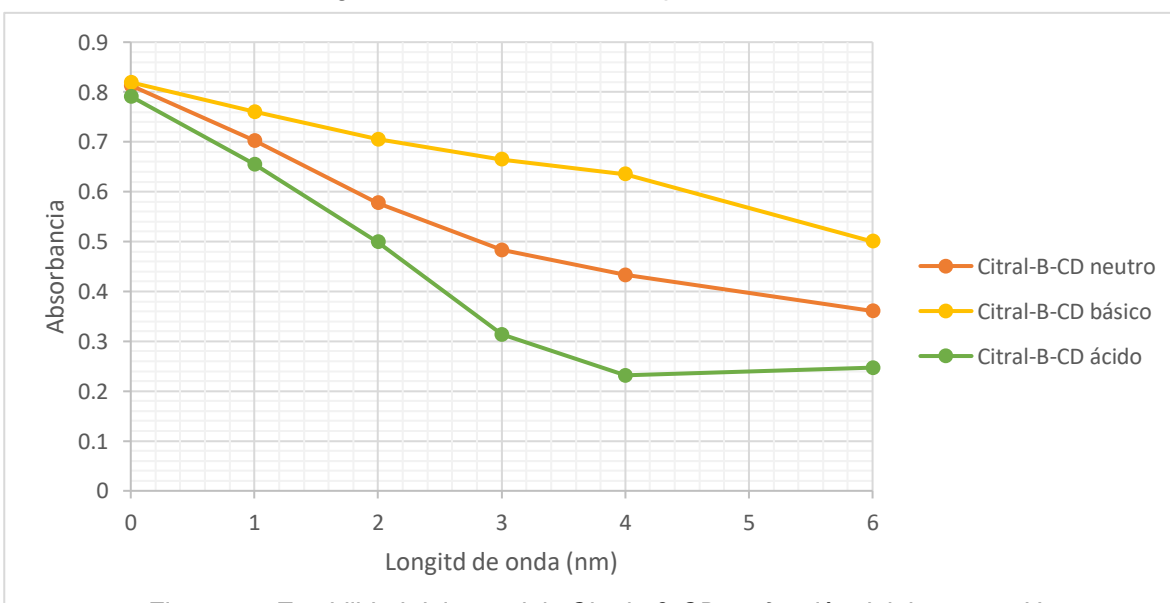


Figura 33. Estabilidad del complejo Citral- β -CD en función del tiempo y pH.

Tabla 20. Degradación de los complejos de Citral en un período de 7 días.

Compuesto	% Degradado	Compuesto	% Degradado
Citral Neutro	76.97	Citral—β-CD Neutro	55.64
Citral Básico	53.62	Citral—β-CD Básico	38.95
Citral Ácido	91.29	Citral—β-CD Ácido	68.81

Como se mencionó en el apartado 2.1.2 en ambientes ácidos este terpeno es degradado, esto se puede corroborar al checar que en el sistema de Citral en medio ácido se tiene una degradación del 91.29% en comparación con el complejo de inclusión en las mismas condiciones que fue de 68.81%, por lo que se puede afirmar que la β-CD protege de la degradación al compuesto que se está incluyendo.

5.7. Solubilidad del complejo de inclusión (Citral—β-CD).

Una de las principales ventajas de la formación de un complejo de inclusión es el aumento de la solubilidad del huésped, una forma de medir este aumento es por el método de Higuchi-Connors (Phunpee, Rangsadthong Ruktanonchai, Suttichai Assabumrungrat, & Soottitantawat, 2017). Para la determinación del Citral disuelto se construyó una curva de calibración (Anexo 2) cuya ecuación es la siguiente: $A = 17136[\text{Citral}] + 0.024$ ($r^2 = 0.9996$) la que se muestra en la Figura 35 del Anexo 2.

En la Tabla 21 se muestra la cantidad de Citral disuelto en forma de complejo y como se puede observar conforme se va aumentando la concentración de β-CD también se va aumentando la cantidad de Citral disuelto. La cantidad máxima que se pudo disolver fue de 0.59 g, en el sistema con mayor concentración de β-CD (9.01×10^{-5}), lo que corresponde a un aumento de 25.15% con respecto al primer sistema que solo contiene Citral, donde solo se disolvió 0.47 g. Se observó que a concentraciones de β-CD mayores de 10^{-4} M los sistemas comenzaron a precipitar y por lo tanto la cantidad de Citral en disolución también disminuía.

Tabla 21. Resultado del método Higuchi-Connors para Citral.

Sistema	β-ciclodextrina (M)	Citral soluble (%)	Citral (g/L)
0	0	—	0.47
1	1.00×10^{-5}	4.06	0.49
2	2.00×10^{-5}	9.94	0.52
3	3.00×10^{-5}	11.14	0.53

4	4.00×10^{-5}	12.80	0.54
5	5.00×10^{-5}	13.92	0.54
6	6.00×10^{-5}	15.03	0.55
7	7.00×10^{-5}	17.20	0.56
8	8.00×10^{-5}	23.57	0.59
9	9.01×10^{-5}	25.15	0.59

5.8. Actividad antioxidante de los terpenos y los complejos de inclusión terpeno— β -CD.

Fue usado el colorante Azul de cresilo Brillante (ACB), ya que en presencia de un agente oxidante este colorante cambia de color azul a violeta (Figura 34). El color azul (630 nm) va disminuyendo conforme se agrega un compuesto oxidante como el hipoclorito (ClO^-). Los terpenos tienen la capacidad de proteger al colorante de la oxidación, debido a que la estructura química de los terpenos tiene dobles enlaces y grupos funcionales susceptibles a ser oxidados, por lo que al mezclarse con el ACB evita que este se oxide y por ende que el color cambie (Noacco, Rodenak Kladniew, García de Bravo, Castro, & Islan, 2018).

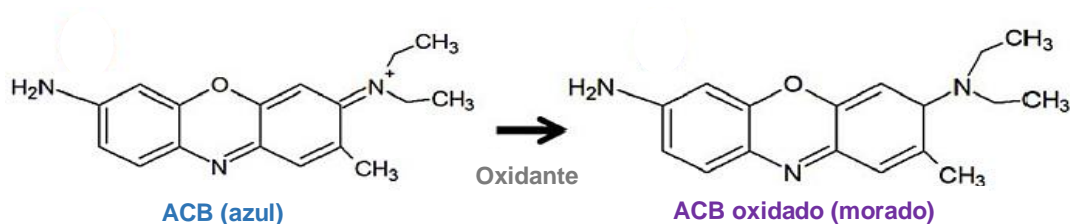


Figura 34. Oxidación del colorante de azul de cresilo brillante.

- Actividad antioxidante de Citral y del complejo Citral— β -CD.

Para tener un punto de comparación, se determinó la actividad antioxidante de Citral en disolución, en la Tabla 22 se muestran los resultados de la actividad antioxidante del Citral a diferentes concentraciones, en la solución de mayor concentración (2.5×10^{-4}), se tiene un porcentaje de colorante sin degradar del 18.76%.

Tabla 22. Actividad antioxidante de Citral.

Citral (M)	Colorante sin oxidar (%)
1.0×10^{-5}	13.55

5.0×10^{-5}	14.42
1.0×10^{-4}	16.25
2.5×10^{-4}	18.76

Para poder evaluar la actividad antioxidante del complejo de inclusión es necesario realizar antes la prueba con el Citral en disolución, una vez realizado esta prueba se procede a determinar la actividad antioxidante que tiene el complejo de inclusión. Los resultados de la determinación del porcentaje de colorante oxidado se muestran en la Tabla 23, los cuales se obtuvieron con relación entre la absorbancia del ACB sin agente oxidante y la absorbancia del ACB con las diferentes concentraciones del complejo en presencia del agente oxidante.

Tabla 23. Actividad antioxidante de Citral— β -CD.

Citral—β-CD (M)	Colorante sin oxidar (%)
4.68×10^{-5}	17.29
4.87×10^{-5}	18.05
5.14×10^{-5}	18.78
5.20×10^{-5}	19.43
5.27×10^{-5}	19.97
5.33×10^{-5}	19.50
5.38×10^{-5}	20.64
5.48×10^{-5}	21.41
5.78×10^{-5}	21.62
5.85×10^{-5}	22.13

El sistema con la mayor concentración de complejo Citral— β -CD (5.85×10^{-5}) es donde se tiene una mayor cantidad de colorante sin oxidar (22.13 %).

Al comparar el máximo porcentaje de colorante sin oxidar de las pruebas (Citral y Citral— β -CD), se puede observar que cuando se tiene presente la β -CD la cantidad de ACB sin oxidar es mayor que cuando se encuentra el terpeno solo.

- Actividad antioxidante de 1,8-cineol y del complejo 1,8-cineol— β -CD.

Siguiendo el mismo procedimiento que para el Citral, se determinó la actividad antioxidante de diferentes disoluciones con concentraciones crecientes de 1,8-cineol, dando como resultado un porcentaje máximo de ACB sin degradar de 20.08 % (Tabla 24) correspondiente a la concentración de 2.52×10^{-4} M.

Tabla 24. Actividad antioxidante 1,8-cineol.

Sistema	Colorante sin oxidar (%)
1.01×10^{-5}	17.58
5.05×10^{-5}	15.88
1.09×10^{-4}	17.73
2.52×10^{-4}	20.08

Para el 1,8-cineol no se determinó la solubilidad del complejo de inclusión, debido a que este terpeno no presenta señal en el UV-Vis, por lo que se determinó indirectamente por medio del porcentaje de colorante sin oxidar, siguiendo el mismo procedimiento para el Citral. Dando como resultado los datos mostrados en la Tabla 25.

Tabla 25. Actividad antioxidante del complejo de 1,8-cineol.

β -CD (M)	Colorante sin oxidar (%)
0	17.73
9.98×10^{-4}	18.48
1.99×10^{-3}	19.24
2.99×10^{-3}	19.76
3.99×10^{-3}	20.59
4.99×10^{-3}	22.76
5.99×10^{-3}	23.66

Como se observa, conforme se aumenta la concentración de β -CD, la cantidad de colorante que se oxida es menor, siendo el último sistema con una concentración de β -CD de 5.99×10^{-3} en donde se presenta la mayor cantidad de colorante sin oxidar con un 23.66 %, este valor es mayor en comparación con el que se obtuvo con el 1,8-cineol solo.

Se puede confirmar que a pesar del aumento de la cantidad de β -CD, la actividad antioxidante no disminuye, sino todo lo contrario, el proceso de inclusión aumenta la actividad antioxidante para ambos terpenos.

6. CONCLUSIONES

Con los dos terpenos trabajados (Citral, 1,8-cineol) se formaron complejos de inclusión con la β -Ciclodextrina, en ambos casos con una relación estequiométrica 1:1, lo cual se determinó por espectrofotometría UV-Vis y calorimetría de titulación isotérmica.

Debido a las interacciones que ocurren, la inclusión es de naturaleza física (fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno), en el proceso de inclusión para el Citral y 1,8-cineol los logaritmos de las constantes de equilibrio son valores pequeños 2.80 para UV-Vis y para ITC 2.98 y 3.20 respectivamente. En este trabajo se utilizaron un número mayor de datos experimentales y programas computacionales que nos permiten tener una mayor precisión; además, la calorimetría de titulación isotérmica es una técnica con una precisión mayor para obtener parámetros termodinámicos en este tipo de sistemas.

Se estableció el perfil termodinámico mediante ITC para las reacciones de inclusión de ambos terpenos. La inclusión del Citral y 1,8-cineol con la β -Ciclodextrinas ocurre de manera espontánea y exotérmicas. Debido a que el ΔG no cambia al variar la temperatura, se puede afirmar que los complejos de inclusión son estables en el rango de temperatura trabajados.

Dentro de las ventajas de llevar a cabo la inclusión de los terpenos en β -CD, se pudo comprobar que con la inclusión la solubilidad en agua de ambos terpenos aumenta, la estabilidad del Citral en solución se ve mejorada, retrasando su degradación incluso en medio ácido, de igual forma la actividad antioxidante de ambos terpenos no se ve disminuida a causa de la inclusión sino al contrario, conforme aumenta la concentración de los complejos de inclusión, también la capacidad antioxidante aumenta.

Estos datos podrían servir de base para la síntesis de complejos de inclusión, que puedan utilizarse en diferentes áreas industriales (alimentaria, farmacéutica), para ser usados como conservador o ser incluidos en medicamentos.

REFERENCIAS.

- Abarca, R. L., Rodriguez, F. J., Guarda, A., Galatto, M. J., & Bruna, J. E. (2016). Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. *Food Chemistry*, 968-975.
- Andrade, T. A., Fredas, T. S., & Araujo, F. O. (2017). Physico-chemical characterization and antibacterial activity of inclusion complexes of Hyptis martiusii Benth essential oil in B-cyclodextrin. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 201-207.
- Astray, G., Gonzalez Barreira, C., Mejuto, J., Rial Otero, R., & Simal Gándara, J. (2009). A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids*, 1631-1640.
- Astray, G., Mejuto, J. C., Morales, J., Rial-Otero, R., & Simal-Gándara, J. (2010). Factors controlling flavors binding constants to cyclodextrins and their applications in foods. *Food Research International*, 1212-1218.
- Atarés, L., & Chiralt, A. (2016). Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 51-62.
- Baines, D. A., Jones, R. A., Webb, T. C., & Campion Smith, I. H. (1970). The chemistry of terpenes-I: The effect of hydrogen ion concentration and oxygen upon the acid catalysed cyclization of citral. *Tetrahedron*, XXVI, 4901-4913.
- Belarra Piedrafita, M. Á. (2002). *Cálculos Rápidos para los Equilibrios Químicos en Disolución*. Zaragoza, España: Universidad de Zaragoza.
- Bouchemal, K., & Mazzaferro, S. (June de 2012). How to conduct and Interpret ITC experiments accurately for cyclodextrin-guest interaction. *Drug Discovery Today*, 623-629.
- Cedillo Flores, O. E. (2019). *Determinación de las constantes de formación de complejos de inclusión de los componentes principales del aceite esencial de orégano (Carvacrol y Timol) en Beta-Ciclodextrina*. México: UNAM.
- Ciobanu, A., Landy, D., & Fourmentin, S. (2013). Complexation efficiency of cyclodextrins for volatile flavor compounds. *Food Research International*, 110-114.
- Cooper, A. (1999). Thermodynamic analysis of biomolecular. *Chemical Biology*, 557-563.
- Días Antunes, M., Da Silva Dannenberg, G., Fiorentini, A. M., & Zanella Pinto, V. (2017). Antimicrobial electrospun ultrafine fibers from zen containing eucalyptus essential oil/cyclodextrin inclusion complex. *International Journal of Biological Macromolecules*, 874-882.
- Domínguez Castañeda, R. (2012). *Estudio de la Interacción del fármaco antiinflamatorio Meloxicam con Cu(II)*. Tesis para obtener el título de Ingeniera Química. México: UNAM.
- Dorsam, B., Wu, C. F., Efferth, T., Kaina, B., & Fahrner, J. (2016). The eucalyptus oil ingredient 1,8-cineol induces oxidative DNA damage. *Arch Toxicol*, 797-805.

- Fonnegra G, R., & Jimenez R, S. L. (2007). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia* (2° ed.). Antioquia: Universidad de Antioquia.
- Fourtaka, K., Chistoforides, E., Mentzafos, D., & Bethanis, K. (2018). Crystal structures and molecular dynamics studies of the inclusion compounds of beta-citronellol in beta-cyclodextrin, heptakis(2,6-di-O-methyl)-beta-cyclodextrin and heptakis(2,3,6-tri-O-methyl)-beta-cyclodextrin. *Journal of Molecular Structure*, 1-8.
- Garcia, C., Rodríguez, P., Días, E., & Heinzen, H. (2009). Biooxidation of 1,8-cineol by *Aspergillus terreus*. *Catalysis B: Enzymatic*, 173-176.
- Harris, D. C. (2001). *Análisis Químico Cuantitativo* (Segunda ed.). Barcelona, España: Reverte S.A.
- Harvey, D. (2002). *Química Analítica Moderna*. España: McGraw Hill.
- Illapakurthy, A. C., Wyandt, C. M., & Stodghill, S. P. (2005). Isothermal titration calorimetry method for determination of cyclodextrin complexation thermodynamics between artemisinin and naproxen under varying environmental conditions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 325-332.
- Kfourg, M., Auezoua, L., Ruellan, S., Greige Gerges, H., & Fourmentin, S. (2015). Complexation of estragole as pure compound and as main component of basil and tarragon essential oil with cyclodextrins. *Carbohydrate Polymers*, 156-164.
- Kurlkov, S. V., & Loftsson, T. (2012). *Cyclodextrins*. Reykjavik: International Journal of Pharmaceutics.
- Legget, D. J. (1985). *Computational methods for the determination of formation constants*. Freeport: Plenum Press.
- Leggett, D. J., & McBryde, W. A. (1975). General computer program for the computational stability constants from absorbance data. *Analytical Chemistry*, 1065-1069.
- Lin, L., Dai, Y., & Cui, H. (2017). Antibacterial poly(ethylene oxide) electrospun nanofibers containing cinnamon essential oil/beta-cyclodextrin proteoliposomes. *Carbohydrate Polymers*, 131-140.
- Lu, W. C., Huang, D. W., Wang, C. C., Yeh, C. H., Tsai, J. C., Huang, Y. T., & Li, P. H. (2018). Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. *Food and Drug Analysis*, 82-89.
- Marreto, R. N., Almeida, E. E., Alves, P. B., Niculau, E. S., Nunes, R. S., Matas, C. R., & Arayo, A. A. (2008). Thermal analysis and gas chromatography coupled mass spectrometry analyses of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex containing *Lippia gracilis* essential oil. *Thermochimica Acta*, 53-58.
- Marreto, R. N., Almeida, E. E., Alves, P. B., Niculau, E. S., Nunes, R. S., Matos, C. R., & Araujo, A. (2008). Thermal analysis and gas chromatography coupled mass spectrometry analyses of hidroxipropyl-B-cyclodextrin inclusion complex containing *Lippia gracilis* essential oil. *Thermochimica Acta*, 53-58.

- Martínez Mendoza, D. L. (2015). *Estudio de especiación química del compuesto LQM 314 con el catión Cu (II) en su sal de acetato*. México: Tesis UNAM.
- Mazzei, L., Ciurli, S., & Zambell, B. (2016). Isothermal Titration Calorimetry to Characterization Enzymatic Reactions. *Methods in Enzymology*, 215-221.
- McPhail, D., & Cooper, A. (1997). *Thermodynamic and kinetics of dissociation of ligand-induced dimers of vancomycin antibiotics*. Glasgow: Faraday Trans.
- Merck. (05 de Enero de 2012). *Merck Millipore*. Recuperado el 29 de Mayo de 2018, de Merck S.A. de C.V.: https://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-MX-Site/es_ES/-/MXN/ProcessMSDS-Start?PlainSKU=MDA_CHEM-802489&Origin=PDP
- Merck. (17 de Noviembre de 2017). *Acerca de nosotros: Merck Millipore*. Recuperado el 29 de Mayo de 2018, de Merck S.A. de C.V.: http://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-MX-Site/es_ES/-/MXN/ProcessMSDS-Start?PlainSKU=MDA_CHEM-843788&Origin=PDP
- Noacco, N., Rodenak Kladniew, B., García de Bravo, M., Castro, G. R., & Islan, G. A. (2018). Simple colorimetric method to determine the in vitro antioxidant activity of different monoterpenes. *Analytical Biochemistry*, 59-66.
- Ol'khovich, M. V., Sharapova, A. V., Perlovich, G. L., Skachilova, S. Y., & Zheltokhin, N. K. (2017). Inclusion complex of antiasthmatic compound with 2-hidroxypropyl-beta-cyclodextrin: Preparation and physicochemical properties. *Journal of Molecular Liquids*, 185-192.
- Padalia, R. C., Verma, R. S., Chauhan, A., & Goswami, P. (2015). Chemical composition of *Melaleuca linarrifolia* Sm. from India: a potential source of 1,8-cineole. *Industrial Crops and Products*, 264-268.
- Peraro, C. R., Aconi, A., & Aconi, C. P. (2018). Formation of beta-Cyclodextrin inclusion compound with doxycycline: A theoretical approach. *Chemical Physics Letters*, 140-145.
- Phunpee, S., Rangsadthong Ruktanonchai, U., Suttichai Assabumrungrat, Y., & Soottitantawat, A. (2017). Encapsulation of lemongrass oil with cyclodextrins by spray drying and its controlled release characteristic. *Biotechnology and Biochemistry*, 718-723.
- Rakmai, J., Cheirsilp, B., Mejuto, J. C., Torrado Agrasar, A., & Simal Gondasa, J. (2017). Physico-chemical characterization and evaluation of bio-efficacies of black pepper essential oil encapsulated in hidroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Food Hydrocolloids*, 157-164.
- Rauber, C., Guterres, S. S., & Schapoval, E. (2005). LC determination of citral in *Cymbopogon citratus* volatile oil. *Pharmaceutical and Biomedical analysis*, 597-601.
- Resendiz Gonzalez, A. (2005). *Especificación química de los farmacos antiinflamatorios Fenoxicam y Piroxicam con Fe (II)*. México: UNAM.

- Restrepo, J., Vinasco, L. E., Jaramillo, L. P., & Colmenares, A. J. (2009). Encapsulamiento de los aceites esenciales de citral (*Cymbopogon citratus*) en B-ciclodextrinas usando dióxido de carbono supercrítico. *ingeniería y Competitividad*, *11*, 9-19.
- Ribeiro Santos, R., Andrade, M., Ramos de Melo, N., & Regiane dos Santos, F. (2017). Biological activities and major components determination in essential oils intended for a biodegradable food packaging. *Industrial Crops and Products*, 201-210.
- Rodenak-Kladniew, B., Castro, A., Starkel, P., Galle, M., & Crespo, R. (2020). 1,8-Cineole promotes G0/G1 cell cycle arrest and oxidative stress-induced senescence in HepG2 cells and sensitizes cells to anti-senescence drugs. *Life Science*, 1-3.
- Selmi, S., Rtibi, K., Grami, D., Sebai, H., & Marzouki, L. (2017). Rosemary (*Rosmarinus Officinalis*) essential oil components exhibit anti-hyperglycemic, anti-hyperlipidemic and antioxidant effects in experimental diabetes. *Pathophysiology*, *7*.
- Skoog, D. A., & West, D. M. (1986). *Analisis Instrumental*. California: Interamericana S. A de C. V.
- Stojkovic, D., Dzamic, A., Ciric, A., Ristic, M., & Grubisic, D. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* L. Fruits and leaves essential oils. *Food Chemistry*, 1017-1012.
- Tian, H., Lu, Z., Li, D., & Hu, J. (2018). Preparation and characterization of citral-loaded solid lipid nanoparticles. *Food Chemistry*, 78-85.
- Wang, J., Khelissa, S. O., Chihib, N. E., Dumas, E., & Gharsallaoui, A. (2019). Effect of drying and interfacial membrane composition on the antimicrobial activity of emulsified citral. *Food Chemistry*, 1-7.
- Wollinger, A., Perrin, E., Chahboun, J., Jeannut, V., Touraud, D., & Kunz, W. (2016). Antioxidant activity of hydro distillation water residues from *Rosmarinus officinalis* L. leaves determined by DPPH. *Comptes Rendus Chimie*, 754-765.
- Xavier Júnior, F. H., Tavares, C. T., Rabello, M. M., Hernandez, M. Z., Bezerra, B. P., Ayala, A. P., . . . Ximenes, R. M. (2018). Elucidation of the mechanism of complexation between oncalyxone A and cyclodextrins by isothermal titration calorimetry and molecular modeling. *Journal of Molecular Liquids*, 165-172.
- Xiao, Z., Hou, W., Kong, Y., Niu, Y., & Kou, X. (2019). Encapsulation and sustained release properties of watermelon flavor and its characteristic aroma compounds from gamma-cyclodextrin inclusion complexes. *Food Hydrocolloids*, 2-9.

Anexos

Anexo 1: Materiales, equipos y reactivos

Materiales.

Matraces volumétricos de 10 y 100 mL.
Pipetas de volumen variable de 1-10 μ L y 100-1000 μ L.
Vaso de precipitado de 50 y 100 mL.
Puntas para pipetas de volumen variable.
Celda termostataada de 150 mL.
Tapa de 5 bocas para celda termostataada.
Barras magnéticas.
Embudos de vidrio.
Papel filtro Whatman.
Celdas de cuarzo de 1.0 cm de paso óptico.
Espátula.
Piseta.
Termómetro.
Probetas de vidrio de 10 y 100 mL.
Soporte universal.
Pinzas de tres dedos.

Equipos.

Balanza Analítica P. Ohaus-Piones \pm 0.0002 g.

Potenciómetro S47 SevenMulti \pm 0.001 unidades de pH.
Electrodo de pH.
Espectrofotómetro UV-Vis Lambda 35, Perkin Elmer \pm 0.003 unidades de absorbancia.
Baño recirculador PolyScience.
Agitador magnético.
Desionizador de agua Purelab.
Microcalorímetro Microcal VP-ITC G.E. \pm 0.005 μ cal/s.

Reactivos.

Nitrógeno gas 99.997 % INFRA.
Agua desionizada 18.2 M Ω .
HCl 37.2 % Macron Chemicals.
NaOH 98.6 % Mallinckrodt.
 β -Ciclodextrina 97% Sigma-Aldrich.
Citral 95 %, Sigma-Aldrich.
1,8-cineol 99 %, Sigma-Aldrich.
Na₂HPO₄ 99.7 %, Fermont.
Azul de Cresilo Brillante, Merck.
Hipoclorito comercial (Cloralex) 5 %.
Alcohol etílico 99.5%.

Anexo 2: Curva de calibración de Citral.

Disolución Citral: preparar 100 mL de disolución con una concentración de 10^{-4} M.

- Procedimiento.

Para la cuantificación del Citral disuelto se elaboró una curva de calibración a partir de la solución de Citral (10^{-4} M), la elaboración de la curva se muestra en la Tabla 7.

Tabla 26. Elaboración de curva de calibración de Citral.

Sistema.	Volumen de Citral (mL).	Volumen final (mL).	Concentración final (M).
1	1	10	1×10^{-5}
2	3	10	3×10^{-5}
3	5	10	5×10^{-5}
4	7	10	7×10^{-5}
5	9	10	9×10^{-5}
6	10	10	1×10^{-4}

Para cada sistema se obtuvo el espectro de absorción de 200 a 300 nm, se tomó el valor de longitud de onda máxima de cada sistema para la elaboración de la curva de calibración y la determinación de la ecuación de la recta (Figura 35).

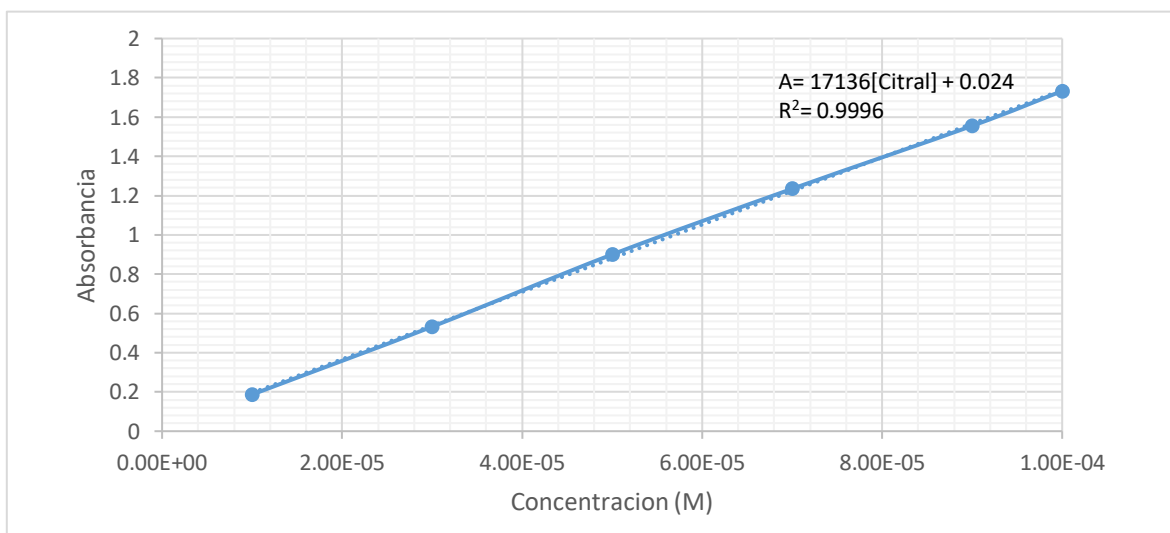


Figura 35. Curva de calibración de Citral.