



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

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.

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q. OSCAR EDUARDO CEDILLO FLORES

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

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, AGOSTO 2019.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por permitirme realizar mis estudios de maestría.

Gracias a la Dra. María del Rosario Moya Hernández por su gran apoyo durante estos dos años y por dirigir mi tesis de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada con número de becario: 626672.

Al proyecto PIAPI 1846, del programa interno de Apoyo para proyectos de Investigación de la FES Cuautitlán, UNAM.

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

A los miembros del jurado que con sus sugerencias y observaciones hicieron posible la culminación de este trabajo:

- Dra. Martha Patricia Camacho García.
- Dra. María Teresa Ramírez Silva.
- Dra. Silvia del Socorro Pérez Casas.
- Dra. Ana María Velázquez Sánchez.
- Dr. Alejandro Dorazco González.

**Sitio donde se desarrolló el tema:**

Laboratorio 10, Laboratorio de Físicoquímica 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 esta investigación se presentaron en:**

“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” XXXII Congreso Nacional de Química Analítica, Asociación Mexicana de Química Analítica, San Luis Potosí, México, junio de 2019. Cartel.

# INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales son mezclas de metabolitos secundarios producidos por las plantas aromáticas. Por lo regular los componentes de los aceites esenciales son terpenoides.

El orégano (*Origanum vulgare* L.) es una planta aromática que se emplea como condimento en la preparación de varios alimentos; además, es empleado en medicina tradicional para tratar desórdenes respiratorios, gastritis, dolor menstrual, artritis reumatoide, desórdenes del tracto urinario, entre otros. Se ha estudiado la composición química del aceite esencial del orégano, en el cual se han encontrado una gran variedad de monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos. Los monoterpenos que se encuentran en mayor cantidad en el aceite esencial de orégano son el timol y el carvacrol, en un 12.6 % y 14.5 respectivamente, y se sabe que estos dos compuestos tienen propiedades antimicrobianas y antioxidantes, por mencionar algunas (Teixeira et al., 2013).

Tanto el timol como el carvacrol poseen un gran potencial para emplearse como conservadores en alimentos, pero al ser de naturaleza lipofílica, presentan una solubilidad escasa en agua y son los responsables de darle el sabor y olor característico al orégano. Para contrarrestar esto, en este trabajo se estudió la formación de complejos de inclusión de estos dos compuestos con  $\beta$ -ciclodextrina.

La  $\beta$ -ciclodextrina es un polisacárido cíclico compuesto por siete unidades de D-glucosa; debido a la conformación de las unidades de glucosa, la forma de la  $\beta$ -ciclodextrina es de cono truncado provocando que la cavidad de ésta sea de baja polaridad y la parte externa sea hidrofílica. Un complejo de inclusión se forma cuando una molécula de baja polaridad entra a la cavidad de la  $\beta$ -ciclodextrina mediante interacciones intermoleculares.

En este trabajo se determinaron las constantes de formación de los complejos de inclusión de timol y carvacrol con  $\beta$ -ciclodextrina, respectivamente, mediante espectrofotometría UV-Vis y calorimetría de titulación isotérmica (ITC, por sus siglas en inglés). En ambas técnicas se encontró que la  $\beta$ -ciclodextrina forma un complejo con relación estequiométrica de 1:1 con ambos terpenos y el  $\log \beta$  de formación en

ambos casos son muy cercanos ( $3.42 \pm 0.04$  para timol y  $3.35 \pm 0.06$  para carvacrol). Con ITC se pudieron determinar los parámetros termodinámicos del proceso de inclusión y en ambos casos el proceso se lleva a cabo de forma espontánea ( $\Delta G < 0$ ) y son procesos exotérmicos ( $\Delta H < 0$ ).

Una vez establecidos los valores de las constantes de formación, se determinó el pKa de los complejos de inclusión, los cuales tuvieron valores mayores que los correspondientes a los terpenos en medio acuoso.

Se empleó el método de Higuchi-Connors para estudiar el aumento de la solubilidad de ambos terpenos en función de la concentración de  $\beta$ -ciclodextrina, con lo cual se logró aumentar la solubilidad en un 60 %.

# Índice

<b>Antecedentes</b> .....	<b>1</b>
Ciclodextrinas .....	1
Complejos de inclusión .....	7
Métodos de obtención de complejos de inclusión .....	8
Timol y Carvacrol .....	11
Complejos de inclusión de Timol y Carvacrol con $\beta$ -ciclodextrina.....	15
Métodos para determinar constantes de formación.....	17
Espectrofotometría UV-Vis .....	17
Método de relaciones molares.....	18
Calorimetría por titulación isotérmica (ITC).....	22
<b>Hipótesis y objetivos</b> .....	<b>26</b>
Hipótesis.....	26
Objetivos .....	26
Objetivo general .....	26
Objetivos particulares.....	26
<b>Timol</b> .....	<b>28</b>
Metodología.....	28
Resultados y Análisis de resultados .....	33
Estudio de estabilidad del Timol.....	33
pKa de Timol .....	36
Formación del complejo de inclusión Timol- $\beta$ -ciclodextrina.....	41
Espectrofotometría UV-Vis .....	41
Calorimetría de titulación isotérmica .....	50
Determinación del pKa del complejo Timol- $\beta$ -ciclodextrina .....	54
Estudio de la solubilidad de Timol en función de la concentración de $\beta$ -ciclodextrina .....	57
<b>Carvacrol</b> .....	<b>59</b>
Metodología.....	59
Resultados y Análisis de resultados .....	63
Estudio de estabilidad del Carvacrol .....	63
pKa de Carvacrol .....	66
Formación del complejo de inclusión Carvacrol- $\beta$ -ciclodextrina.....	71

Espectrofotometría UV-Vis .....	71
Calorimetría de titulación isotérmica .....	83
Determinación del pKa del complejo Carvacrol- $\beta$ -ciclodextrina .....	86
Estudio de la solubilidad de Carvacrol en función de la concentración de $\beta$ - ciclodextrina.....	90
<b>Conclusiones .....</b>	<b>93</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>94</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>i</b>
I. Programa SQUAD .....	i
II. Método de Higuchi-Connors .....	iii



# Antecedentes

## Ciclodextrinas

De acuerdo a Jean-Marie Lehn, la química supramolecular se define como la química de las interacciones no covalentes que se presentan en los sistemas moleculares complejos que se forman a partir de la asociación de dos o más moléculas, que se conocen como anfitrión y huésped (Steed & Atwood, 2009).

Un grupo de compuestos que estudia la química supramolecular son los complejos de inclusión formados entre ciclodextrinas y diversas moléculas de naturaleza hidrofóbica (Dodziuk, 2006).

Las ciclodextrinas son polímeros cíclicos conformados por D-glucopiranosas unidas por enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4). Se obtienen por la degradación del almidón por la enzima ciclodextrin-glicosil-transferasas. En la degradación del almidón se obtiene diferentes ciclodextrinas, siendo las más importantes las de 6, 7 y 8 unidades de glucosa. Las diferentes ciclodextrinas se identifican como  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$  dependiendo del número de unidades de glucosa que estén presentes en su estructura (Figura 1.1) (Kurkov & Loftsson, 2013).

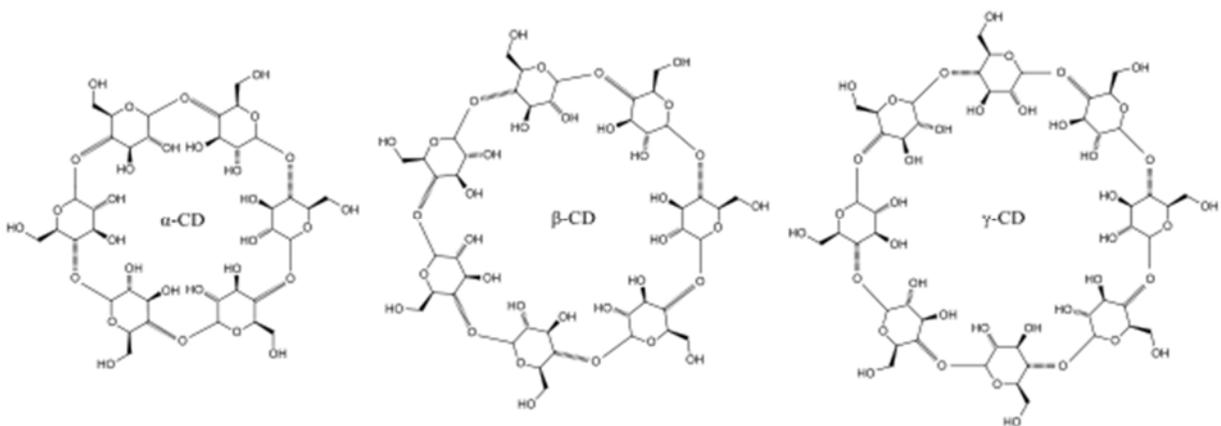


Figura 1.1. Estructura de las ciclodextrinas:  $\alpha$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina y  $\gamma$ -ciclodextrina.

Poseen un arreglo de cono truncado con los grupos hidroxilo secundarios localizados en el lado más ancho y los hidroxilos primarios en el borde más estrecho. Gracias a esta configuración, la cavidad de la ciclodextrina es de baja polaridad y la parte exterior hace que sea posible que se disuelva en agua (Dinar, Sahra, Seridi, & Kadri, 2014). Es por esto que las ciclodextrinas son capaces de formar complejos de inclusión con moléculas de baja polaridad (Figura 1.2).

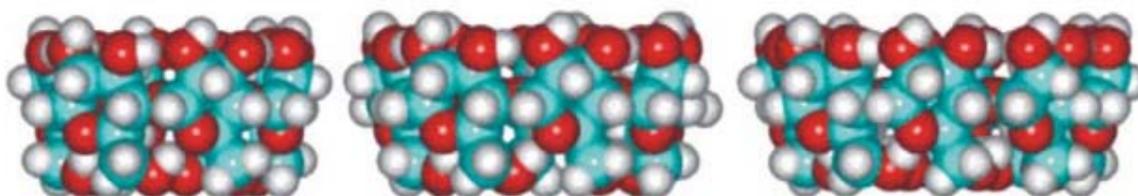


Figura 1.2. Forma de cono truncado de  $\alpha$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina y  $\gamma$ -ciclodextrina.

Las ciclodextrinas fueron descubiertas a finales del siglo XIX; la primera publicación acerca de estos compuestos se publicó en 1891. A. Villiers describió la obtención de 3 g del producto de la digestión de almidón por una bacteria, a este producto lo llamó celulosina ya que, al igual que la celulosa, la celulosina era resistente a la hidrólisis ácida y no poseía propiedades reductoras (Kurkov & Loftsson, 2013).

En 1903, el microbiólogo austriaco Franz Schardinger publicó un artículo en donde pudo obtener dos productos cristalinos a partir de la digestión bacteriana de almidón de papa, y renombró a la celulosina como dextrina cristalina, las cuales cambió a  $\alpha$ -dextrina y  $\beta$ -dextrina. Schardinger demostró que las dextrinas pueden producirse a partir de almidón obtenido por diferentes productos como papa, arroz o trigo y el tipo de dextrina que se podía obtener dependía del tipo de bacteria que se utilizara en la digestión del almidón. En 1911 publicó un artículo en donde se presentaban las propiedades fisicoquímicas de las ciclodextrinas (Loftsson & Duchêne, 2007).

La existencia de la  $\gamma$ -ciclodextrina fue conocida hasta 1935 por Freudenberg y Jacobi. Freudenberg y Cramer sugirieron que existían ciclodextrinas con un número mayor

de unidades de glucopiranososa en su estructura y fue hasta 1965 que French la descubrió. Freudenberg y colaboradores fueron quienes demostraron que las ciclodextrinas poseen una estructura cíclica en donde las unidades de glucosa se encuentran unidas por enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) y que tienen una cavidad central (Jansook, Ogawa, & Loftsson, 2018).

Cramer describió en 1967 la estructura y las propiedades fisicoquímicas de  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y  $\gamma$ -ciclodextrina como es el tamaño de la cavidad (Figura 1.3), solubilidad, reactividad, su capacidad de formar complejos y su efecto en la estabilidad de moléculas huésped (Cramer, Saenger, & Spatz, 1967)(Tabla 1)

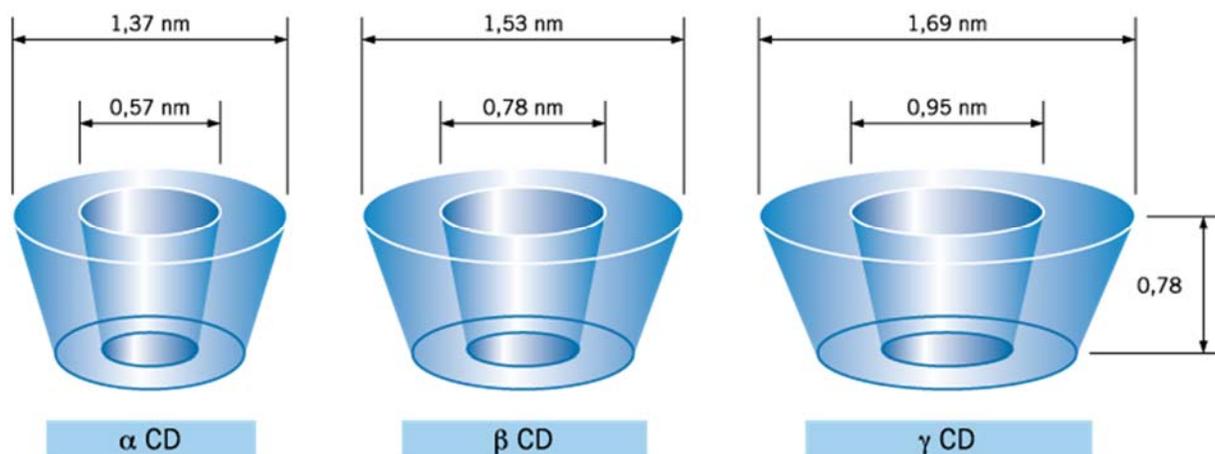


Figura 1.3. Dimensiones de las ciclodextrinas.

Tabla 1.1. Propiedades de las ciclodextrinas\*.

Propiedad	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
Número de unidades de glucosa	6	7	8
Diámetro de la cavidad interior (pm)	972	1134	1296
Diámetro externo (pm)	1460	1540	1750
Volumen aproximado de la cavidad ( $10^6$ pm <sup>3</sup> )	174	262	427
Solubilidad en agua a 25 °C (g/100 mL)	14.5	1.85	23.2
Intervalo de temperatura de fusión (°C)	255-260	255-265	240-245
Número de moléculas de agua en la cavidad	6	11	17
pKa <sup>‡</sup>	12.3	12.2	12.1

\* (Dodziuk, 2006)

‡ (Bernad Bernad, 1998)

La solubilidad de las ciclodextrinas es menor que las de sus análogos lineales, además, la solubilidad de la  $\beta$ -ciclodextrina es menor debido a que, por su estructura, puede formar enlaces de hidrógeno intramoleculares. Es por esto que se han hecho modificaciones químicas a la estructura de las ciclodextrinas para aumentar la solubilidad de éstas (Dodziuk, 2006).

Se ha descubierto que al sustituir alguno de los grupos hidroxilo de las ciclodextrinas por un grupo hidrofóbico aumenta la solubilidad en agua. Los derivados de ciclodextrinas más empleados son la 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina, 2-hidroxiopropil- $\gamma$ -ciclodextrina, sulfobutiléter  $\beta$ -ciclodextrina, glucosil-  $\beta$ -ciclodextrina y maltosil- $\beta$ -ciclodextrina (Kurkov & Loftsson, 2013).

Para 1970, en Japón se habían estudiado las propiedades químicas de las ciclodextrinas, así como su producción; e inició su empleo en las industrias alimenticia y cosmética. En la industria alimenticia se comenzaron a usar como estabilizadores de saborizantes, así como atenuante de olores y sabores no deseados. En la industria cosmética, las ciclodextrinas cumplen el papel de estabilizadores de compuestos químicamente lábiles, haciendo que la acción del maquillaje sea más duradera, se emplean para disminuir la irritación que producen ciertos compuestos y para eliminar malos olores (Loftsson & Duchêne, 2007).

Para 1990, Japón se convirtió en el país que más ciclodextrinas consumía, alrededor de 1800 toneladas al año, de las cuales, 80% se empleaba en la industria alimenticia y 10% en la cosmética; sólo el 5% era utilizada en la industria farmacéutica y agrícola.

Por otro lado, el uso industrial de las ciclodextrinas en Europa y América fue menor que en Japón. A inicios de la década de los 90, Procter & Gamble lanzó un suavizante de telas que estaba hecho a base de ciclodextrinas. Hoy en día, es una de las compañías que más ciclodextrinas usa (Loftsson & Duchêne, 2007).

El primer uso que tuvo la  $\beta$ -ciclodextrina en la industria farmacéutica fue en 1976 cuando en Japón se comercializaron las tabletas sublinguales Prostarmon E<sup>TM</sup>, donde el principio activo es la prostaglandina E2 (Loftsson & Duchêne, 2007).

En 1988, Chiesi Farmaceutici introdujo al mercado las tabletas de piroxicam/ $\beta$ -ciclodextrina y el primer producto farmacéutico introducido en Estados Unidos fue itraconazol/2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina en solución oral, la cual fue aprobada en 1997. Las ciclodextrinas se utilizan como estabilizadores o para reducir la irritación

que producen algunos fármacos. En la Tabla 1.2 se presentan algunos medicamentos que se comercializan como complejos de ciclodextrinas.

Tabla 1.2. Productos farmacéuticos que contienen ciclodextrinas (Loftsson & Duchêne, 2007).

Fármaco/ciclodextrina	Nombre comercial	Formulación	País
<b><math>\alpha</math>-ciclodextrina</b>			
Alprostadil (PGE1)	Prostavastin	Solución intravenosa	Japón, EE. UU., Europa
Cefotiam hexetil HCl	Pansporin T	Tableta	Japón
<b><math>\beta</math>-ciclodextrina</b>			
Benexato HCl	Ulgut, Lonmiel	Cápsula	Japón
Cefalosporina	Meiact	Tableta	Japón
Piroxicam	Brexin, Cicladon	Tableta, supositorio	Europa, Brasil
Nicotina	Nicorette, Nicogum	Tableta, chicle	Europa
Omeprazol	Omebeta	Tableta	Europa
Nitroglicerina	Nitropen	Tableta sublingual	Japón
<b>2-hidroxiopropil-<math>\beta</math>-ciclodextrina</b>			
Itraconazol	Sporanox	Oral e inyección intravenosa	Europa (EE. UU.)
Cisaprida	Propulsid	Supositorio	Europa

## Complejos de inclusión

La forma de cono truncado de las ciclodextrinas (Figura 1.4) se debe a la configuración  ${}^4C_1$  (conformación de silla) de las unidades de glucopiranososa, con lo cual, los grupos hidroxilo secundarios quedan alineados a la abertura más ancha del cono, mientras que los hidroxilos primarios, hacia la abertura más estrecha, haciendo que la parte externa de las ciclodextrinas sea hidrofílica. Dentro de la cavidad se alinean los hidrógenos y los oxígenos que participan en el enlace glucosídico, dando un ambiente lipofílico (J Szejtli & Szente, 2005) (Mura, 2014).

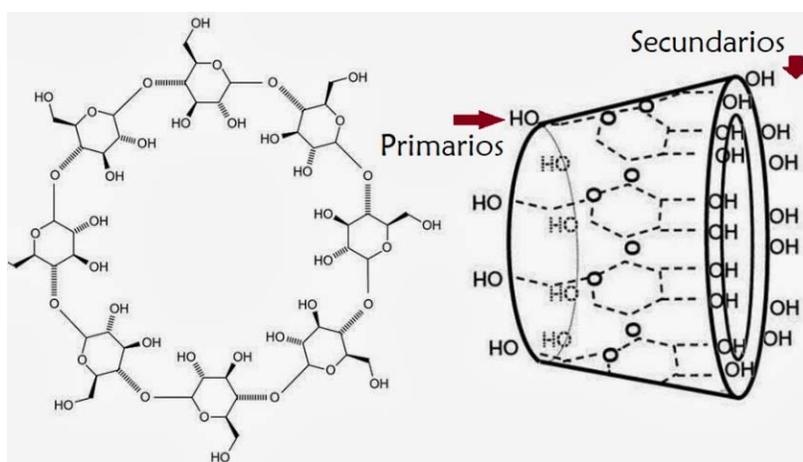


Figura 1.4. Conformación de las ciclodextrinas.

Tanto en solución como en estado sólido, dentro de la cavidad de las ciclodextrinas, se encuentran moléculas de agua; las cuales, pueden ser fácilmente sustituidas por huéspedes apropiados en donde se presenten interacciones favorables entre la ciclodextrina y el huésped. Las interacciones ciclodextrina-huésped suelen ser no covalentes como: interacciones hidrofóbicas, disminución de la tensión conformacional, enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas o fuerzas de Van der Waals. Es importante considerar que la principal fuerza que hace que se lleve a cabo la formación del complejo es el reemplazo de las moléculas de agua (interacción poco favorable, alta entalpía) por una moléculas de menor polaridad (interacción apolar-apolar) (Mura, 2014).

Los complejos de inclusión con ciclodextrinas son de gran importancia debido a que tienen diversas aplicaciones, en especial en la industria alimentaria. Las razones principales por las que se emplean los complejos de inclusión son (Astray, Mejuto, Morales, Rial-Otero, & Simal-Gándara, 2010):

- Evitar la descomposición de compuestos lipofílicos sensibles a la luz, el oxígeno y el calor.
- Solubilizar compuestos poco solubles en agua.
- Estabilizar fragancias, sabores, vitaminas y aceites esenciales.
- Suprimir olores y sabores no deseados.
- Liberación controlada del huésped.

## **Métodos de obtención de complejos de inclusión.**

Existen diferentes métodos para la obtención de los complejos de inclusión; los métodos más empleados son (Bernad Bernad, 1998):

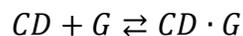
1. Mezcla de disolventes: tanto la ciclodextrina como el huésped son disueltos en un disolvente miscible en agua para después mezclar ambas disoluciones y dejar evaporar.
2. Adición del huésped a una disolución de ciclodextrina: En este caso, se agrega el huésped a una disolución de ciclodextrina hasta que el huésped se disuelva por completo sin llegar a la saturación del sistema.
3. Coprecipitación: En este caso no se disuelve la ciclodextrina, sino que se suspende en agua a temperatura ambiente y se controla la cantidad de huésped añadido.
4. Neutralización: En este caso, se disuelve la ciclodextrina en agua, se aumenta el pH de la solución y se añade el huésped. Finalmente, se neutraliza agregando solución ácida hasta que precipite el complejo de inclusión.
5. Mezcla física: Se coloca la ciclodextrina y el huésped en una mezcladora durante un cierto tiempo.

6. Amasado: Se colocan la ciclodextrina y el huésped en un mortero y se humedece con un poco de disolvente, se amasa hasta la incorporación total y se deja evaporar el disolvente.
7. Molienda: Se coloca la ciclodextrina y el huésped dentro de un molino durante un tiempo determinado.
8. Fusión del huésped. El huésped se funde para después agregar la ciclodextrina

El método de obtención de un complejo de inclusión dependerá de cada tipo de huésped.

En medio acuoso, la cavidad de las ciclodextrinas se encuentra ocupada por moléculas de agua, las cuales poseen una gran entalpía como resultado de las interacciones poco favorables (polar-no polar). Esta alta entalpía de las moléculas de agua es la fuerza motriz para que sean sustituidas por una molécula de baja polaridad o no polar. Por lo regular, los complejos de inclusión presentan una relación molar 1:1 (József Szejtli, 1998).

La formación de los complejos de inclusión en medio acuoso se encuentra en equilibrio (Figura 5):



Donde:

CD es la ciclodextrina

G es el huésped

CD·G es el complejo de inclusión

Cuya constante de equilibrio es

$$K = \frac{[CD \cdot G]}{[CD][G]}$$

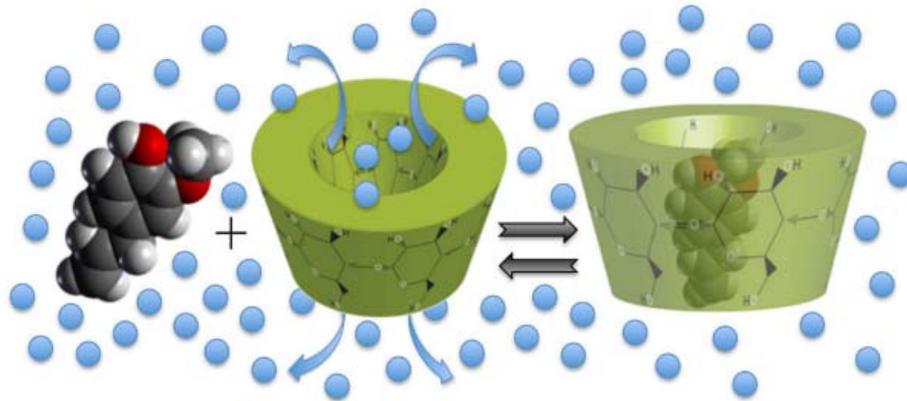


Figura 1.5. Equilibrio de formación del complejo de inclusión (Mura, 2014).

Existen diferentes técnicas analíticas para estudiar a los complejos de inclusión, las cuales, nos proporcionan información sobre qué tipo de interacción se da entre el huésped y la ciclodextrina. Dichas técnicas se basan en la variación de una propiedad fisicoquímica debida a la formación del complejo en solución. Las técnicas más utilizadas para estudiar a los complejos de inclusión son (Mura, 2014):

- Espectrofotometría UV-Vis.
- Dicroísmo circular.
- Fluorescencia.
- Resonancia magnética nuclear (RMN).
- Resonancia spin electrónica (ESR).
- Polarografía.
- Voltamperometría.
- Potenciometría.
- Conductimetría.
- Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).
- Electroforesis capilar (CE).
- Polarimetría.
- Titulación calorimétrica isotérmica (ITC).

Se han estudiado la formación de complejos de inclusión de  $\beta$ -ciclodextrina con diversos componentes de aceites esenciales, como son: eugenol, eucaliptol, geraniol, limoneno, linalool,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, pulegona, entre otros (Kfoury, Auezova, Fourmentin, & Greige-Gerges, 2014).

## Timol y Carvacrol

En los últimos años, los aceites esenciales han recibido una mayor atención por poder ser utilizados como conservadores. Los aceites esenciales son mezclas de compuestos de naturaleza lipofílica que son sintetizados por plantas. A los componentes de los aceites esenciales son un conjunto de metabolitos secundarios y por lo regular son terpenos. Algunos metabolitos secundarios de las plantas poseen propiedades tales como: combatir bacterias, hongos y agentes patógenos en alimentos (Lima et al., 2016).

El carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) y el timol (2-isopropil-5-metilfenol) (Figura 1.6) son dos isómeros fenólicos monoterpénicos presentes en diversos aceites esenciales, en especial en el aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* L.). El carvacrol y el timol, al ser de naturaleza lipídica, poseen una solubilidad escasa en agua (Kfoury, Landy, et al., 2016).

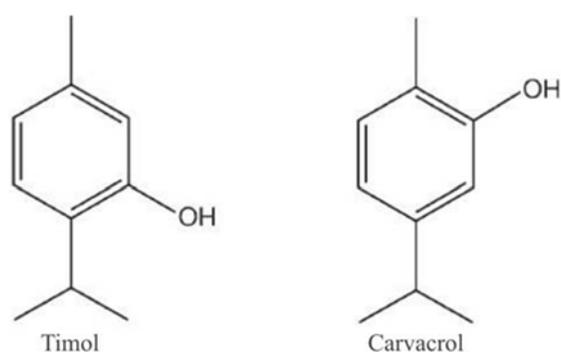


Figura 1.6. Timol y Carvacrol

El timol y el carvacrol se clasifican como monoterpénicos debido a que en su estructura contienen 10 átomos de carbono. La biosíntesis de los monoterpénicos viene dada por

la ruta del mevalonato (Figura 1.7), el cual, se forma en las plantas a partir de la condensación de tres moléculas de acetil coenzima A. (Friedman, 2014):

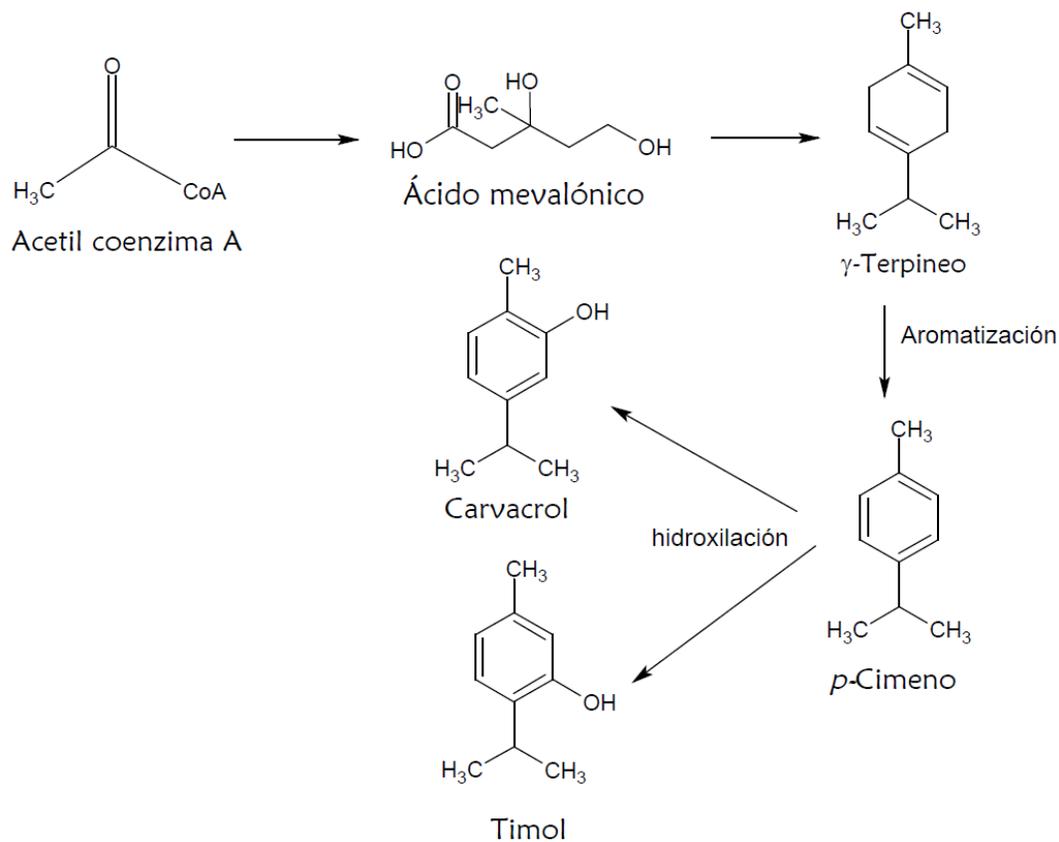


Figura 1.7. Biosíntesis de Timol y Carvacrol (Friedman, 2014)

En la tabla 1.3 se presentan las propiedades físicas y químicas del timol y carvacrol (Friedman, 2014)

Tabla 1.3. Propiedades del Timol y Carvacrol.

Propiedad	Timol	Carvacrol
Fórmula	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O
Masa molar (g/mol)	150.22	150.22
Estado de agregación	Sólido	Líquido
Punto de ebullición (°C)	232.5	237.7
Punto de fusión (°C)	51.5	1.0
Densidad (g/mL)	0.965	0.967
Solubilidad	0.98 g/L en agua a 25 °C	1.25 g/L en agua a 25 °C
pKa	10.6 (Serjeant, Ep; Dempsey, B, 1979)	No reportado
LogP	3.3	3.49
Índice de refracción	1.5227	1.5230

Tanto el timol como el carvacrol poseen propiedades biológicas de gran importancia, como son: analgésicos, antialérgicos, antiarrítmicos, antifúngicos, antimicrobianos,

antibióticos, antiinflamatorios, antioxidantes, insecticidas, neuroprotectores, gastroprotectores, antivirales, anticancerígenos, entre otras (Friedman, 2014).

Se ha reportado que diversos derivados de carvacrol se pueden emplear como: antioxidantes y antimicrobianos (hidroximetil carvacroles); antiinflamatorio (acetato de carvacrilo y otros ésteres); antifúngico e insecticida, entre otros (Figura 1.8) (Ben Arfa, Combes, Preziosi-Belloy, Gontard, & Chalier, 2006; Friedman, 2014).

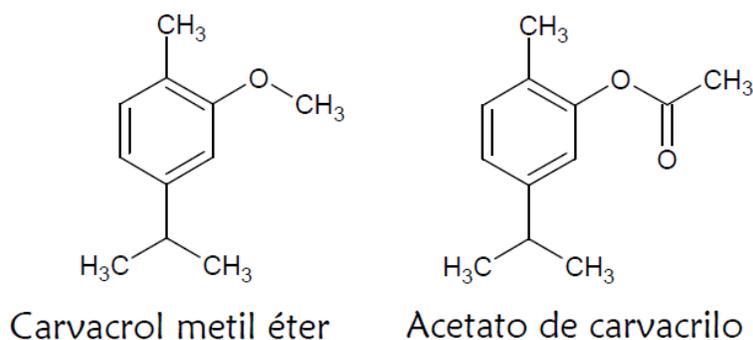


Figura 1.8. Derivados de Carvacrol.

Estos dos compuestos fenólicos se usan a bajas concentraciones como saborizantes en alimentos, bebidas sin alcohol y en gomas de mascar. El Consejo Europeo ha añadido al carvacrol a la lista de saborizantes químicos y debe de tener concentraciones de 2 ppm en bebidas, 5 ppm en alimentos y 25 ppm en dulces (Menezes et al., 2016).

Una de las grandes desventajas del uso de carvacrol y timol como conservadores en alimentos es que pueden evaporar durante el almacenamiento por su alta volatilidad, su reactividad con otros componentes presentes en los alimentos y su baja solubilidad en agua además de su fuerte sabor y olor (Souza et al., 2018).

La formación de un complejo de inclusión con ciclodextrinas puede contrarrestar dichas desventajas, ya que, al formarse el complejo, las propiedades del “huésped” se ven modificadas. La inclusión de los monoterpenoides en ciclodextrina aumenta la solubilidad de éstos, aumenta la estabilidad de los mismos, y abate sus propiedades organolépticas (olor y sabor) (Dodziuk, 2006).

## Complejos de inclusión de Carvacrol y Timol con $\beta$ -ciclodextrina

El equipo de investigación de Kfoury en 2016 determinaron los valores de constantes de estabilidad de los complejos de inclusión de timol y carvacrol con diferentes ciclodextrinas utilizando diversas técnicas. En su estudio, encontraron que la relación estequiométrica entre los monoterpenos y las ciclodextrinas es 1:1. En la Tabla 1.4 se presentan los valores que fueron determinados por espectrofotometría UV-Visible.

Tabla 1.4. Valores de constantes de formación de los complejos de inclusión de carvacrol y timol con ciclodextrinas (Kfoury, Landy, et al., 2016).

Ciclodextrina	Carvacrol	Log K	Timol	Log K
$\alpha$ -ciclodextrina	454	2.66	107	2.03
$\beta$ -ciclodextrina	2620	3.42	1467	3.17
$\gamma$ -ciclodextrina	999	2.99	233	2.37
HP- $\beta$ -ciclodextrina <sup>1</sup>	2154	3.33	1488	3.17
RAMEB <sup>2</sup>	3564	3.55	3337	3.52
CRYSMEB <sup>3</sup>	2421	3.38	2386	3.38

1. Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina
2.  $\beta$ -ciclodextrina metilada aleatoriamente
3.  $\beta$ -ciclodextrina poco metilada

En el trabajo de Kfoury se realizaron las determinaciones de las constantes de estabilidad mediante un método competitivo entre carvacrol o timol con naranja de metilo. El método empleado por Kfoury consiste en determinar la constante de formación de los complejos de inclusión de naranja de metilo con  $\beta$ -ciclodextrina

mediante una valoración. El método competitivo fue aplicado al agregar timol o carvacrol a una solución de concentraciones conocidas de ciclodextrina y naranja de metilo, lo cual, provoca la modificación de los espectros de absorción (Kfoury, Auezova, Greige-Gerges, & Fourmentin, 2016) (Caron et al., 2000). Además, los valores que reporta el grupo de investigación de Kfoury no presentan la incertidumbre de las constantes.

En el presente trabajo, se emplearon las técnicas de espectrofotometría UV-Vis e ITC para estudiar los complejos de inclusión formados entre  $\beta$ -ciclodextrina con carvacrol y timol.

Además del timol y carvacrol, se han determinado los valores de las constantes de formación de otros terpenos con  $\beta$ -ciclodextrinas. En la Tabla 1.5 se presentan algunos ejemplos.

Tabla 1.5 Logaritmos de las constantes de formación de complejos de inclusión de algunos terpenos con - ciclodextrina.

Terpeno	Log $\beta$	Referencia
Canfeno	3.68	Ciobanu, A. (2013)
<i>p</i> -Cimeno	3.40	Ciobanu, A. (2013)
Mentol	3.24	Ciobanu, A. (2013)
$\alpha$ -Terpineol	3.06	Kfoury, M. (2015)
Eucaliptol	2.79	Ciobanu, A. (2013)
Limoneno	3.50	Ciobanu, A. (2013)

## Métodos para determinar constantes de formación.

De acuerdo con Legget y Wu, las constantes de formación se pueden determinar a partir de datos de propiedades fisicoquímicas del sistema de interés. Las técnicas analíticas para obtener estos datos son: espectrofotometría UV-Vis, calorimetría, potenciometría y resonancia magnética nuclear (RMN) (Martínez Mendoza, 2015).

## Espectrofotometría UV-Vis

La espectrofotometría es la técnica que se basa en la absorción o en la emisión de luz de una especie química.

En la espectrofotometría UV-Vis, se analiza la absorción de radiación de una molécula y el intervalo de longitudes de onda va de los 200 hasta los 900 nm.

Cuando un haz de luz, con una potencia inicial  $P_0$ , pasa a través de una solución, el haz de luz final,  $P$ , será menor que  $P_0$ .



A la relación que existe entre el haz incidente y el haz final, se le conoce como transmitancia,  $T$ .

$$T = \frac{P}{P_0}$$

Experimentalmente, se determina la absorbancia,  $A$ , la cual se define como el logaritmo negativo base 10 de la transmitancia.

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P}$$

La importancia de determinar la absorbancia de un sistema se debe a que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de analito absorbente, como lo indica la ley de Lambert-Beer.

$$A^\lambda = \epsilon^\lambda bC$$

Donde:

A es la absorbancia

$\epsilon$  es el coeficiente de absorptividad molar.

b es la longitud del paso óptico.

C es la concentración de la especie absorbente.

Es importante señalar que tanto la absorbancia, como el coeficiente de absorptividad molar,  $\epsilon$ , son dependientes de la longitud de onda.

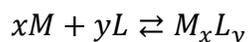
Los datos de absorbancia obtenidos son de suma importancia para determinar las constantes de reacción aparentes.

### **Método de relaciones molares.**

Es importante conocer la relación estequiométrica en la que se forma una especie química en solución; uno de los métodos más empleados para conocer la estequiometría de una reacción química es el método de las relaciones molares (Martínez Mendoza, 2015).

En éste método se mantiene fija la concentración de uno de los reactivos y la concentración del segundo va variando en una serie de soluciones. A cada sistema se le determina alguna propiedad fisicoquímica (respuesta) que esté relacionada con la concentración, ya sea del complejo formado, de los reactivos o ambos (Rodríguez Orduño, 2017).

Considerando la formación del complejo  $M_xL_y$ :



Cuya constante de formación es:

$$\beta = \frac{[M_xL_y]}{[M]^x[L]^y}$$

Teniendo en cuenta que solo el complejo es el responsable de la respuesta a medir, la respuesta (R), queda definida como

$$R = k_{M_xL_y}[M_xL_y]$$

Siendo  $k_{M_xL_y}$  el factor de respuesta.

Realizando la representación gráfica de la respuesta en función de la relación molar, para *reacciones cuantitativas*, se obtiene una trayectoria recta y en donde se observe un cambio de pendiente, corresponde a la relación molar estequiométrica. En la Figura 1.9 se presenta el gráfico típico de relaciones molares para una reacción cuantitativa en donde sólo el complejo formado da lugar a la respuesta.

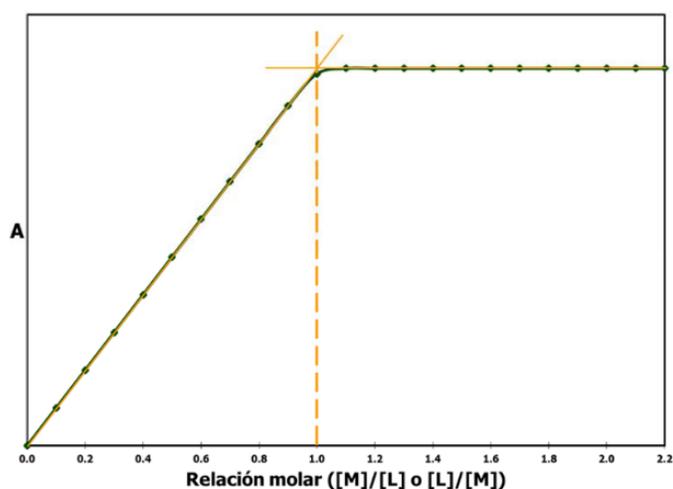


Figura 1.9. Gráfico típico de relaciones molares.

Otra ventaja de emplear el método de relaciones molares es que se pueden estudiar la formación de complejos sucesivos, siempre y cuando los valores de las constantes de formación sean considerablemente distintas y los factores de respuesta no sean iguales (Figura 1.10).

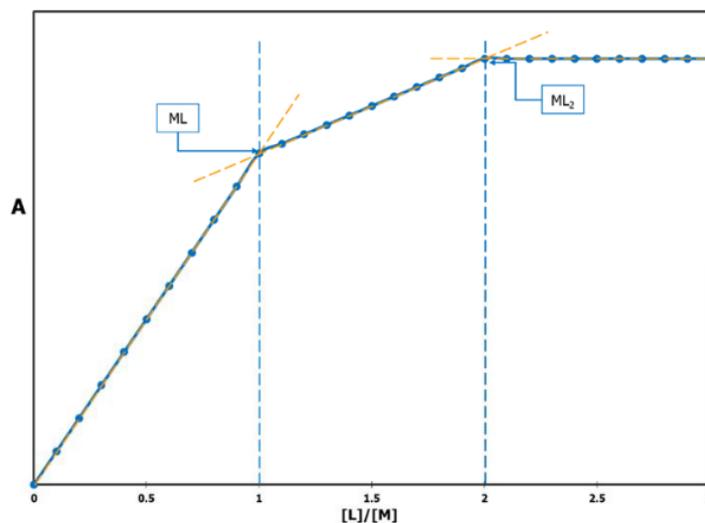


Figura 1.10. Gráfico típico de relaciones molares para la formación sucesiva de complejos.

Cuando la formación del complejo es *poco cuantitativa*, es decir, que la constante de formación del complejo es menor de  $10^3$ , el gráfico típico que se obtiene es el que se presenta en la Figura 1.11.

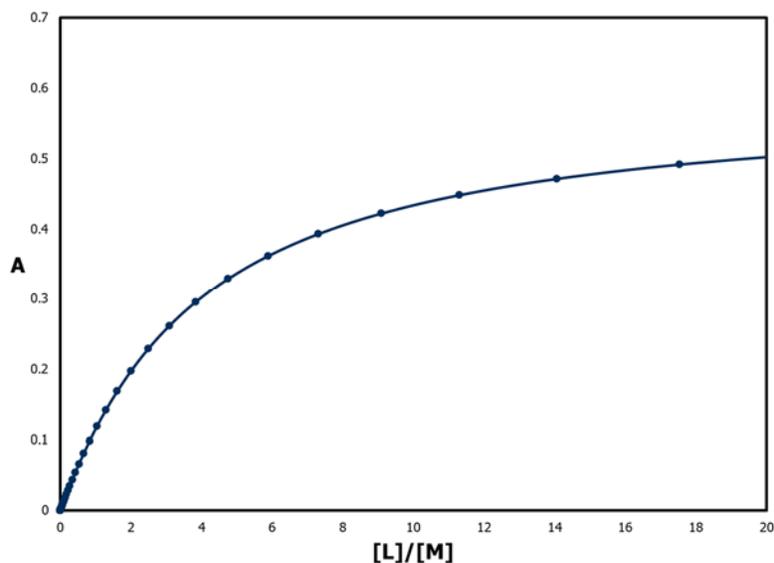


Figura 1.11. Gráfico típico de relaciones molares para la formación de un complejo ML y  $\log \beta=3$ .

Como se puede observar en la Figura 1.11, para reacciones poco cuantitativas no se puede determinar la relación estequiométrica entre ambos reactivos. Lo que sí nos proporciona información es la representación gráfica de la respuesta en función del cologaritmo de la concentración de la partícula de la cual se va variando su concentración ( $pP = -\log [P]$ ), ya que, a partir de éste gráfico se puede estimar el valor de la constante de formación en donde se presenta un cambio pronunciado en la pendiente de la curva que se obtiene (Figura 1.12).

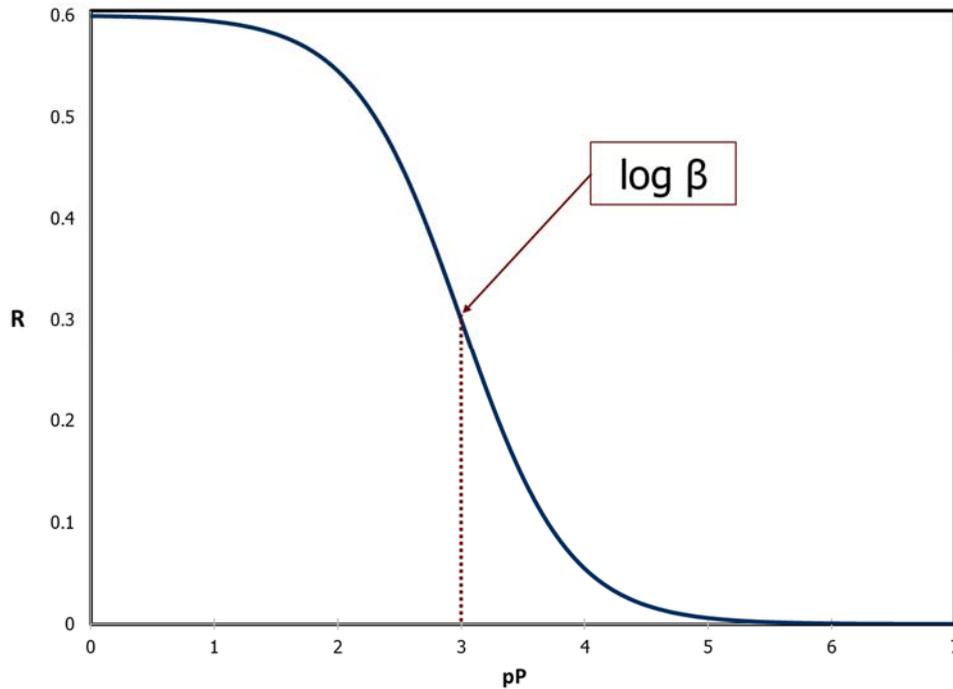


Figura 1.12. Respuesta dada por el método de relaciones molares en función del pP.

## Calorimetría por titulación isotérmica

Los métodos calorimétricos han sido utilizados desde 1937 para determinar constantes de equilibrio. A finales de la década de los años 80 del siglo XX comenzó el desarrollo de la calorimetría por titulación isotérmica, la cual es un método con el que se puede determinar simultáneamente la constante de reacción ( $K_r$ ), la estequiometría y la entalpía de reacción ( $\Delta H_r$ ). A partir de la constante  $K_r$  y el  $\Delta H_r$  es posible determinar los valores de la energía libre de Gibbs asociada a la reacción ( $\Delta G_r$ ) y la aportación entrópica del proceso ( $T\Delta S_r$ ). Es por esto que la calorimetría por titulación isotérmica es un método capaz de determinar el perfil termodinámico de un sistema químico ( $\Delta G_r$ ,  $\Delta H_r$  y  $\Delta S_r$ ) (Hansen, Fellingham, & Russell, 2011).

El procedimiento consiste en realizar inyecciones de valorante (L) a una celda de reacción en donde está contenido el analito (R). La celda de reacción se encuentra dentro de una chaqueta de aislamiento térmico junto a una celda de referencia llena

con disolvente, que es idéntica a la celda de reacción (Figura 1.13). Estas dos celdas se equilibran térmicamente desde el inicio del experimento. La inyección del valorante puede ser continua o por incremento (Hansen et al., 2011).

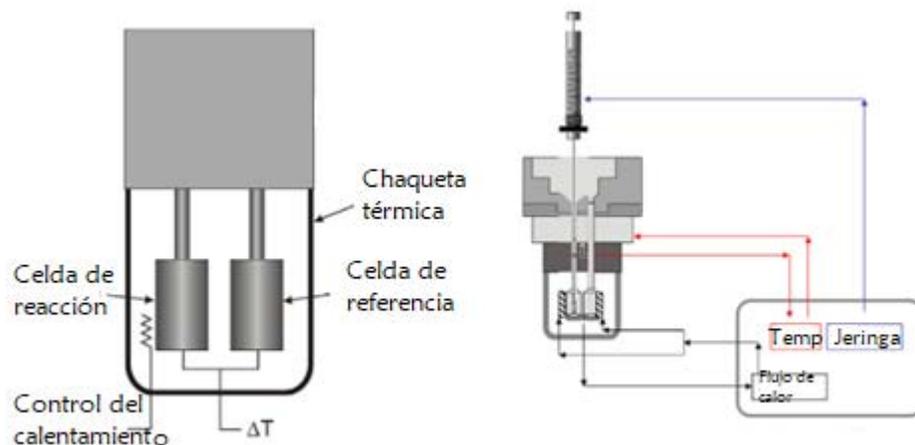


Figura 1.13. Esquema del calorímetro de titulación isotérmica (Arena & Sgarlata, 2017).

La adición continua de valorante se usa solamente para reacciones rápidas y las reacciones lentas pueden ser llevadas a cabo por ambas adiciones. La ventaja que tiene la inyección continua sobre la inyección por incremento es que con la primera se obtiene un número mayor de datos y la curva de valoración que se obtiene suele ser más definida, sobre todo cerca del punto de equivalencia (Hansen et al., 2011).

Cada inyección representa una reacción independiente que tiende al equilibrio bajo condiciones isobáricas y la temperatura de ambas celdas se mantiene constante. El equipo detecta los cambios de temperatura en cada adición de valorante y compensa la ganancia o pérdida de calor. Se obtiene un gráfico de la diferencia de calor asociada a la reacción química en función del tiempo (termograma). A partir del termograma se obtiene una isoterma de enlace, que es la representación gráfica del calor asociado a la reacción en función de la relación molar entre L y R (Figura 1.14).

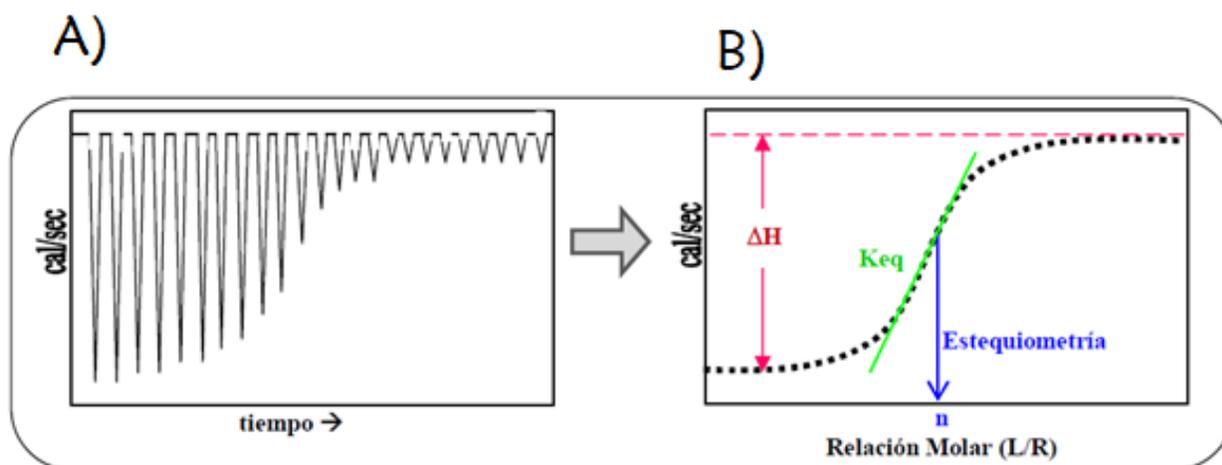


Figura 1.14. Perfil de: A) termograma e B) isoterma de enlace.

En el punto de inflexión de la isoterma de enlace corresponde a la relación estequiométrica de la reacción, la diferencia de calor total corresponde a la entalpía de reacción y la pendiente a la constante de equilibrio. Esto se cumple si sólo se forma un solo complejo de estequiometría sencilla (Martínez Mendoza, 2015).

La calorimetría por titulación isotérmica puede utilizarse para determinar parámetros termodinámicos de diversos procesos químicos, como pueden ser:

- Complejación
- Adsorción-desorción
- Asociación
- Desplazamiento
- Intercambio
- Hidrólisis y solvólisis
- Redox

Una vez recolectados los datos por ITC se debe elegir un modelo químico que describa el sistema. Generalmente, el modelo es:

$$q_{c,i} = \sum_j n_{j,i} \Delta H_j$$

Donde  $n_{j,i}$  es el número de moles de producto de la  $j$ -ésima reacción.

$$K_j = \prod (C_{T,i})^{n_{j,i}} (C_{R,i})^{-n_{j,i}}$$

El  $\Delta H_j$  y la  $K_j$  son constantes definidas para todas las reacciones que se llevan a cabo en cada inyección. El procedimiento para obtener el mejor refinamiento de estas constantes es:

1. Asumir un valor para  $K_j$ .
2. Calcular para cada dato el número de moles de producto, así como el coeficiente de actividad  $\gamma_j$ .
3. Se calcula los valores de  $\Delta H_j$  de tal manera que la suma de los residuales cuadrados sea mínima  $U = \sum_i (q_{c,i}(\text{experimental}) - q_{c,i}(\text{calculado}))^2$
4. Estimar mejores valores de  $K_j$ . Se realiza el proceso iterativo hasta que el valor de  $U$  sea mínimo (Hansen et al., 2011).

Se han hecho diversos estudios sobre la interacción entre los monoterpenos y las ciclodextrinas, pero poco se sabe sobre la fuerza de las interacciones entre estas especies.



# Hipótesis y Objetivos

## Hipótesis.

Debido a que el timol y el carvacrol son dos monoterpenos de naturaleza hidrofóbica, se espera que puedan ser incluidos dentro de la  $\beta$ -ciclodextrina en medio acuoso. Esto se podrá demostrar por espectrofotometría UV-Vis ya que, al incluirse los terpenos dentro de la ciclodextrina, las bandas de absorción se verán modificadas. También será posible comprender el efecto de la inclusión por calorimetría de titulación isotérmica y así se determinarán las constantes de formación, la relación estequiométrica en la formación de cada complejo y los perfiles termodinámicos de la inclusión.

Ya que los monoterpenos timol y carvacrol, son compuestos fenólicos, se espera que se formen enlaces de hidrógeno entre la  $\beta$ -ciclodextrina y ambos terpenos, es decir, que el cambio entálpico de la inclusión sea menor que cero.

## Objetivos

### Objetivo general.

Determinar los valores de las constantes de formación de los complejos de inclusión formados entre carvacrol y timol con  $\beta$ -ciclodextrina, respectivamente, mediante espectrofotometría UV-Vis y calorimetría de titulación isotérmica y hacer una comparación con las constantes reportadas en la literatura.

### Objetivos particulares.

- Determinar el valor de pKa para timol y carvacrol, a través de espectrofotometría UV/Vis haciendo uso del programa SQUAD (anexo I), para conocer las diferentes especies ácido-base de éstos compuestos y sus zonas de predominio.
- Refinar el valor de la constante de formación de  $\beta$ -ciclodextrina con los terpenos timol y carvacrol, mediante espectrofotometría UV-Vis empleando el programa SQUAD.

- Obtener el perfil termodinámico ( $n$ ,  $\log \beta$ ,  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  y  $\Delta S$ ) de la inclusión de timol y carvacrol en  $\beta$ -ciclodextrina mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC), y así establecer la naturaleza de la interacción huésped-anfitrión.
- Determinar los valores de los pKa de los complejos formados entre Timol y Carvacrol con  $\beta$ -ciclodextrina mediante espectrofotometría UV-Vis para entender cómo es que la inclusión de los terpenos modifica sus propiedades fisicoquímicas.
- Emplear el método de Higuchi-Connors (anexo II) para observar cómo aumenta la solubilidad de cada terpeno al encontrarse incluidos dentro de la cavidad de la  $\beta$ -ciclodextrina.



Timol

## Metodología.

### Materiales.

- Vasos de precipitado de 10, 50, 100 y 250 mL.
- Pipetas volumétricas de 4, 9 y 20 mL.
- Espátula.
- Micropipeta BIOHIT 100-1000  $\mu\text{L}$ .
- Micropipeta Finnpipette 20-200  $\mu\text{L}$ .
- Micropipeta Finnpipette 0.5-10  $\mu\text{L}$ .
- Goteros.
- Matraces volumétricos de 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 1000 mL.

### Equipo.

- Balanza analítica Pioneer.
- Potenciómetro Mettler Toledo.
- Electrodo de pH Hach.
- Agitador magnético Cole-Parmer.
- Baño termostataado PolyScience.

- Espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer Lambda 35.
- Microcalorímetro VP-ITC GE Healthcare
- ThermoVac GE

### Reactivos

- Timol  $\geq 98.5\%$  Sigma.
- $\beta$ -Ciclodextrina  $\geq 97\%$  Sigma.
- Fosfato de sodio dibásico 99.7% Fermont.
- Cloruro de sodio Q. P. Reactivos y productos químicos finos.
- Ácido clorhídrico 36% Macron Chemicals.
- Hidróxido de sodio 98.6% Mallinckrodt.
- Agua desionizada 18.2 M $\Omega$  ELGA.
- Nitrógeno 99.997% INFRA.
- Buffers de pH 4, 7 y 10 J. T. Baker.

## Métodos

### Estudio de estabilidad en medio ácido y básico.

- Se prepararon dos soluciones de Timol  $2.83 \times 10^{-4}$  M, una se aforó con HCl 0.1 M y la segunda con NaOH 0.1 M.
- Se determinó el espectro de absorción inmediatamente después de que fueron preparadas las soluciones y cada media hora durante 5 h. Después, se determinaron los espectros cada 24 h hasta completar una semana.

## Determinación del pKa del timol

- Se prepararon dos soluciones de Timol  $2.83 \times 10^{-4}$  M, una se aforó con HCl 0.1 M y la segunda con NaOH 0.1 M. Además, se adicionó la cantidad suficiente para imponer una fuerza iónica de 0.1 M.
- Se tomó una alícuota de la solución básica y se colocó en una celda adaptada a un baño termostatado y en una atmósfera de nitrógeno.
- Se midió el pH de la alícuota y se determinó el espectro de absorbancia.
- Después, se realizó una valoración ácido base, teniendo la solución básica como analito y la solución ácida como valorante. A cada cambio de pH se determinó el espectro de absorbancia.
- EL intervalo de pH en el que se trabajó fue  $13 > \text{pH} > 7$ .
- Se realizó el experimento por triplicado.

## Complejo de inclusión Timol- $\beta$ -Ciclodextrina

### *Espectrofotometría UV-Vis*

- Para la formación del complejo de inclusión, se emplearon las siguientes soluciones:
  - Timol:  $6 \times 10^{-4}$  M
  - $\beta$ -Ciclodextrina:  $1.5 \times 10^{-3}$  M.

Las soluciones se aforaron con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M y pH 7.1.

- Se valoraron 20 mL de solución de  $\beta$ -ciclodextrina con la solución de Timol manteniendo la temperatura en 25 °C en un baño termostatado bajo una atmósfera de nitrógeno. A cada adición se determinaba el espectro de absorción. Los datos de absorbancia se analizaron para determinar el valor de la constante de formación del complejo.
- Por otra parte, se realizó la valoración de 20 mL de Timol con  $\beta$ -Ciclodextrina bajo las condiciones mencionadas anteriormente. A cada adición de  $\beta$ -ciclodextrina se determinaba el espectro de absorción. Los datos obtenidos, se

analizaron para obtener el valor de la constante de formación del complejo de inclusión.

### *Calorimetría.*

- Las concentraciones de las soluciones de Timol y  $\beta$ -ciclodextrina que se emplearon fueron:  $1.5 \times 10^{-4}$  M y  $6.03 \times 10^{-3}$  M, respectivamente. Las soluciones se aforaron con sistema buffer de fosfatos 0.1 M y pH de 7.0.
- Las soluciones se desgasificaron con ayuda del ThermoVac.
- Las celdas de reacción y de referencia del ITC se llenaron con solución de Timol.
- La jeringa se relleno con la solución de  $\beta$ -ciclodextrina teniendo precaución de que no se formaran burbujas.
- Se colocó la jeringa dentro de la celda de reacción y comenzó la valoración. En la Tabla 4.1 se presentan las condiciones experimentales de la titulación calorimétrica.

Tabla 4. 1. Condiciones experimentales de la titulación de Timol con  $\beta$ -ciclodextrina mediante ITC

[Timol] (mM)	0.15
[ $\beta$ -Ciclodextrina] (mM)	6.03
Relación molar máxima	6.29
Número de inyecciones	26
Temperatura (°C)	25
Volumen de inyección ( $\mu$ L)	8
Duración de inyección (s)	16
Tiempo de espaciado (s)	400

Para el calor de dilución, se repitió el experimento, pero en lugar de llenar las celdas con solución de timol, se llenaron con solución buffer.

Los experimentos se realizaron por triplicado.

### Determinación del pKa del complejo Timol- $\beta$ -ciclodextrina

- Se prepararon dos soluciones de Timol  $2.4852 \times 10^{-4}$  M, una se aforo con HCl 0.1 M y la segunda con NaOH 0.1 M. A ambas soluciones se les agregó  $\beta$ -ciclodextrina para tener un  $p\beta\text{-CD}=2$  (0.01 M).
- Se tomó una alícuota de 20 mL de la solución básica y se colocó en una celda conectada a un baño de temperatura constante de 25° C.
- Se midió el pH de la alícuota y se determinó el espectro de absorción UV-Vis.
- Se llevó a cabo la valoración de la solución básica con la ácida y a cada cambio de pH se determinaba el espectro de absorción del sistema.
- Los datos de absorbancia obtenidos se analizaron y se trataron para alimentar el programa SQUAD y así refinar el valor del pKa del complejo Timol-  $\beta$ -ciclodextrina

### Estudio de la solubilidad de Timol en función de la concentración de $\beta$ -ciclodextrina (Método de Higuchi-Connors).

- Se prepararon soluciones de  $\beta$ -ciclodextrina de 1 mM hasta 6 mM.
- A cada solución se le agregó un exceso de Timol y se dejaron en agitación constante durante 96 h.
- Pasadas las 96 h, se tomaron 200  $\mu\text{L}$  de cada solución y se diluyeron en un matraz aforado de 5 mL para cuantificar el contenido de Timol con ayuda de una curva de calibración. Las concentraciones y el número de moles agregados a los sistemas se presentan en la Tabla 4.2.

Tabla 4. 2. Concentraciones de  $\beta$ -ciclodextrina empleadas y cantidad de timol empleados en el método de Higuchi-Connors.

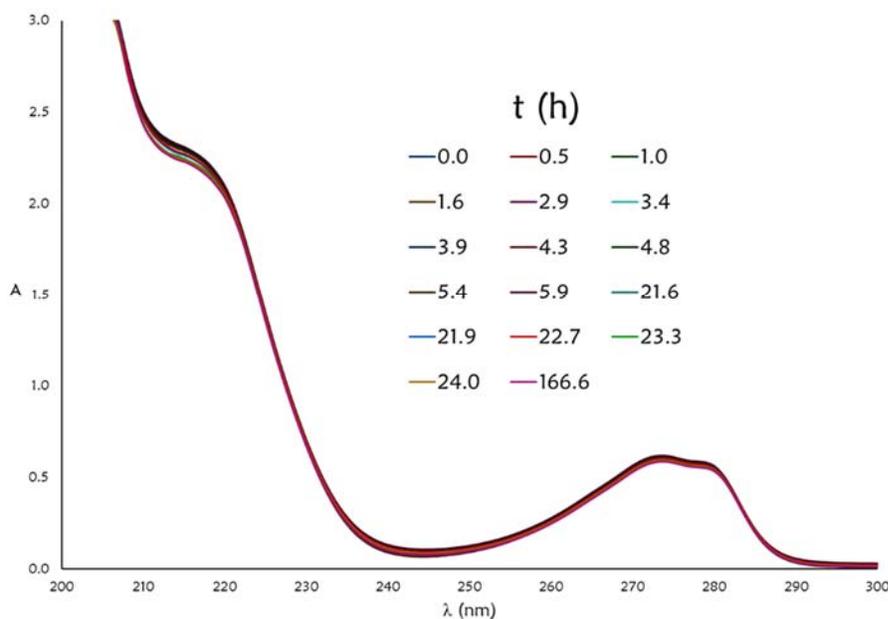
Sistema	[ $\beta$ -CD] (mM)	n <sub>Timol</sub> (mmol)
0	0.00	0.15
1	1.03	0.14
2	2.05	0.13
3	3.08	0.16
4	4.10	0.17
5	5.13	0.14
6	1.16	0.17

## Resultados y Análisis de resultados.

### Estudio de estabilidad del Timol.

- **Timol en HCl 0.1 M**

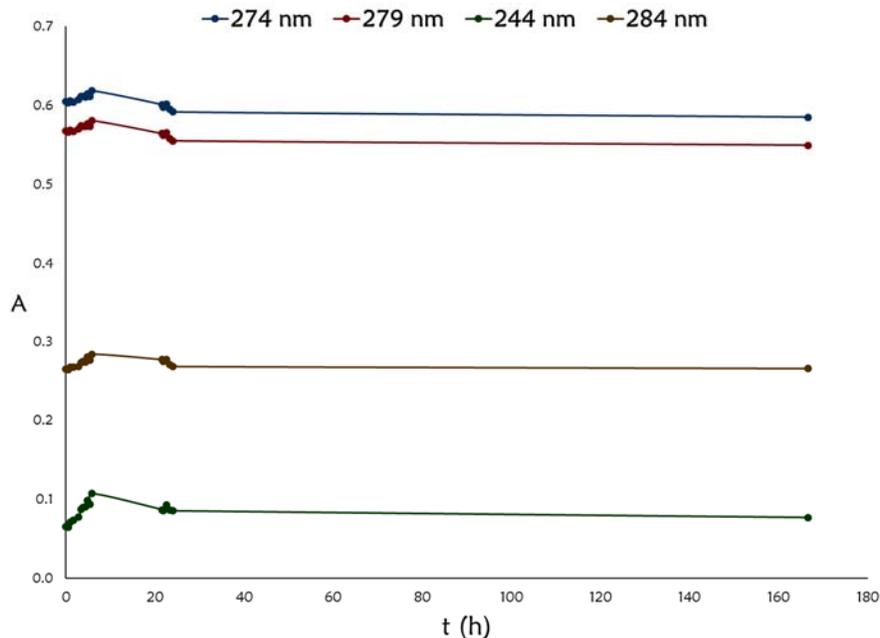
En la Gráfica 4.1 se presentan los espectros determinados a la solución ácida de Timol tomados durante una semana.



Gráfica 4. 1. Espectros de absorción de Timol  $2.83 \times 10^{-4}$  M en medio ácido.

En medio ácido, el timol presenta dos máximos en la absorbancia en 216 nm y 274 nm acompañado de un hombro en 279 nm. Estas bandas son características de bencenos sustituidos por heteroátomos con electrones sin compartir, es por esto que el tipo de transición que se presenta es del tipo  $n-\pi^*$ .

Para comprender la estabilidad del timol en medio ácido, se realizó el gráfico de la absorbancia en función del tiempo (Gráfica 4.2).

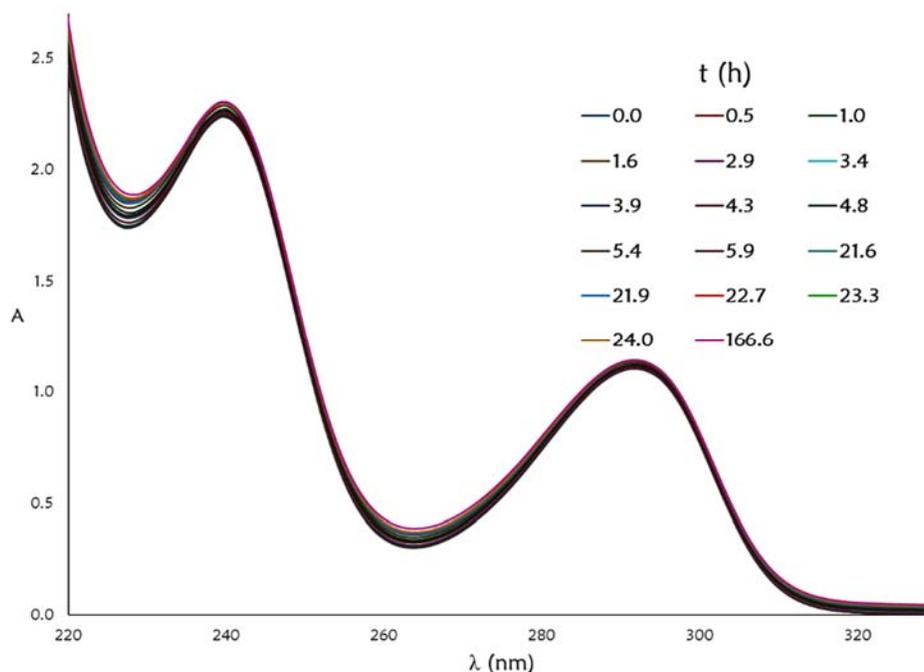


Gráfica 4. 2. Absorbancia de Timol en medio ácido en función del tiempo.

Como se puede observar en la Gráfica 4.2, existen fluctuaciones en la absorbancia en las primeras 24 horas de que se preparó la solución de timol, pero después de que transcurren 24 horas y durante una semana, la absorbancia se mantiene constante, es decir, que el timol se estabiliza en dicho medio. La absorbancia varía en promedio en 1.13%. Es por esto que se decidió preparar las soluciones de timol con un día de anticipación para los experimentos posteriores.

- **Timol en NaOH 0.1 M.**

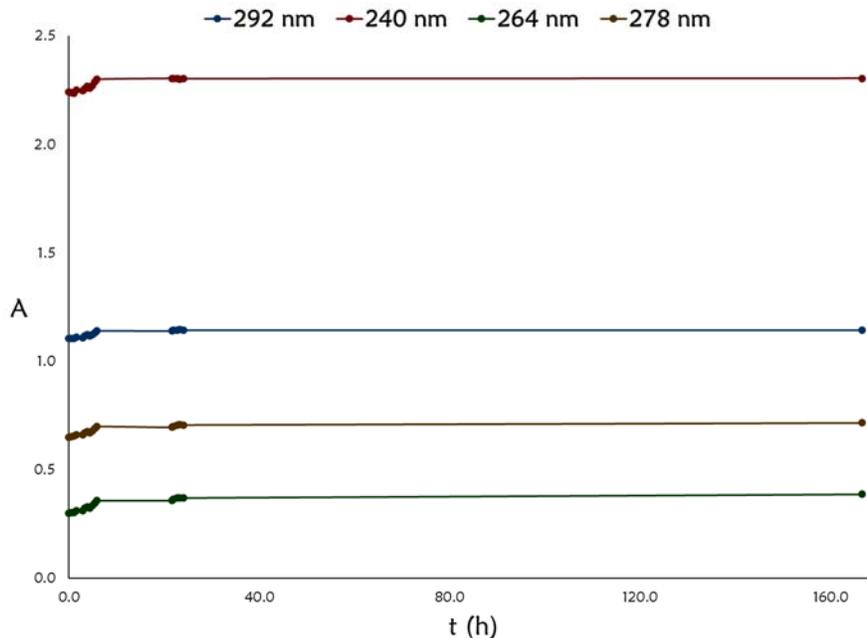
En la Gráfica 4.3 se presentan los espectros de absorción de la solución de Timol  $2.83 \times 10^{-4}$  M diluida en NaOH 0.1 M a diferentes tiempos.



Gráfica 4. 3. Espectros de absorción de timol en medio básico a diferentes tiempos.

Por otro lado, en medio básico, se observan dos máximos en la absorbancia importantes en 240 nm y 292 nm. Éstas bandas son características de bencenos sustituidos por grupos funcionales ionizables, ya que, al encontrarse en forma aniónica, aumenta la disponibilidad de los electrones no compartidos del heteroátomo, y en comparación de las bandas del benceno, ocasiona que las bandas tengan un efecto batocrómico. La transición que se observa es  $n-\pi^*$ .

En la Gráfica 4.4 se presenta la variación de la absorbancia en función del tiempo en diferentes longitudes de onda.



Gráfica 4. 4. Absorbancia en función del tiempo de timol en medio básico.

El comportamiento del timol en medio básico es semejante al observado en medio ácido, ya que, en las primeras horas de haberse preparado la solución, hay oscilaciones en la absorbancia de la solución, la cual, se mantiene constante después de un día y durante una semana. En este caso, la variación de la absorbancia durante una semana no es mayor al 2%. Al igual que la solución ácida, las soluciones de timol en medio básico se prepararon con un día de anticipación para su uso en experimentos posteriores.

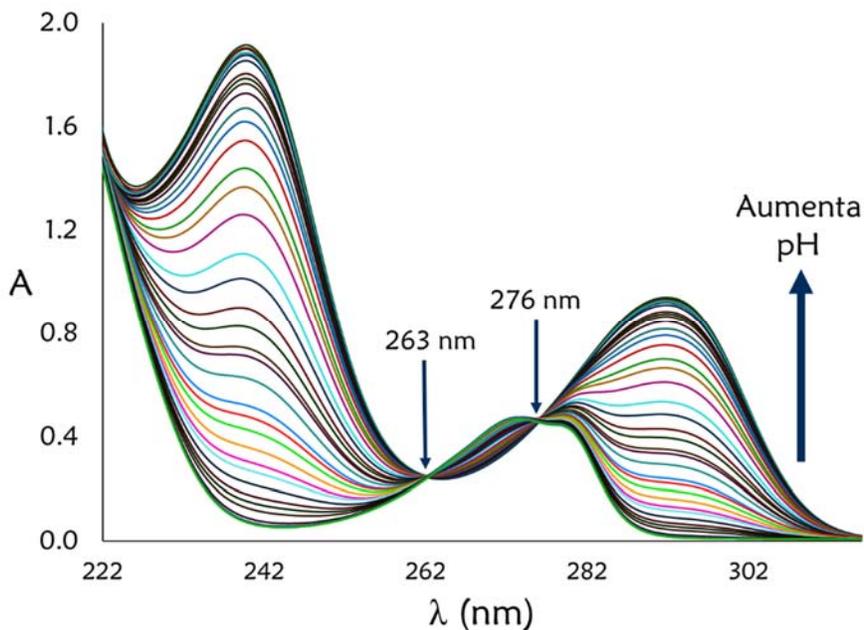
### **pKa de timol.**

En la Gráfica 4.5, se presentan los espectros determinados a la solución de Timol  $2.5 \times 10^{-4}$  M ( $10^{-3.6}$  M). El intervalo de pH de trabajo fue de  $13.09 > \text{pH} > 7.0$ .

En los espectros se forman dos puntos isobésticos: uno en 263 nm y 276 nm, lo cual es un indicio de que existe un equilibrio químico asociado a la partícula de la cual se va variando la concentración, en este caso, en la concentración de  $\text{H}^+$ .

Para comprobar que existe un equilibrio ácido-base asociado al Timol, se utilizó el programa TRIANG. Para determinar el número de componentes de un sistema que

absorben energía electromagnética y dependiendo del número de especies, se sabrá el número de equilibrios ácido-base del sistema. En la Tabla 4.3 se presentan los resultados del programa TRIANG.



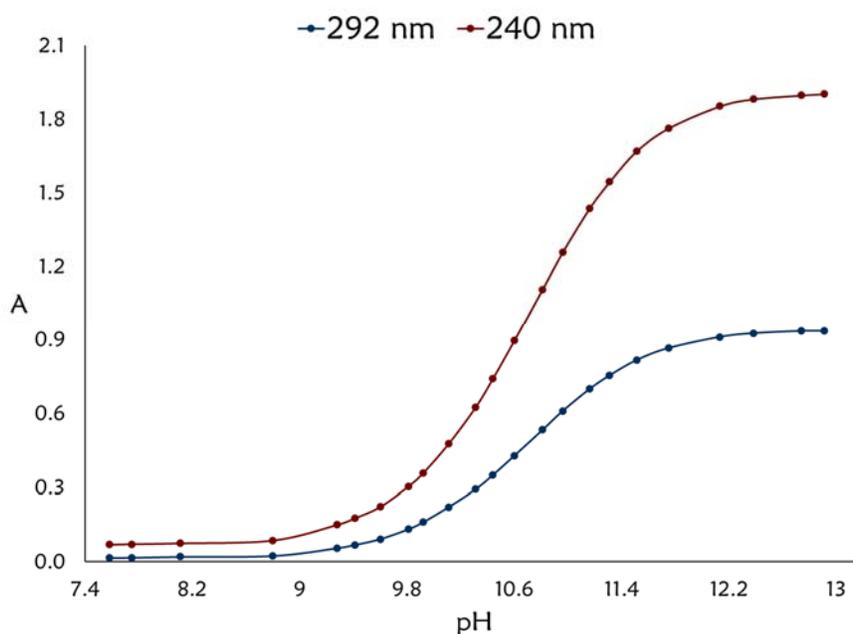
Gráfica 4. 5. Espectros de timol  $2.5 \times 10^{-4}$  M a diferentes valores de pH.

Tabla 4. 3. Resultados obtenidos por TRIANG.

$\Delta T$	No. de especies
0.001	2
0.002	2
0.003	2
0.004	2
0.005	2
0.006	2
0.007	2
0.008	2
0.009	2
0.010	2

De acuerdo con los resultados obtenidos con TRIANG, en el sistema existen dos especies de timol que absorben radiación electromagnética de manera diferente. Por lo tanto, el Timol posee un equilibrio ácido-base.

Una forma de estimar el valor de pKa del Timol es analizando el comportamiento de la absorbancia del sistema en función del pH, por lo que se realizó la gráfica correspondiente. Cabe destacar que en donde el cambio en la absorbancia es muy marcado, es ahí donde se encuentra el valor de pKa. Dicho gráfico se presenta a continuación.



Gráfica 4. 6. Absorbancia de timol en función del pH a 292 nm y 240 nm.

De acuerdo con la Gráfica 4.6, el pKa del Timol se encuentra muy cercano a 10.6, que es donde se observa el punto de inflexión.

Sabiendo que el pKa del timol es cercano a 10.6, se alimentó el programa SQUAD con un modelo monodonador y un valor de pKa inicial de 10.6.

Para el refinamiento de la constante se tomaron los valores de absorbancia de 24 espectros con 48 datos de absorbancia cada uno determinada en un intervalo de

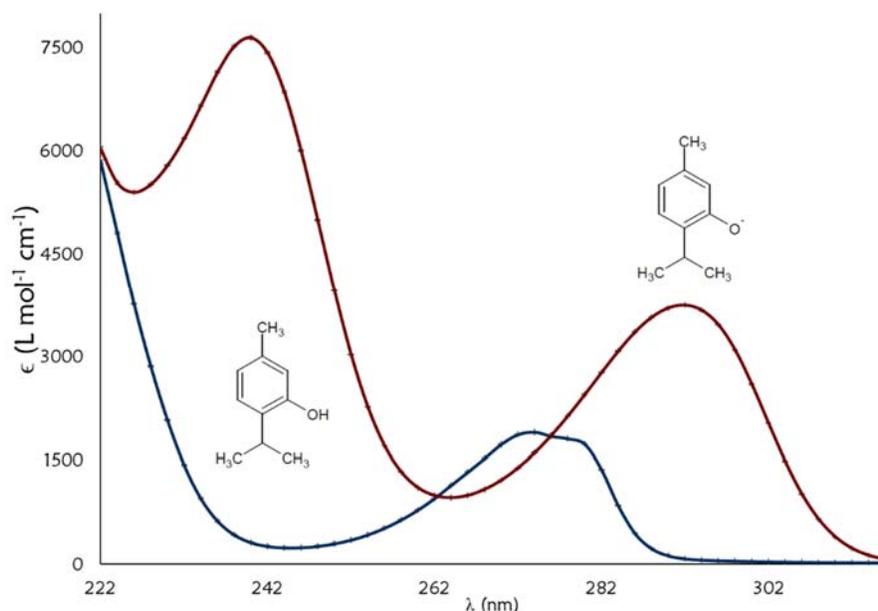
longitud de onda de  $222 < \lambda < 316$ . En la Tabla 4.4 se presentan los resultados obtenidos con SQUAD.

Tabla 4. 4. Resultados obtenidos de la refinación del pKa del timol.

Equilibrio	Log $\beta$	$\sigma$	U
$Tim^- + H^+ \rightleftharpoons HTim$	$10.693 \pm 0.001$	$5.9377 \times 10^{-3}$	$3.7196 \times 10^{-2}$

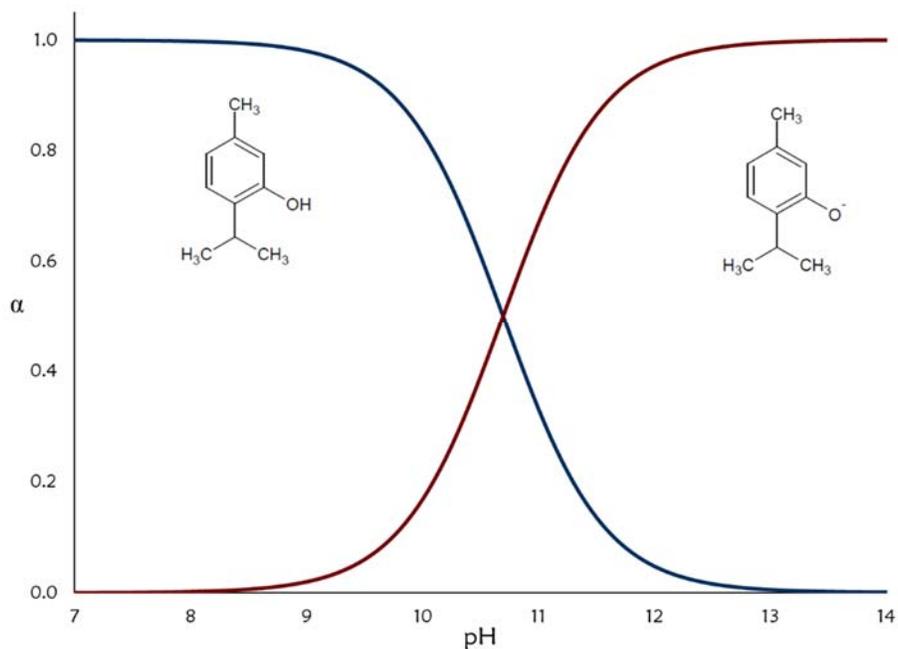
Debido a que el modelo es monoprótico, el valor de  $\log \beta$  coincide con el valor de pKa. Otra cosa importante es que el valor de U, que es la suma de los residuales al cuadrado, tiene un valor adecuado para el número de datos utilizados. Esto quiere decir que el modelo propuesto tiene un buen ajuste a los datos experimentales.

Además de refinar el valor de la constante de disociación ácida, SQUAD da como resultado los valores de los coeficientes de absortividad de cada especie presente en el sistema que sea capaz de absorber luz. Los coeficientes de absortividad se encuentran graficados en función de la longitud de onda en la Gráfica 4.7.



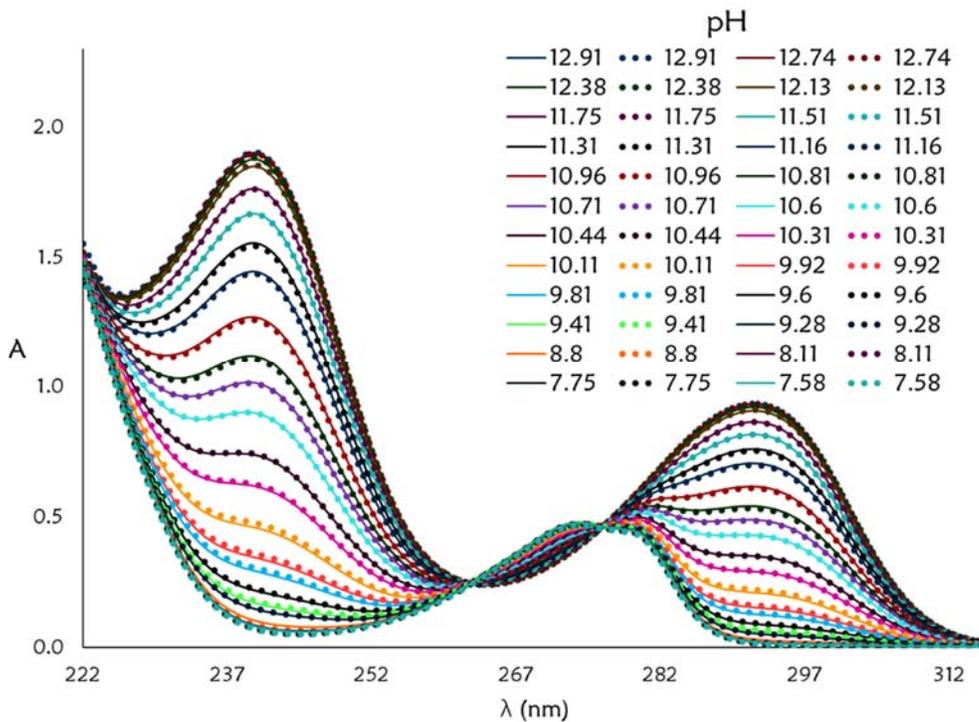
Gráfica 4. 7. Coeficientes de absortividad molar de las especies ácido-base de Timol calculados por SQUAD.

El Timol disuelto en agua se comporta como un ácido monoprótico de Brønsted-Lowry cuyo valor de pKa es de 10.6928. En la Gráfica 4.8 se presenta el diagrama de distribución de especies del timol en función del pH.



Gráfica 4. 8. Diagrama de distribución de especies ácido-base de Timol.

Finalmente, para corroborar el ajuste del modelo propuesto a los datos experimentales de absorbancia, se calcularon los espectros empleados para el refinamiento de la constante (aplicando la ley de Lambert-Beer y la ley de las aditividades). En la Gráfica 4.9 se encuentran interpuestos los espectros experimentales (línea punteada) con los espectros calculados (línea continua).



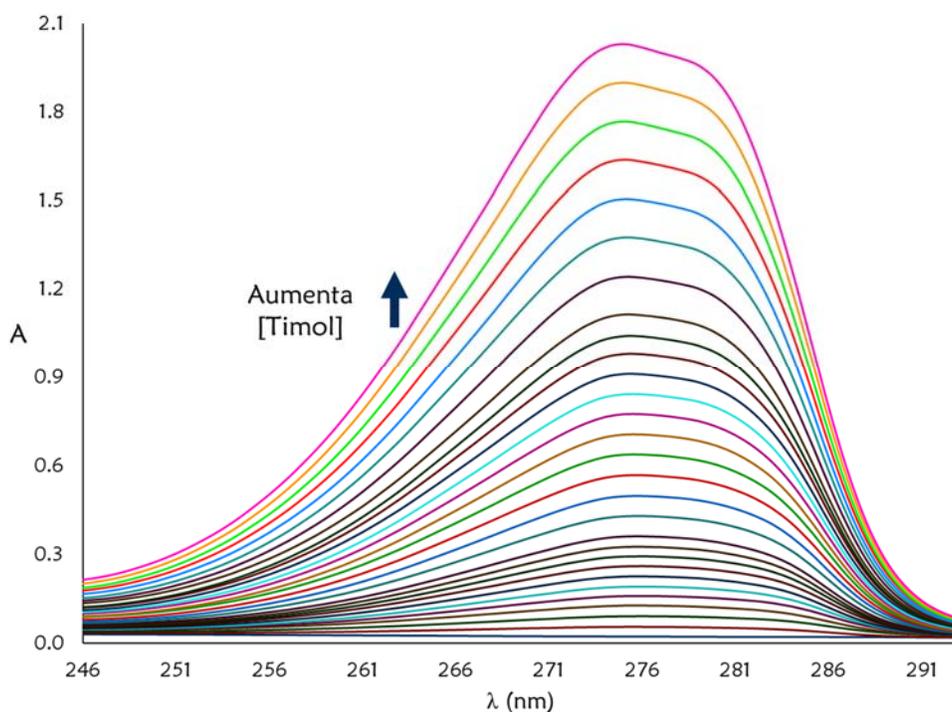
Gráfica 4. 9. Espectros de absorción de timol  $2.5 \times 10^{-4}$  M a diferentes valores de pH: Calculados (línea continua) y experimentales (línea punteada).

### Formación del complejo de inclusión Timol- $\beta$ -Ciclodextrina.

Conociendo el valor de pKa del Timol, se decidió ajustar el pH del sistema a 7 (con el par  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  0.1 M). A este valor de pH la especie ácido-base de Timol que predomina es la ácida.

### Espectrofotometría UV-Vis

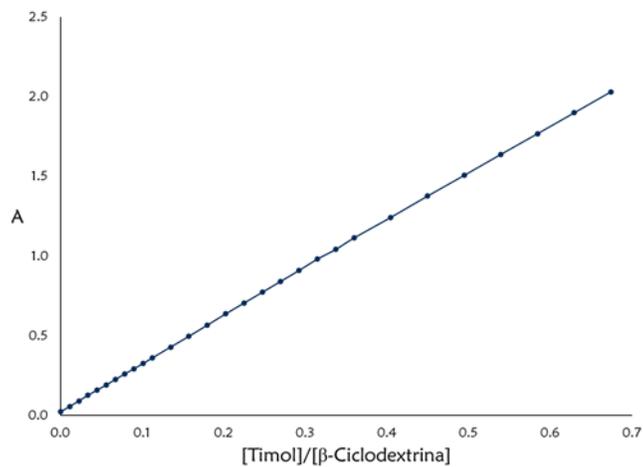
Por espectrofotometría UV-Vis, se empleó el método de relaciones molares. El primer experimento que se realizó fue manteniendo la cantidad de  $\beta$ -Ciclodextrina constante. En la Gráfica 4.10 se encuentran los espectros de absorción determinados a cada adición de Timol (los espectros se encuentran corregidos por dilución).



Gráfica 4. 10. Espectros de absorción de la valoración de  $\beta$ -Ciclodextrina con timol.

En la Gráfica 10, se observa que, al ir agregando el Timol, la banda de absorción de la  $\beta$ -Ciclodextrina se va modificando. El efecto que se aprecia es hipercrómico y, en el intervalo de longitudes de onda de  $245 < \lambda < 295$ , se alcanza un máximo de absorción en 275 nm, que corresponde con el máximo de absorción del timol.

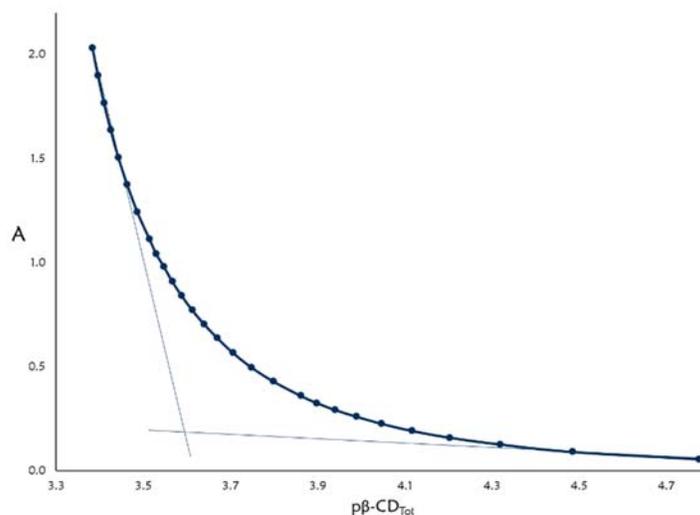
En la Gráfica 4.11, se presenta el gráfico típico del método de relaciones molares, que es la absorbancia en función de la relación de las concentraciones de los reactantes. En este caso se tomaron los valores de absorbancia a 275 nm.



Gráfica 4. 11. Gráfico de absorbanza en función de la relación molar Timol-β-Ciclodextrina.

En la Gráfica 4.11 no se observa un cambio pronunciado en la pendiente de la curva, por lo tanto, la formación del complejo de inclusión Timol-β-ciclodextrina es poco cuantitativa.

Para reacciones poco cuantitativas, se puede realizar el gráfico de absorbanza en función del  $p\beta$ -Ciclodextrina<sub>Total</sub> ( $p\beta$ -CD<sub>Tot</sub>) ya que, se conoce la cantidad de β-Ciclodextrina presente en el sistema. En la Gráfica 4.12 se presenta dicha representación y la absorbanza fue tomada a 275 nm.



Gráfica 4. 12. Absorbanza en función del  $p\beta$ -CD<sub>Tot</sub>

Como se observa en la Gráfica 4.12, en  $p\beta\text{-CD}_{\text{Tot}}$  aproximadamente de 3.6 se observa el cambio en la pendiente de la curva de absorbancia en función de  $p\beta\text{-CD}_{\text{Tot}}$ . Esto quiere decir que el valor de  $\log \beta$ , se encuentra muy cercano a 3.6.

Para corroborar el número de especies presentes en el sistema, se analizaron los datos de absorbancia con el programa TRIANG. Los resultados obtenidos por TRIANG se presentan en la tabla 4.5.

Tabla 4. 5. Resultados de TRIANG para el sistema timol- $\beta$ -Ciclodextrina

$\Delta T$	No. de especies
0.001	3
0.002	3
0.003	3
0.004	3
0.005	3
0.006	3
0.007	3
0.008	3
0.009	2
0.010	1

De acuerdo con los resultados de TRIANG, existen tres especies capaces de absorber radiación electromagnética en el intervalo de longitudes de onda empleadas. De esta manera se entiende que se forma un complejo de inclusión debido a que tanto el Timol como la  $\beta$ -Ciclodextrina son las otras dos especies que absorben en el sistema.

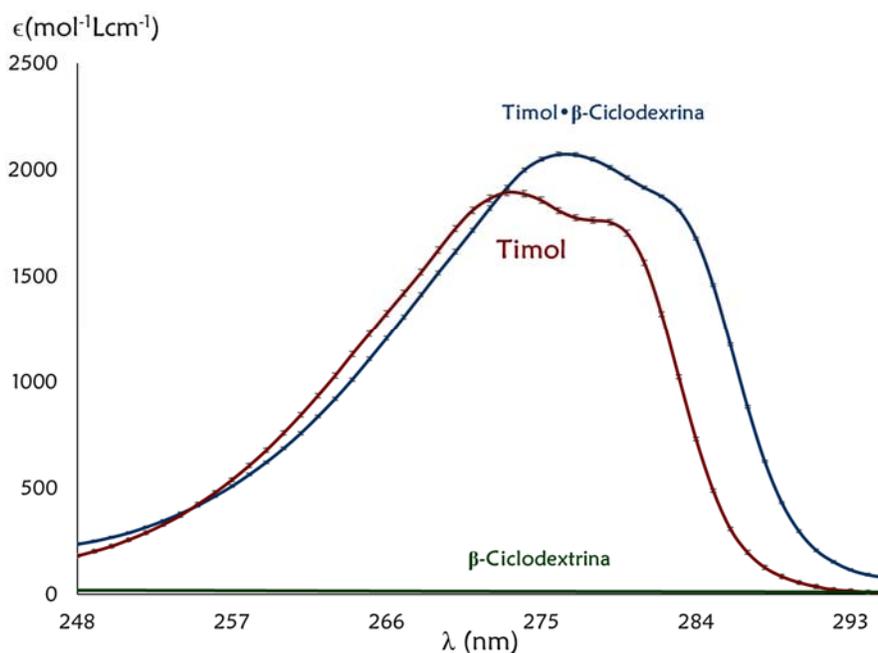
Con la información del número de especies y el valor aproximado de  $\log \beta$ , se alimentó el programa SQUAD con 24 espectros de absorción que contenían 48 datos de absorbancia determinados en un intervalo de longitudes de onda de 248 nm a 295 nm. El modelo que presentó el mejor ajuste a los datos experimentales fue la

formación de un solo complejo y una relación estequiométrica 1:1 entre los reactivos. En la Tabla 4.6 se presentan los resultados obtenidos por SQUAD.

Tabla 4. 6. Resultados dados por SQUAD para el refinamiento de la constante de formación del complejo de inclusión.

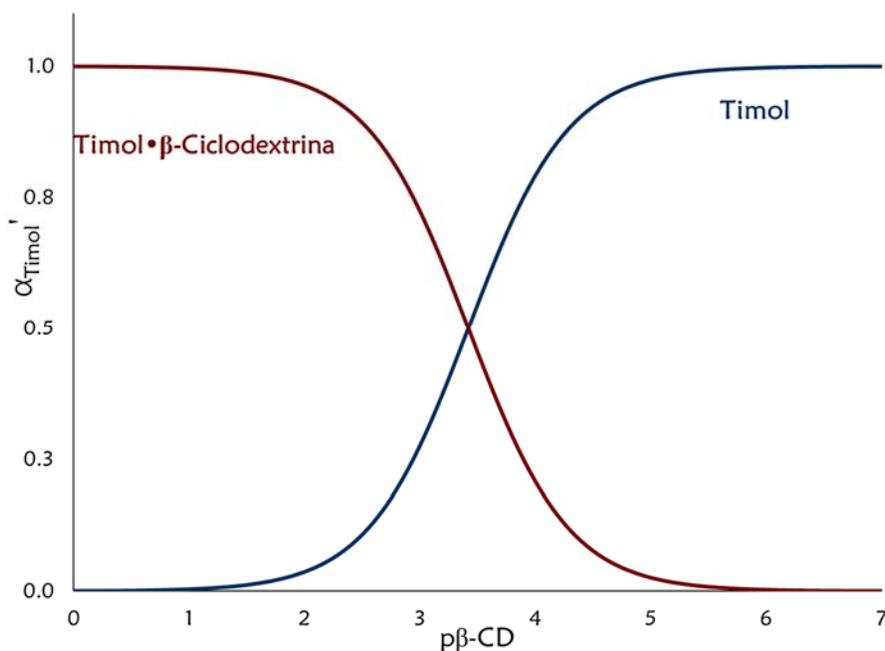
Equilibrio	Log $\beta$	$\sigma$	U
$Tim + \beta CD \rightleftharpoons Tim \cdot \beta CD$	$3.4204 \pm 0.0389$	$1.5835 \times 10^{-3}$	$2.6454 \times 10^{-3}$

Por lo tanto, la constante de formación del complejo Timol- $\beta$ -Ciclodextrina es  $10^{3.4204}$  (2632.7). Además de refinar el valor de la constante de formación del complejo, SQUAD calcula los coeficientes de absorptividad molar de cada especie del modelo propuesto. En la Gráfica 4.13 se presentan los coeficientes de absorptividad molar para cada especie presente en el sistema.



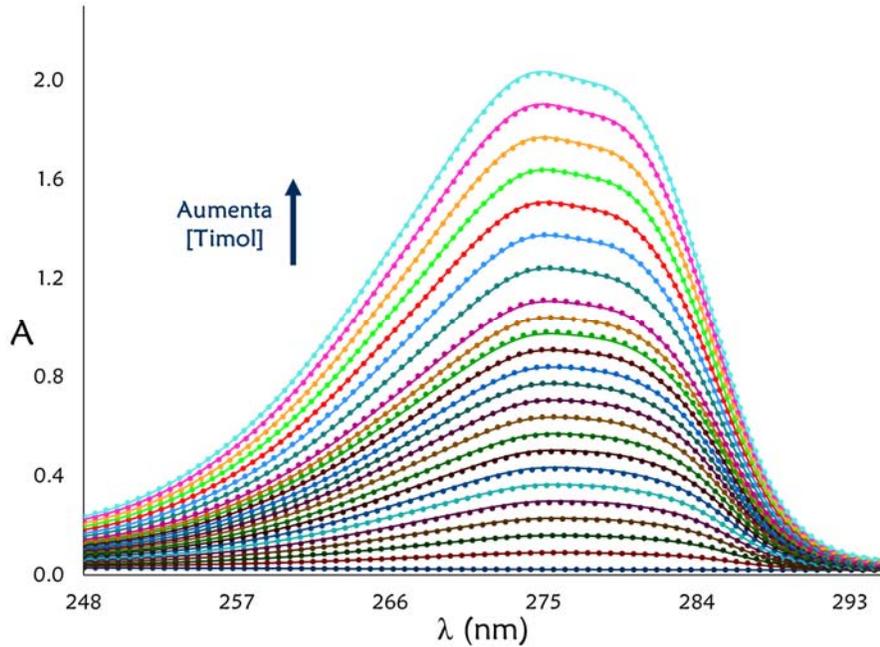
Gráfica 4. 13. Coeficientes de absorptividad molar.

Con el valor de la constante de formación del complejo de inclusión, es posible construir el diagrama de distribución de especies de timol en función del p $\beta$ -CD, el cual se presenta en la Gráfica 4.14.



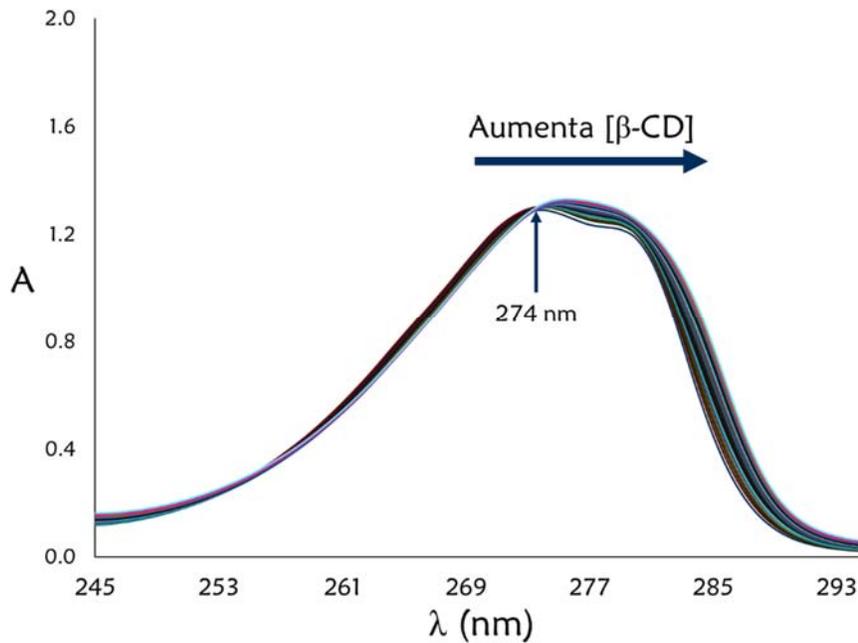
Gráfica 4. 14. Diagrama de distribución de especies de timol en función del p $\beta$ -Ciclodextrina.

Finalmente, para corroborar el modelo propuesto, se simularon los espectros de absorción experimentales con los datos de la constante de formación, para calcular las concentraciones al equilibrio de cada especie, y sus respectivos coeficientes de absortividad molar para calcular la absorbancia del sistema. En la Gráfica 4.15 se presentan los espectros simulados (línea continua) empalmados con los espectros de absorción experimentales (línea punteada).



Gráfica 4. 15. Espectros de absorción Timol-β-Ciclodextrina teóricos (línea continua) y experimentales (línea punteada).

También se llevó a cabo la valoración de una alícuota de 20 mL de Timol  $6.88 \times 10^{-4}$  M con β-Ciclodextrina. En la Gráfica 4.16 se presentan los espectros obtenidos durante la valoración (los espectros se encuentran corregidos por el efecto de dilución).



Gráfica 4. 16. Espectros de absorción determinados al sistema de valoración de Timol con β-ciclodextrina.

En la Gráfica 4.16 se aprecia que al ir aumentando la concentración de  $\beta$ -ciclodextrina, la banda de absorción del timol se ve modificada. El hombro que presenta la banda de Timol sufre un efecto hipercrómico, haciendo que la nueva banda deje de tener dicho hombro. El máximo de absorbancia de timol tiene un efecto batocrómico al ir aumentando la concentración de  $\beta$ -ciclodextrina. Nótese que se forma un punto isobéptico en 274 nm, lo cual, es un indicio de que existe al menos un equilibrio químico relacionado con la  $\beta$ -ciclodextrina.

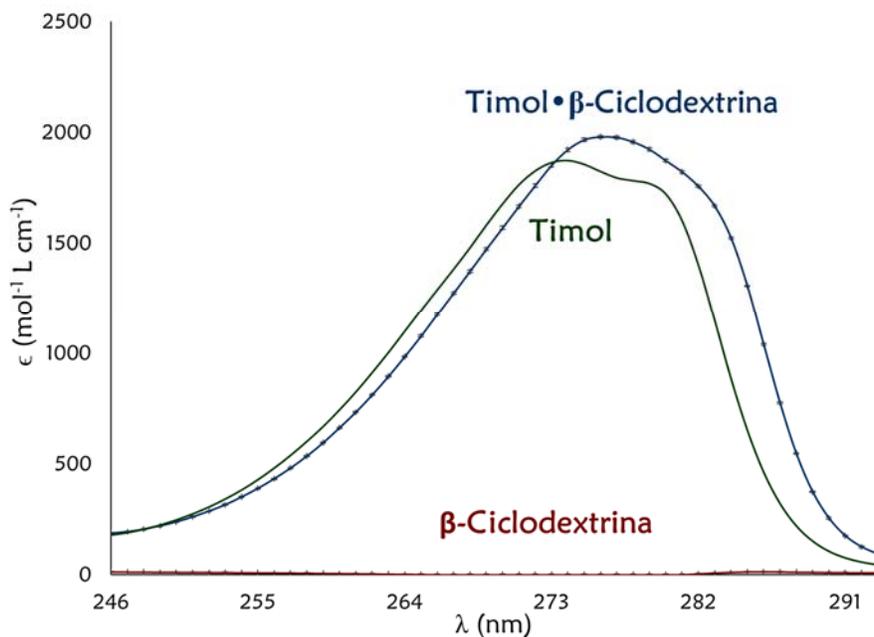
Teniendo como antecedente que se forma el complejo Timol- $\beta$ -ciclodextrina en relación 1 a 1, se alimentó el programa SQUAD con 24 espectros de absorción que contenían 48 datos de absorbancia cada uno determinados en un intervalo de longitudes de onda de 246 nm <  $\lambda$  < 93 nm. Los resultados dados por SQUAD se presentan en la Tabla 4.7.

Tabla 4. 7. Resultados de SQUAD para el refinamiento de la constante de formación del complejo de inclusión timol- $\beta$ -Ciclodextrina.

Equilibrio	Log $\beta$	$\sigma$	U
$Tim + \beta CD \rightleftharpoons Tim \cdot \beta CD$	$3.3409 \pm 0.0389$	$1.6030 \times 10^{-3}$	$2.7111 \times 10^{-3}$

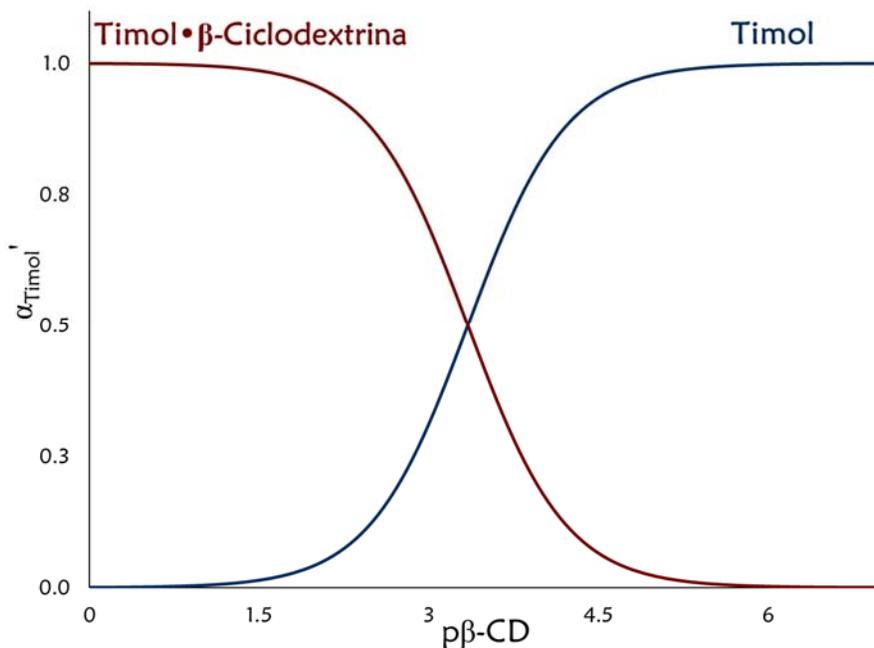
La constante de formación del complejo timol- $\beta$ -Ciclodextrina es de  $10^{3.3409}$  (2192.3).

En la Gráfica 4.17 se presentan los coeficientes de absorptividad molar dados por SQUAD, de las especies de Timol y  $\beta$ -ciclodextrina graficados en función de la longitud de onda.



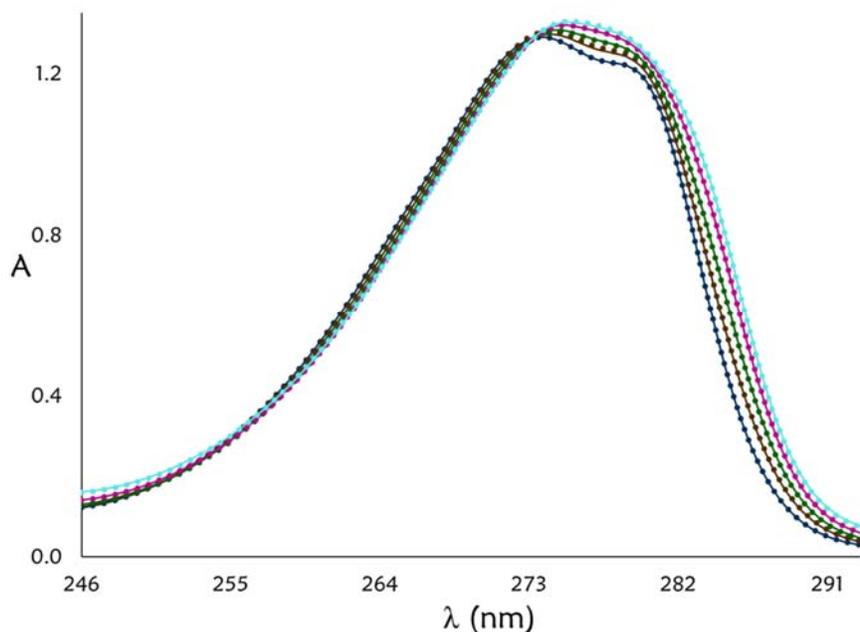
Gráfica 4.17. Coeficientes de absorptividad molar calculados por SQUAD.

Conociendo el valor de la constante de formación del complejo se puede construir el diagrama de distribución de especies de Timol en función del p $\beta$ -CD, el cual se presenta en la Gráfica 4.18.



Gráfica 4.18. Diagrama de distribución de especies de Timol en función del p $\beta$ -CD.

Finalmente, se simularon los espectros experimentales calculando la absorbancia con los coeficientes de absorptividad y el valor de la constante de formación dados por SQUAD. En la Gráfica 4.19 se muestran los espectros experimentales (línea punteada) empalmados sobre los espectros calculados (línea continua).

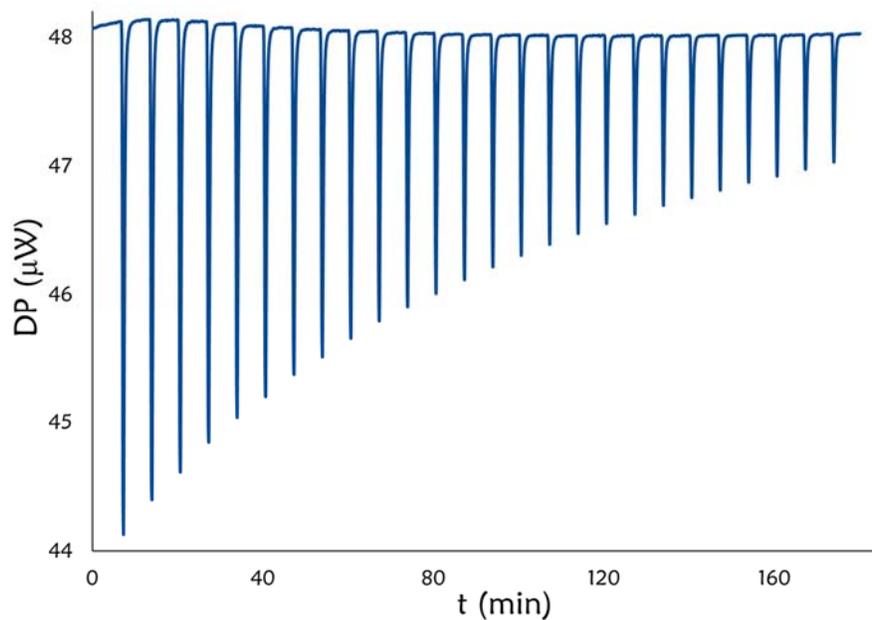


Gráfica 4. 19. Simulación de los espectros de absorción.

De acuerdo con la Gráfica 4.19, el modelo propuesto presenta un buen ajuste a los datos experimentales, ya que, además de que los parámetros estadísticos obtenidos por el refinamiento de SQUAD son adecuados, los espectros teóricos son casi idénticos a los experimentales.

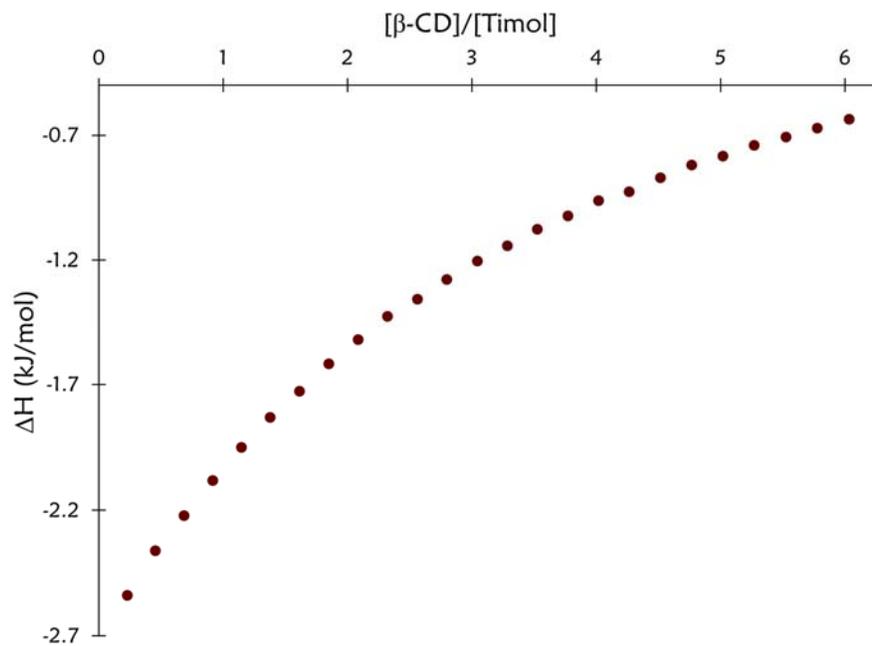
### **Calorimetría de titulación isotérmica**

Teniendo como antecedente el valor del logaritmo de la constante de formación del complejo Timol- $\beta$ -ciclodextrina, determinado por espectrofotometría, se realizó la simulación de la isoterma de enlace con el programa MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software para saber con qué concentraciones de Timol y  $\beta$ -ciclodextrina era necesarias para el experimento de ITC y llegar a una relación molar cercana a 7. En la Gráfica 4.20 se presenta el termograma obtenido con el calor de dilución ya restado.



Gráfica 4. 20. Termograma obtenido de la valoración de timol con  $\beta$ -Ciclodextrina

A partir del termograma de la Gráfica 4.20, se puede obtener la isoterma de enlace en función de la relación molar  $\beta$ -ciclodextrina/Timol (Gráfica 4.21).



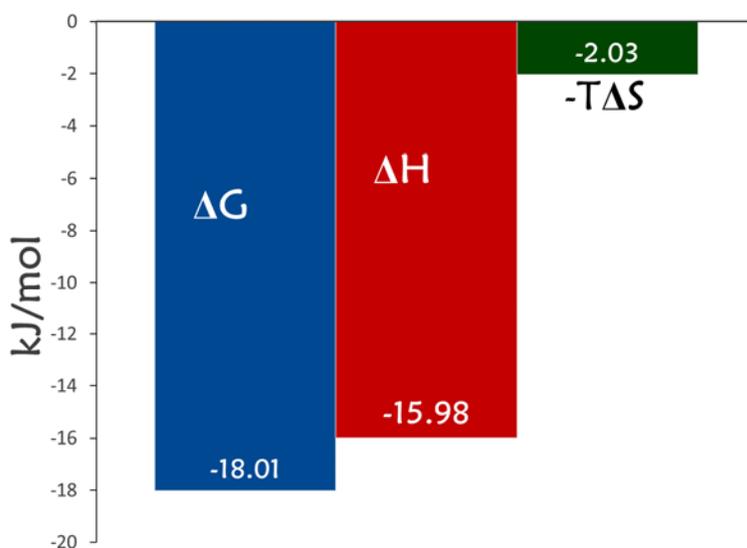
Gráfica 4. 21. Isoterma de enlace timol-  $\beta$ -Ciclodextrina

De acuerdo con la Gráfica 4.21, el proceso de inclusión de Timol en  $\beta$ -ciclodextrina es exotérmico por los valores negativos en el cambio de entalpía en cada adición de valorante.

Con la isoterma de enlace es posible determinar el valor de la constante de formación, el cambio de entalpía y la estequiometría de la reacción; para esto, se empleó el programa MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software. En la Tabla 4.8 se presentan los valores obtenidos del ajuste realizado por el programa y en la Gráfica 4.22 se presenta el perfil termodinámico de la inclusión en forma de barras.

Tabla 4. 8. Resultados obtenidos del ajuste hecho con MicroCal PEAQ-ITC.

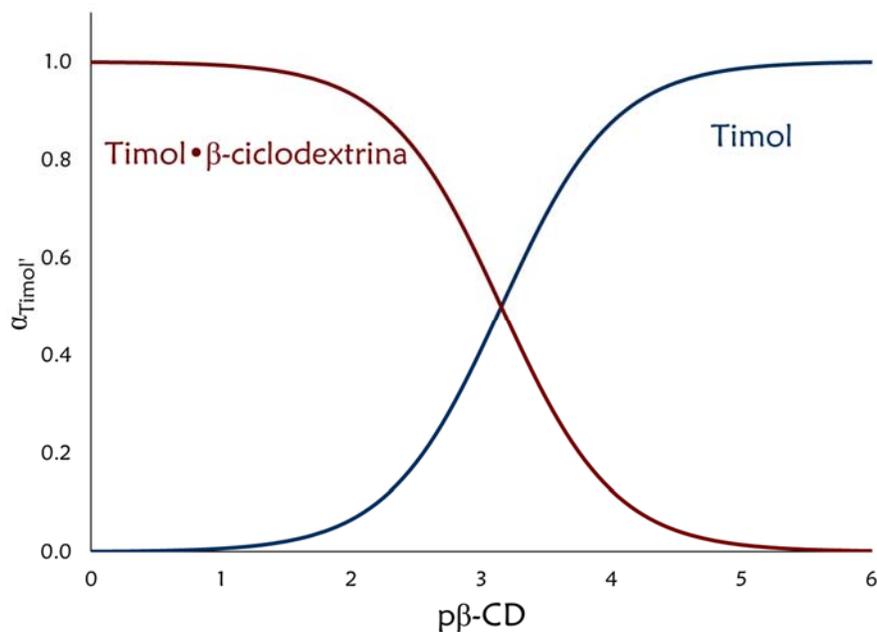
K	1427.5 $\pm$ 4.4
Log $\beta$	3.15 $\pm$ 0.0013
n	1
$\Delta H$	-15.98 $\pm$ 0.02 kJ mol <sup>-1</sup>
$\Delta G$	-18.01 $\pm$ 0.01 kJ mol <sup>-1</sup>
-T $\Delta S$	-2.03 kJ mol <sup>-1</sup>
$\Delta S$	6.81 J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>



Gráfica 4. 22. Perfil termodinámico de la inclusión de Timol en  $\beta$ -ciclodextrina

El proceso de inclusión de Timol dentro de la  $\beta$ -ciclodextrina es espontáneo ya que el valor de la energía libre de Gibbs es  $-18.01$  kJ por cada mol. El proceso está favorecido entálpicamente porque al formarse el complejo se libera energía en forma de calor ( $16$  kJ/mol), el cual debe de ser producido por la formación de enlaces de hidrógeno entre el Timol y la  $\beta$ -ciclodextrina. La expulsión de moléculas de agua con gran entalpía de la cavidad de la  $\beta$ -ciclodextrina también aporta parte del calor liberado, ya que dentro de la cavidad hay interacciones poco favorables en el agua y la ciclodextrina.

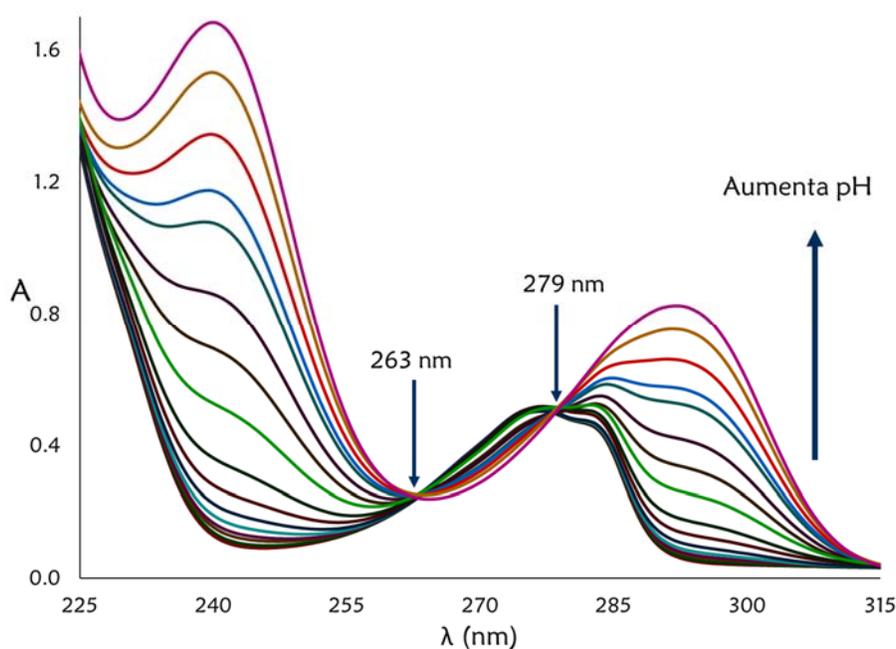
En la Gráfica 4.23 se presenta el diagrama de distribución de especies de Timol en función del  $p\beta$ -CD empleando el valor de la constante de formación obtenido por ITC.



Gráfica 4. 23. Diagrama de distribución de especies de Timol en función del  $p\beta$ -CD.

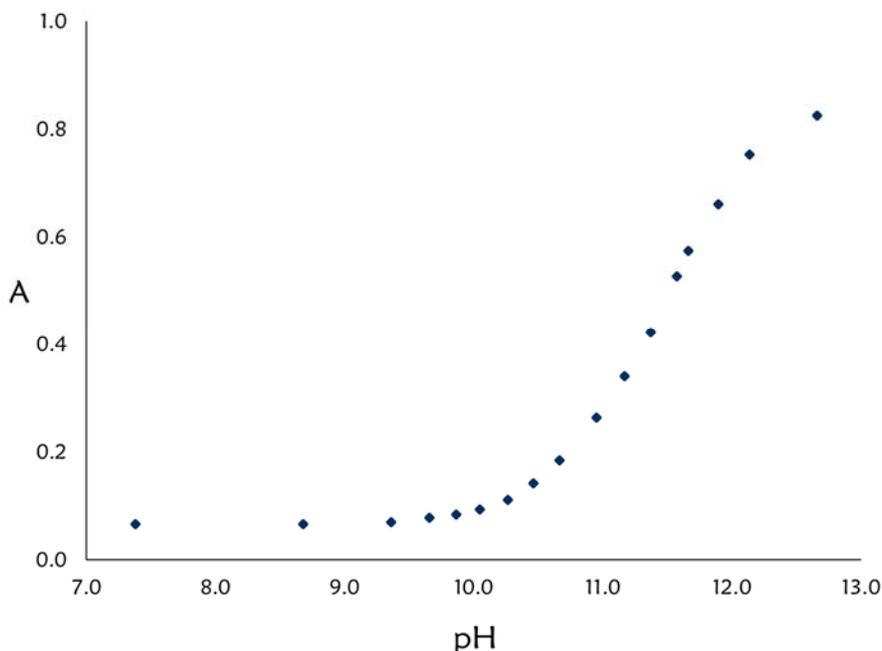
### Determinación del pKa del complejo Timol- $\beta$ -CD.

Una vez conocida la constante de formación del complejo Timol- $\beta$ -ciclodextrina y la relación estequiométrica del mismo, se estudió cómo es que la inclusión afecta a las propiedades ácido-base del Timol. Para esto se llevó a cabo una valoración ácido-base de Timol imponiendo un  $\beta$ -CD de 2, bajo estas condiciones, todo el Timol se encuentra dentro de la cavidad de la ciclodextrina. La valoración se siguió por espectrofotometría UV-Vis. En la Gráfica 4.24 se presentan los espectros obtenidos durante la valoración.



Gráfica 4. 24. Espectros determinados durante la valoración ácido-base del complejo Timol- $\beta$ -ciclodextrina.

En la Gráfica 4.25 se presenta la absorbancia del sistema de valoración en función del pH. Es importante hacer notar el cambio en la pendiente de la curva, ya que en ese intervalo de pH se puede estimar el valor del pKa. Dicho cambio de pendiente se encuentra en un pH muy cercano a 12.



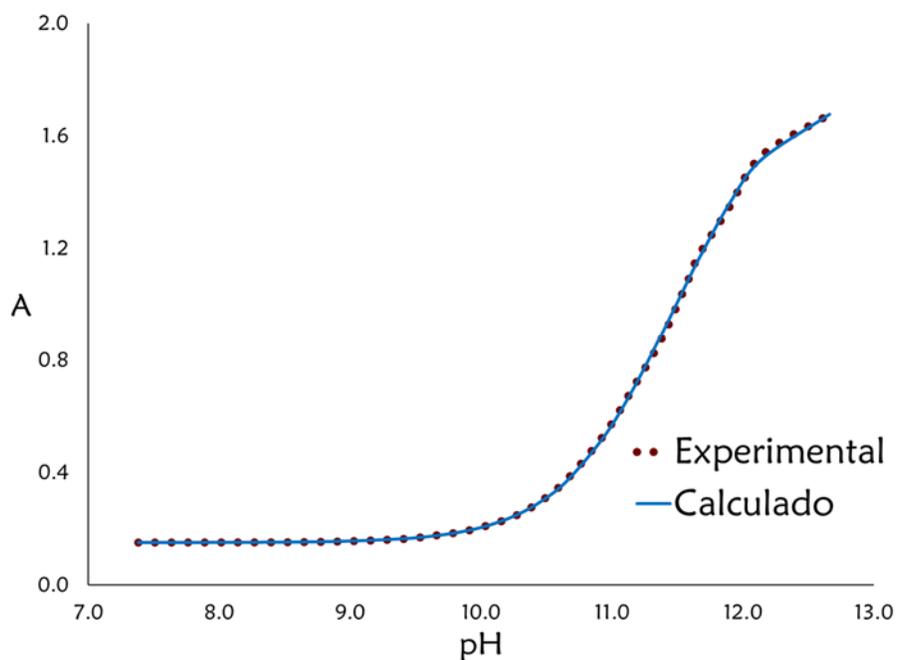
Gráfica 4. 25. Absorbancia del complejo Timol-β-CD en función del pH.

Para refinar el valor del pKa del complejo de inclusión fue necesario proponer un modelo de dos equilibrios químicos, es decir, que el complejo sea capaz de donar dos protones al medio. En la Tabla 4.9 se presentan los resultados del cálculo realizado por SQUAD con el modelo de dos equilibrios.

Tabla 4. 9. Resultados dados por SQUAD en el refinamiento de los valores de pKa del complejo Timo-β-ciclodextrina.

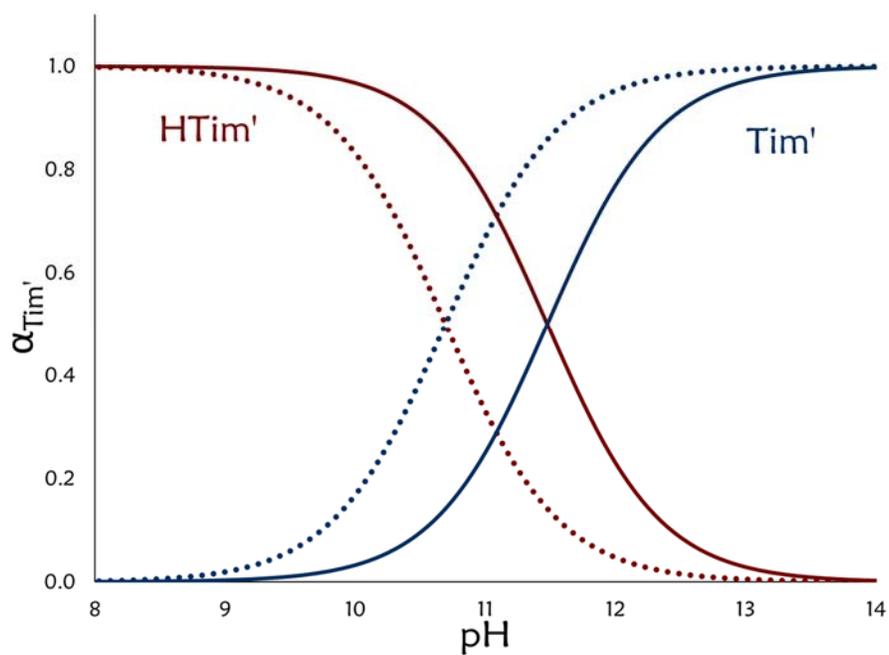
Equilibrio	Log β	σ	U
$TimHCD' + H^+ \rightleftharpoons HTimHCD'$	$11.4746 \pm 0.0007$	$6.8983 \times 10^{-3}$	$3.0551 \times 10^{-2}$
$TimCD' + H^+ \rightleftharpoons TimHCD'$	$13.8662 \pm 0.0127$		

El pKa del Timol aumenta de  $10.6928 \pm 0.001$  a  $11.4746 \pm 0.0007$  gracias a que dentro de la ciclodextrina, el protón ionizable es capaz de formar enlaces de hidrógeno con la β-ciclodextrina. Por otro lado, el pKa de la β-ciclodextrina también se ve afectado por el proceso de inclusión, ya que el valor reportado es de 12.2 y éste aumenta hasta 13.8662. En la Gráfica 4.26 se presenta la simulación teórica de la curva de absorbancia en función del pH y se compara con la experimental.



Gráfica 4. 26. Absorbancia a 239 nm en función del pH. Línea punteada, absorbancia experimental; línea continua, absorbancia calculada.

Con el valor del pKa del complejo de inclusión se construyó el diagrama de distribución de especies y se comparó con el del Timol libre (Gráfica 4.27).



Gráfica 4. 27. Diagrama de distribución de especies ácido-base de Timol. Líneas puntadas, Timol libre; líneas continuas, Timol incluido en -ciclodextrina.

De acuerdo con la Gráfica 4.27, cuando el Timol se encuentra dentro de la cavidad de la  $\beta$ -ciclodextrina, su pKa aumenta, es decir, que su capacidad donadora de protones se ve reducida y así aumenta la estabilidad de la especie ácida de Timol.

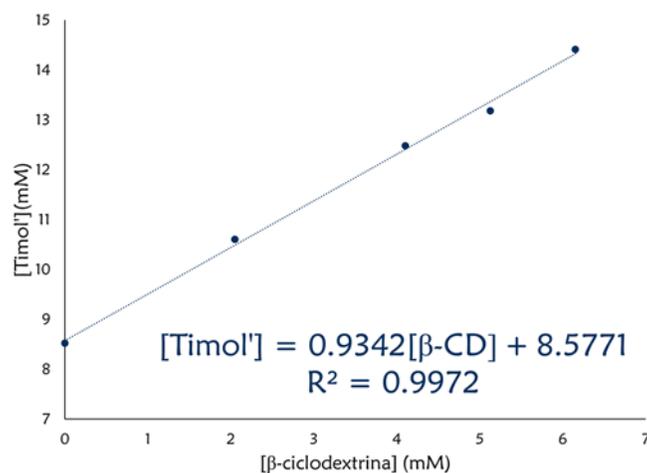
### **Estudio de la solubilidad de Timol en función de la concentración de $\beta$ -ciclodextrina.**

Uno de los principales objetivos de la formación de complejos de inclusión es el de aumentar la solubilidad del huésped y una forma de estudiar esto es mediante el método de Higuchi-Connors (Chaudhary & Patel, 2013). Para la cuantificación de Timol disuelto se construyó previamente una curva de calibración cuya ecuación obtenida fue:  $A^{274nm}=1.7568mM^{-1}[Timol]+0.0056$  ( $r^2=0.9998$ ). En la Tabla 4.10 se presenta la cantidad de Timol que se logró disolver en cada solución de  $\beta$ -ciclodextrina.

Tabla 4. 10. Resultados del método de Higuchi-Connors para Timol,

Solución	[ $\beta$ -ciclodextrina] (mM)	[Timol'] (mM)
1	0.00	8.52
2	2.05	10.60
3	3.08	11.92
4	4.10	12.47
5	5.13	13.18
6	6.16	14.41

Con los datos de la Tabla 4.10 se construyó el diagrama de solubilidad-fases (Gráfica 4.28).



Gráfica 4. 28. Diagrama de solubilidad-fases de Timol en función de la concentración de β-ciclodextrina.

De acuerdo a la Gráfica 4.28 la solubilidad de Timol es directamente proporcional a la concentración de β-ciclodextrina y de acuerdo a la clasificación de Higuchi-Connors el diagrama es del tipo  $A_L$  (formación de un complejo soluble) (Chaudhary & Patel, 2013).

Se sabe que el complejo de inclusión que forma el Timol con la β-ciclodextrina tiene una relación estequiométrica 1:1, por lo que es posible determinar la constante de formación del complejo con la ecuación:

$$K = \frac{\alpha}{[Timol']_0(1 - \alpha)}$$

Donde  $\alpha$  es la pendiente del diagrama de solubilidad-fases y  $[Timol']_0$  es la solubilidad de Timol en agua, la cual corresponde a la ordenada al origen del mismo diagrama la cual es 8.5771 nM y que corresponde a 1.3 g/L. Por lo tanto, el valor de la constante determinada por el método de Higuchi-Connors es:

$$K = \frac{0.9342}{8.5771 \times 10^{-3}(1 - 0.9342)}$$

$$K = 1655.3$$

$$\log \beta = 3.22$$

El valor de  $\log \beta$  obtenido por éste método es muy semejante al obtenido mediante el método de relaciones molares, tanto por UV-Vis (3.341) e ITC (3.15).

Es importante destacar que empleando el método de Higuchi-Connors se pudo solubilizar hasta el 66% de Timol, debido a que se pudo aumentar la solubilidad hasta 2.16 g/L.



Carvacrol

## Metodología

### Materiales.

- Vasos de precipitado de 10, 50, 100 y 250 mL.
- Pipetas volumétricas de 4, 9 y 20 mL.
- Espátula.
- Micropipeta BIOHIT 100-1000  $\mu\text{L}$ .
- Micropipeta Finnpipette 20-200  $\mu\text{L}$ .
- Micropipeta Finnpipette 0.5-10  $\mu\text{L}$ .
- Goteros.
- Matraces volumétricos de 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 1000 mL.

### Equipo.

- Balanza analítica Pioneer.
- Potenciómetro Mettler Toledo.
- Electrodo de pH Hach.
- Agitador magnético Cole-Parmer.

- Baño termostataado PolyScience.
- Espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer Lambda 35.
- Microcalorímetro VP-ITC GE Healthcare
- ThermoVac GE

### Reactivos

- Carvacrol  $\geq 98\%$  Sigma-Aldrich.
- $\beta$ -Ciclodextrina  $\geq 97\%$  Sigma.
- Fosfato de sodio dibásico 99.7% Fermont.
- Cloruro de sodio Q. P. Reactivos y productos químicos finos.
- Ácido clorhídrico 36% Macron Chemicals.
- Hidróxido de sodio 98.6% Mallinckrodt.
- Agua desionizada con resistividad de 18.2 M $\Omega$  ELGA.
- Nitrógeno 99.997% INFRA.
- Buffers de pH 4, 7 y 10 J. T. Baker.

### Estudio de estabilidad en medio ácido y básico.

- Se prepararon dos soluciones de Carvacrol  $3.82 \times 10^{-4}$  M, una se aforó con HCl 0.1 M y la segunda con NaOH 0.1 M.
- Se determinó el espectro de absorción inmediatamente de que fueron preparadas las soluciones y cada media hora durante 5 h. Después, se determinaron los espectros cada 24 h hasta completar una semana.

### Determinación del pKa del timol

- Se prepararon dos soluciones de Carvacrol  $3.55 \times 10^{-4}$  M, una se aforó con HCl 0.1 M y la segunda con NaOH 0.1 M. Además, se adicionó la cantidad suficiente de cloruro de sodio para imponer una fuerza iónica de 0.1 M.

- Se tomó una alícuota de la solución básica y se colocó en una celda adaptada a un baño termostataado y en una atmósfera de nitrógeno.
- Se midió el pH de la alícuota y se determinó el espectro de absorbancia.
- Después se realizó una valoración ácido base, teniendo la solución básica como analito y la solución ácida como valorante. A cada cambio de pH se determinó el espectro de absorbancia.
- EL intervalo de pH en el que se trabajó fue  $13 > \text{pH} > 7$ .
- Los experimentos se realizaron por triplicado

### Complejo de inclusión Carvacrol- $\beta$ -Ciclodextrina

#### *Espectrofotometría UV-Vis*

- Para la formación del complejo de inclusión, se emplearon las siguientes soluciones:
  - Carvacrol:  $5.1 \times 10^{-4} \text{M}$
  - $\beta$ -Ciclodextrina:  $2.12 \times 10^{-3} \text{M}$ .

Las soluciones se aforaron con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M y pH 7.1.
- Se valoraron 20 mL de solución de  $\beta$ -Ciclodextrina con la solución de Carvacrol manteniendo la temperatura en  $25^\circ \text{C}$  en un baño termostataado bajo una atmósfera de nitrógeno. A cada adición se determinaba el espectro de absorción. Los datos de absorbancia se analizaron para determinar el valor de la constante de formación del complejo.
- Por otra parte, se realizó la valoración de 20 mL de Carvacrol con  $\beta$ -Ciclodextrina bajo las condiciones mencionadas anteriormente. A cada adición de  $\beta$ -Ciclodextrina se determinaba el espectro de absorción. Los datos obtenidos se analizaron para obtener el valor de la constante de formación del complejo de inclusión.
- Los experimentos se realizaron por triplicado

### *Calorimetría de titulación isotérmica.*

- Las concentraciones de las soluciones de Carvacrol y  $\beta$ -Ciclodextrina que se emplearon fueron:  $1.53 \times 10^{-4}$  M y  $6.89 \times 10^{-3}$  M, respectivamente. Las soluciones se aforaron con sistema buffer de fosfatos 0.1 M y pH de 7.0.
- Las soluciones se desgasificaron con ayuda del ThermoVac.
- Las celdas de reacción y de referencia del ITC se llenaron con solución de Carvacrol.
- La jeringa se rellenó con la solución de  $\beta$ -Ciclodextrina teniendo precaución de que no se formaran burbujas.
- Se colocó la jeringa dentro de la celda de reacción y comenzó la valoración. En la Tabla 5.1 se presentan las condiciones experimentales de la titulación calorimétrica.

Tabla 5. 1. Condiciones experimentales de la titulación de Carvacrol con  $\beta$ -Ciclodextrina mediante ITC.

[Carvacrol] (mM)	0.153
[ $\beta$ -Ciclodextrina] (mM)	6.89
Relación molar máxima	6.73
Número de inyecciones	26
Temperatura (°C)	25
Volumen de inyección ( $\mu$ L)	8
Duración de inyección (s)	16
Tiempo de espaciado (s)	400

Para el calor de dilución, se repitió el experimento, pero en lugar de llenar las celdas con solución de Carvacrol, se llenaron con solución buffer.

Los experimentos se realizaron por triplicado.

### **Determinación del pKa del complejo Carvacrol- $\beta$ -ciclodextrina**

- Se prepararon dos soluciones de Carvacrol  $3.82 \times 10^{-4}$  M, una se aforo con HCl 0.1 M y la segunda con NaOH 0.1 M. A ambas soluciones se les agregó  $\beta$ -ciclodextrina para tener un  $p\beta$ -CD=2 (0.01 M).

- Se tomó una alícuota de 20 mL de la solución básica y se colocó en una celda conectada a un baño de temperatura constante de 25° C.
- Se midió el pH de la alícuota y se determinó el espectro de absorción UV-Vis.
- Se llevó a cabo la valoración de la solución básica con la ácida y a cada cambio de pH se determinaba el espectro de absorción del sistema.
- Los datos de absorbancia obtenidos se analizaron y se trataron para alimentar el programa SQUAD y así refinar el valor del pKa del complejo Carvacrol- $\beta$ -ciclodextrina

### Estudio de la solubilidad de Carvacrol en función de la concentración de $\beta$ -ciclodextrina (Método de Higuchi-Connors).

- Se prepararon soluciones de  $\beta$ -ciclodextrina de 1 mM hasta 6 mM en matraces volumétricos de 10 mL.
- A cada solución se le agregaron 50 $\mu$ L de Carvacrol y se dejaron en agitación constante durante 96 h.
- Pasadas las 96 h se tomaron 200  $\mu$ L de cada solución y se diluyeron en un matraz aforado de 5 mL para cuantificar el contenido de Carvacrol con ayuda de una curva de calibración. Las concentraciones y el número de moles agregados a los sistemas se presentan en la Tabla 5.2.

Tabla 5. 2. Concentraciones de  $\beta$ -ciclodextrina empleadas y cantidad de Carvacrol empleados en el método de Higuchi-Connors.

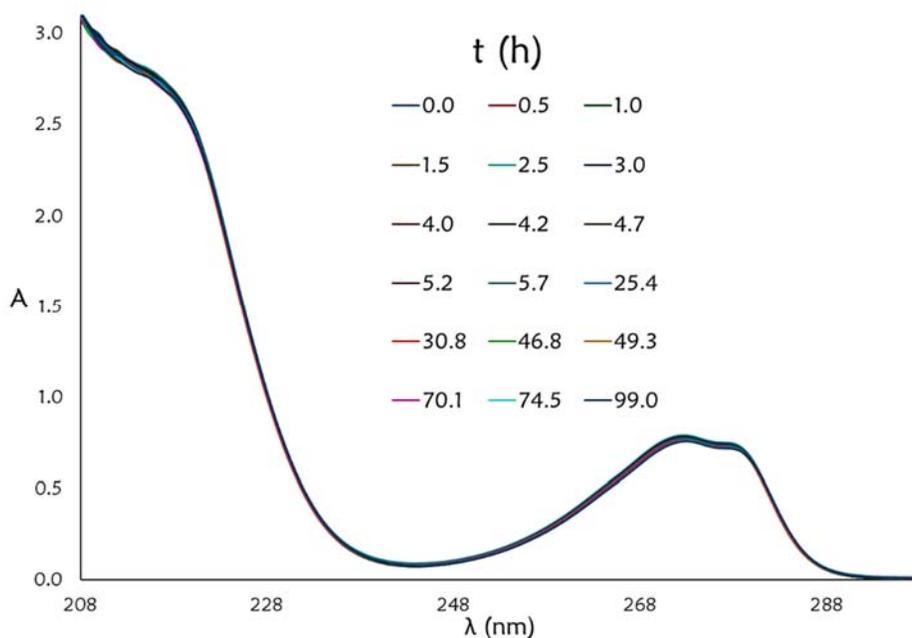
Sistema	[ $\beta$ -CD] (mM)	n <sub>Tímol</sub> (mmol)
0	0.00	0.32
1	1.00	0.32
2	2.99	0.32
3	3.99	0.32
4	4.99	0.32
5	5.98	0.32

## Resultados y Análisis de resultados

### Estudio de estabilidad.

- **Carvacrol en HCl 0.1 M**

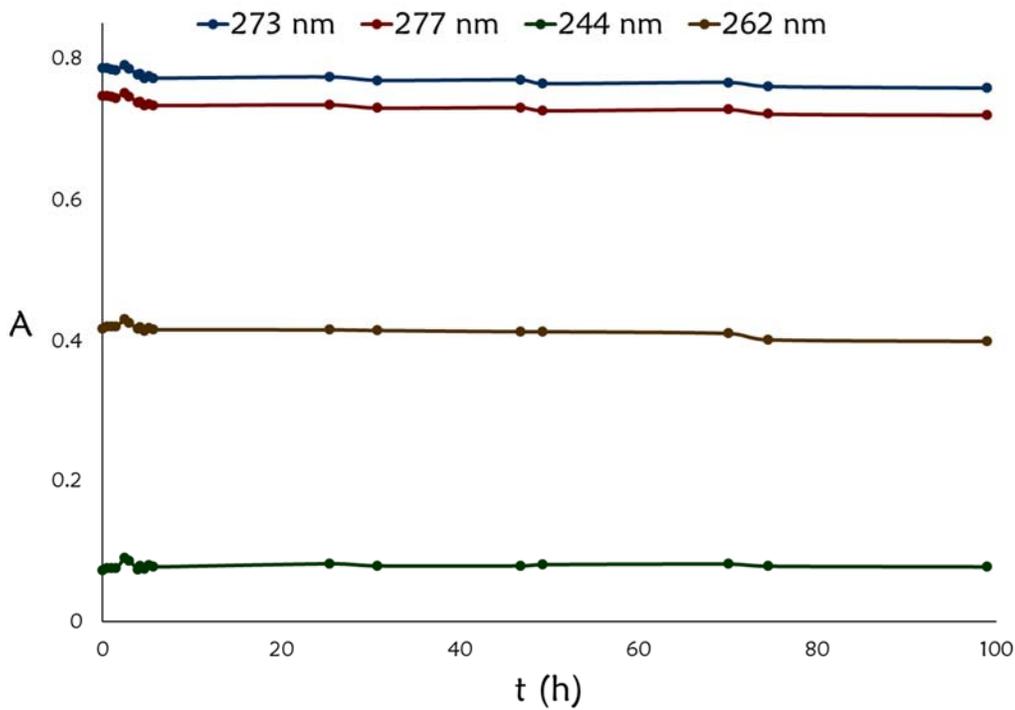
En la Gráfica 5.1 se presentan los espectros determinados a una solución de carvacrol en medio ácido a diferentes tiempos a partir de que fue preparada la solución.



Gráfica 5. 1. Espectros de Carvacrol en medio ácido.

El Carvacrol presenta dos bandas de máxima absorción, una a 214 nm y las segunda en 273 nm, además de presentar un hombro en 278 nm. El tipo de transición que da lugar a dichas bandas es  $n-\pi^*$  ya que el grupo OH es el que actúa como donador de electrones no enlazantes hacia los orbitales antienlazantes del anillo aromático.

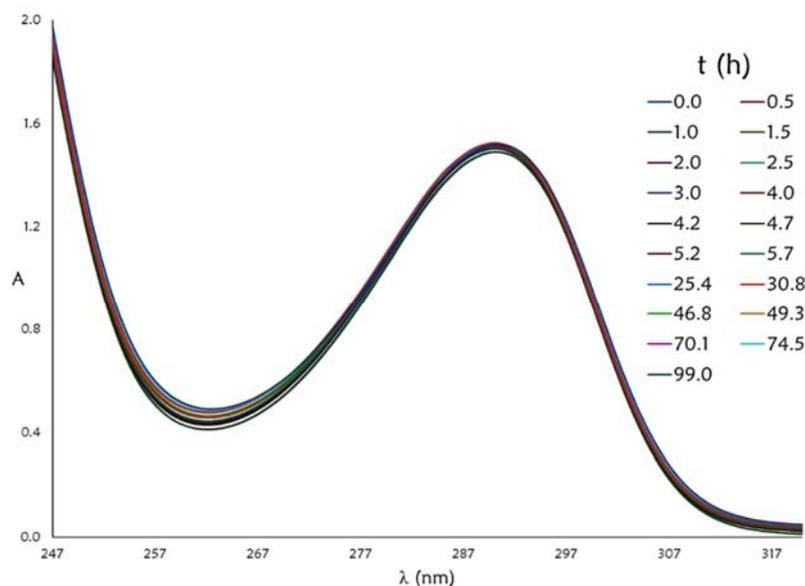
La absorbancia de la solución de carvacrol en medio ácido se monitoreó durante una semana. En la gráfica 5.2, se presenta el comportamiento de la absorbancia a diferentes longitudes de onda de la solución de carvacrol  $3.82 \times 10^{-4}$  M.



Gráfica 5. 2 Absorbancia de carvacrol en función el tiempo.

La absorbancia de la solución de Carvacrol en las primeras 5 horas presenta ligeras fluctuaciones, pero después de un día de que se preparó y durante una semana, la absorbancia se mantuvo constante. Esto da un indicio de que el carvacrol tarda un en estabilizarse en medio ácido. La absorbancia en medio ácido varía, en promedio, un 1.55%

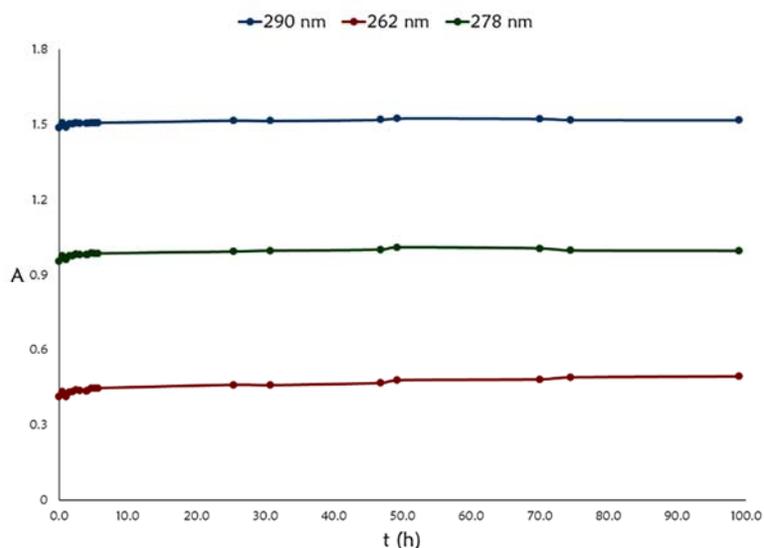
En la Gráfica 5.3 se presentan los espectros determinados a la solución de Carvacrol en medio básico.



Gráfica 5. 3. Espectros de Carvacrol en medio básico.

En medio básico, el máximo de absorbancia se encuentra en 290 nm, la cual es característica de compuestos aromáticos con grupos ionizables que contienen electrones con mayor disponibilidad de llevar a cabo una transición del tipo  $n-\pi^*$ .

Por otro lado, se graficó el compartimento de la absorbancia de la solución de Carvacrol en función del tiempo para comprender la estabilidad del terpeno en medio básico (Gráfica 5.4).



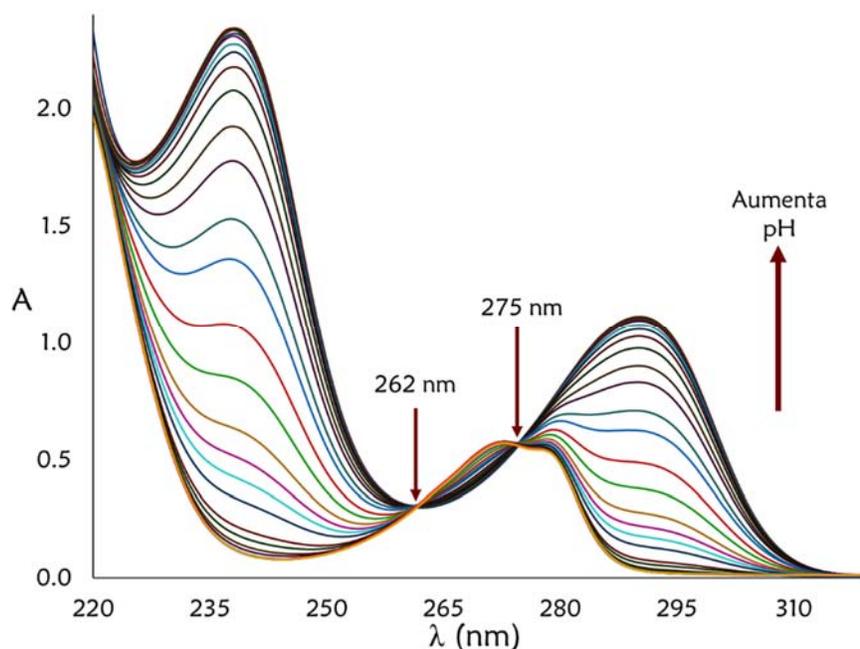
Gráfica 5. 4. Absorbancia de una solución de carvacrol  $3.82 \times 10^{-4}$  M en medio básico en función del tiempo.

Al igual que en medio ácido, la absorbancia de la solución se estabiliza después de que ha pasado un día de que se preparó y se mantiene así durante una semana. Cabe destacar que en las primeras 5 horas no se observan tantas fluctuaciones como en medio ácido, ya que en medio básico se encuentra ionizada la molécula y la variación de la absorbancia es, en promedio, 1.45%.

Para realizar los experimentos posteriores a éste, se preparaban las soluciones con al menos un día de anticipación para que el carvacrol se estabilizara en medio acuoso.

### pKa del carvacrol.

Para la determinación del pKa del Carvacrol, se realizó una valoración ácido-base fijando la concentración de carvacrol en  $3.55 \times 10^{-4}$  M. En la Gráfica 5.5 se presentan los espectros de absorción a cada cambio de pH durante la valoración.

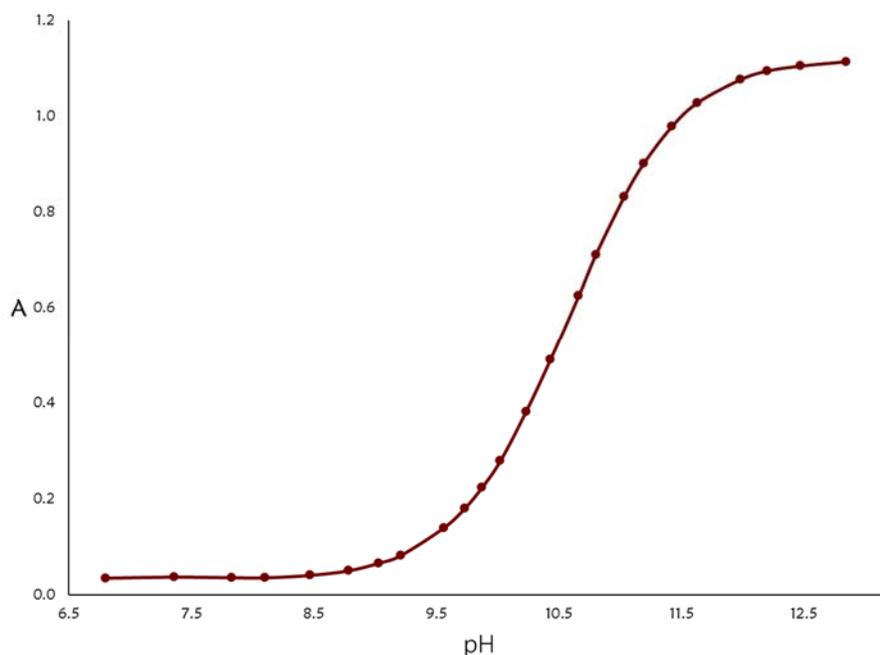


Gráfica 5. 5. Espectros de absorción de Carvacrol a diferentes valores de pH.

Al inicio de la valoración, el pH de la solución de carvacrol era de 13 y al final se alcanzó un valor de 6.8. A valores de pH menores de 7, ya no se presenta ningún cambio en la absorbancia. Es importante destacar que en 262 y 275 nm se presentan

dos puntos isobésticos, lo cual indica que el Carvacrol posee por lo menos un equilibrio ácido base.

Para estimar el valor del pKa del Carvacrol se graficó la absorbancia, determinada en 290 nm, en función del pH (Gráfica 5.6). En donde se presenta un punto de inflexión en la curva, es en donde se encuentra el valor de pKa.



Gráfica 5. 6. Absorbancia determinada a 290 nm de carvacrol en función del pH.

De acuerdo con la Gráfica 5.6, el Carvacrol es capaz de donar un protón en medio acuoso cuyo valor de pKa es cercano a 10.5. Para corroborar el número de equilibrios ácido-base en los que participa el Carvacrol, se emplearon los datos de absorbancia para alimentar el programa TRIANG, el cual, mediante un análisis de componentes principales llega a indicar cuántas especies son las responsables de la absorbancia de un sistema (Tabla 5.3).

Tabla 5. 3. Resultados de TRIANG para identificar el número de especies ácido-base del carvacrol.

$\Delta T$	No. de especies
0.001	2
0.002	2
0.003	2
0.004	2
0.005	2
0.006	1
0.007	1
0.008	1
0.009	0
0.010	0

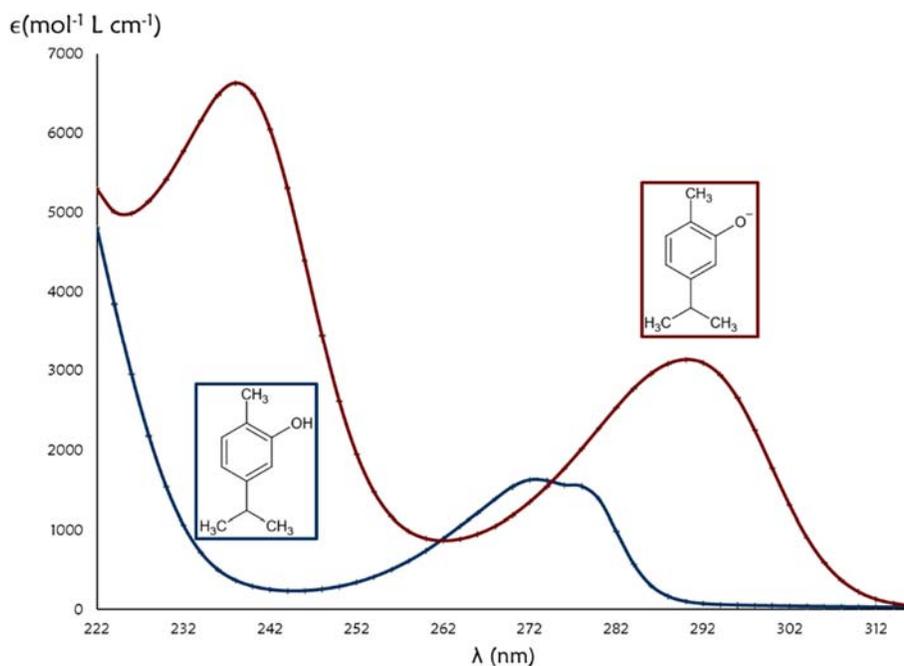
De acuerdo con los resultados de TRIANG, en el sistema se encuentran dos especies que son capaces de absorber radiación electromagnética dentro del rango de longitudes de onda empleado.

Para refinar el valor de la constante de disociación ácida del Carvacrol se empleó el programa SQUAD. El programa SQUAD se alimentó con 24 espectros de absorción con 48 datos de absorbancia; cada uno determinado en el intervalo de longitudes de onda de 222 a 316 nm; y se propuso un modelo monodonador de protones. En la Tabla 5.4 se presentan los resultados obtenidos por SQUAD.

Tabla 5. 4. Resultados de SQUAD para el pKa del carvacrol.

Equilibrio	Log $\beta$	$\sigma$	U
$Carv^- + H^+ \rightleftharpoons HCarv$	$10.5635 \pm 0.0008$	$5.3941 \times 10^{-3}$	$3.0696 \times 10^{-2}$

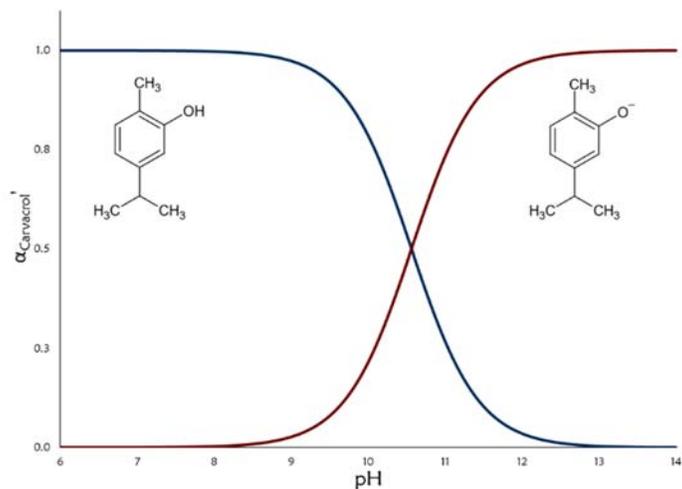
El valor del pKa del carvacrol es de  $10.5635 \pm .SQUAD$ , dentro del refinamiento que realiza, da como resultado los coeficientes de absorptividad molar de cada especie en el sistema, En la Gráfica 5.7 se presentan los coeficientes de absorptividad de las especies ácido-base del carvacrol en función de la longitud de onda.



Gráfica 5. 7. Coeficientes de absorptividad molar de las especies ácido-base del carvacrol.

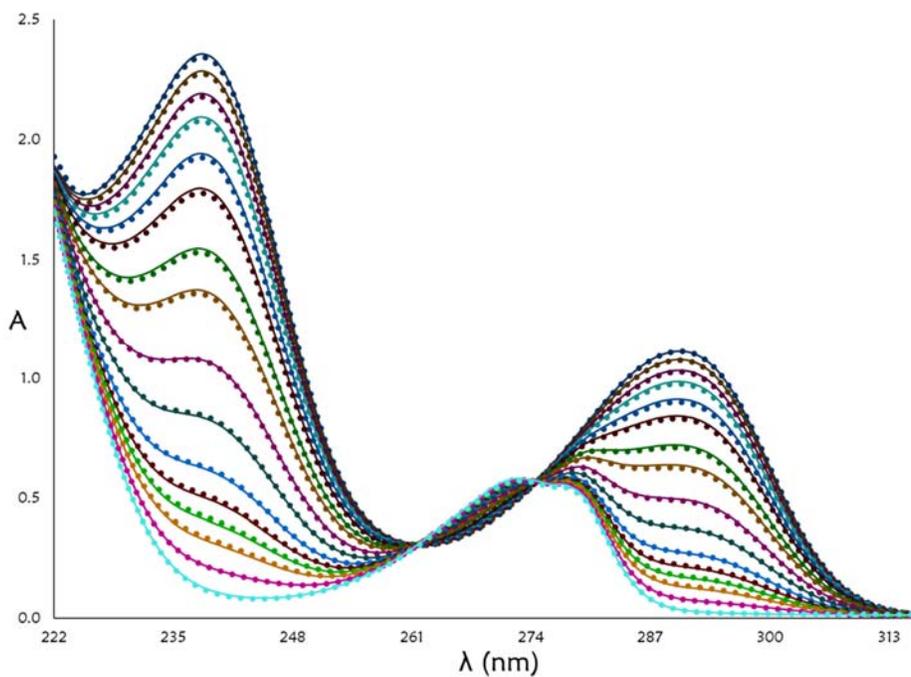
Es importante destacar que los coeficientes de absorptividad molar son muy parecidos a los espectros de absorción; el máximo de absorción se presenta para la especie ácida, en 275 nm; para la especie básica en 290 nm.

En la Gráfica 5.8 se presenta el diagrama de distribución de las especies ácido-base del carvacrol en función del pH.



Gráfica 5. 8. Diagrama de distribución de especies ácido-base de Carvacrol.

Finalmente, para corroborar el ajuste del modelo propuesto se calculó la absorbancia de cada espectro mediante la ley de Lambert-Beer y la ley de aditividad. Para el cálculo de concentraciones de las especies de Carvacrol se empleó el valor de pKa refinado por SQUAD, así como el valor de los coeficientes de absortividad molar. En la Gráfica 5.9 se presentan los espectros calculados (línea continua) empalmados con los espectros experimentales (línea punteado) a diferentes valores de pH.



Gráfica 5. 9. Espectros teóricos (línea continua) y experimentales (línea punteada) de Carvacrol a diferentes valores de pH.

De acuerdo a la Gráfica 5.9, los espectros calculados son muy semejantes con los experimentales, es decir, el modelo propuesto tiene un buen ajuste a los datos experimentales.

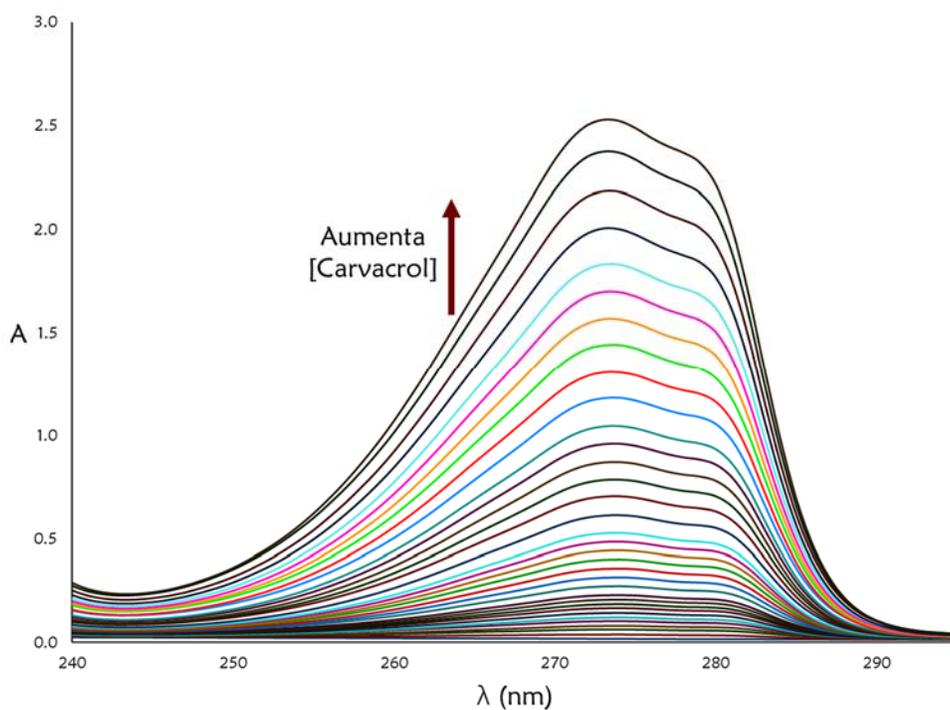
El propósito de determinar el pKa del Carvacrol fue para establecer el intervalo de pH en el cual la especie que predominara fuera la neutra para que, posteriormente sea la que forme el complejo de inclusión con  $\beta$ -ciclodextrina. Según el diagrama de distribución de especies, la especie neutra predomina en valores de pH menores a 8.5 por lo que se decidió llevar a cabo la formación del complejo a pH de 7.

### **Complejo de inclusión carvacrol- $\beta$ - ciclodextrina.**

Para la determinación del valor de la constante de formación del complejo formado entre Carvacrol y  $\beta$ -ciclodextrina se llevaron a cabo valoraciones: Carvacrol con  $\beta$ -ciclodextrina y de manera inversa. Las soluciones de Carvacrol y  $\beta$ -ciclodextrina fueron aforadas con una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M y pH DE 7.1 para que la especie de Carvacrol predominante fuera la ácida.

### **Espectrofotometría UV-Vis**

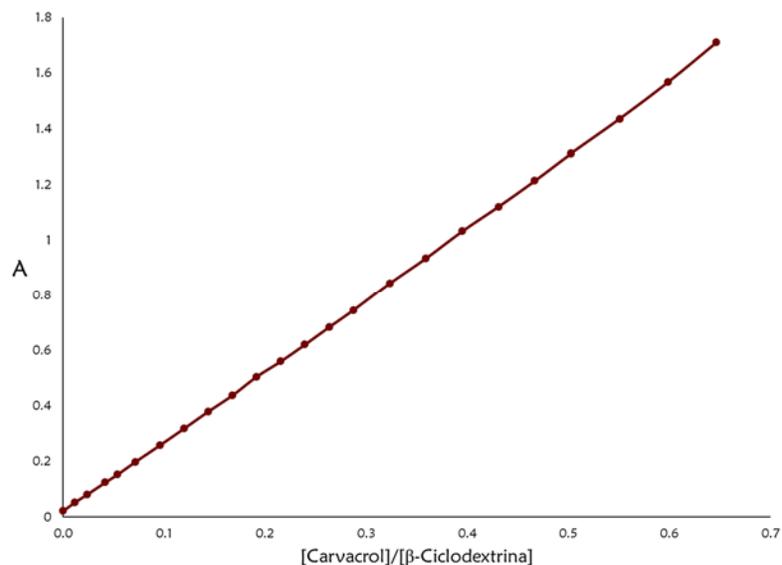
El primer experimento que se realizó fue la valoración de una alícuota de una solución de  $\beta$ -ciclodextrina  $2.13 \times 10^{-3}$  M con una de Carvacrol  $5.1 \times 10^{-4}$  M. A cada adición de valorante se determinaba el espectro de absorción del sistema. En la Gráfica 5.10 se presentan los espectros de absorción corregidos por efecto de dilución determinados durante la valoración.



Gráfica 5. 10. Espectros de absorción determinados durante la valoración de  $\beta$ -ciclodextrina con Carvacrol.

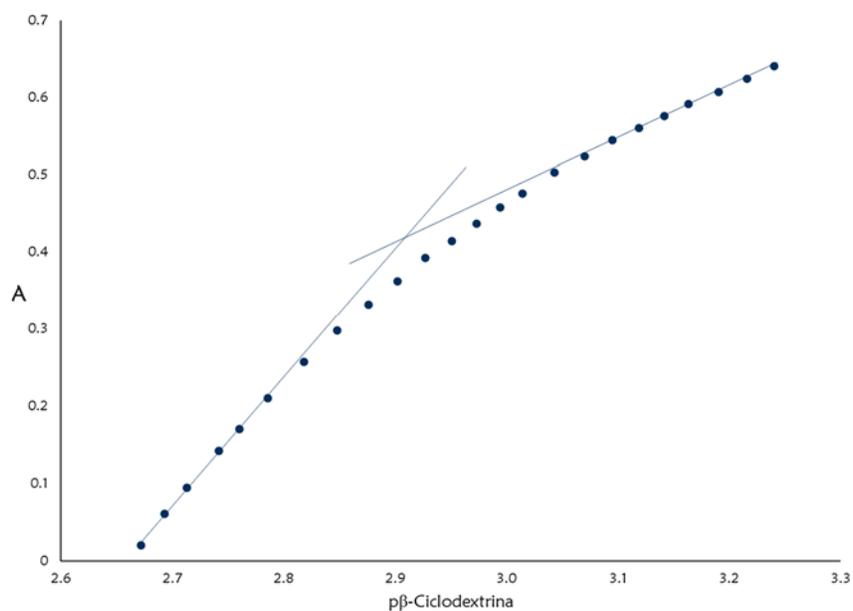
En la Gráfica 5.10 se observa que al aumentar la concentración de carvacrol se presenta un efecto hipercrómico hasta formarse la banda característica del carvacrol.

Para observar si se forma o no el complejo, se realiza la representación gráfica de la absorbancia en función de la relación molar de ambos reactantes, la cual se presenta en la Gráfica 5.11 (la absorbancia se determinó a 273 nm, que corresponde al máximo de absorbancia de la banda de Carvacrol).



Gráfica 5. 11. Absorbancia en función de la relación molar Carvacrol-β-ciclodextrina.

Debido a que la formación del complejo de inclusión carvacrol-β-ciclodextrina es un proceso poco cuantitativo, en la Gráfica 5.11 no se observa ningún cambio pronunciado en la pendiente de la recta. Para reacciones poco cuantitativas es preferible graficar la señal analítica en función del pPartícula (Rodríguez Orduño, 2017), como se muestra en la Gráfica 5.12.



Gráfica 5. 12. Absorbancia a 275 nm en función del pβ-ciclodextrina.

Con ayuda de la Gráfica 5.12, se puede estimar el valor de la constante de formación del complejo mediante la extrapolación de la curva a valores de p $\beta$ -ciclodextrina pequeños por lado, y por otro, la extrapolación a valores altos de p $\beta$ -ciclodextrina y en donde se intercepten éstas, será el valor de log $\beta$ . En la Gráfica 5.12, las rectas se interceptan en un p $\beta$ -ciclodextrina cercano a 2.9.

Es importante conocer el número de especies químicas que absorben radiación electromagnética presentes en el sistema, para poder proponer un modelo de formación de complejos que más se asemeje a lo observado experimentalmente. Para determinar el número de especies químicas que absorben radiación se empleó el programa TRIANG, cuyos resultados se presentan en la Tabla 5.3.

Tabla 5. 5. Resultado de TRIANG para la formación del complejo Carvacrol- $\beta$ -ciclodextrina.

$\Delta T$	No. de especies
0.001	4
0.002	3
0.003	3
0.004	2
0.005	2
0.006	2
0.007	2
0.008	2
0.009	2
0.010	2

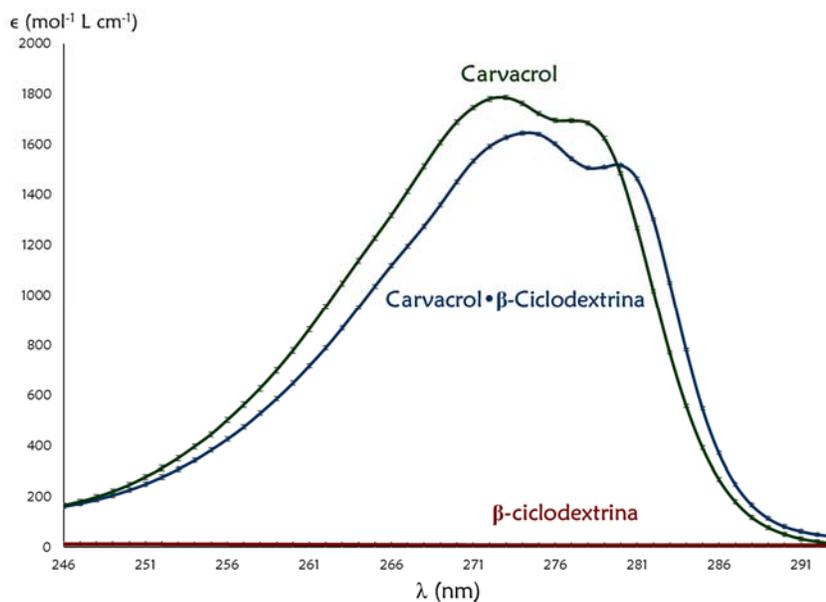
De acuerdo con los resultados de TRIANG en el sistema existen dos especies capaces de absorber radiación electromagnética dentro del intervalo de longitudes de onda empleado.

Finalmente, para refinar el valor de la constante de formación del complejo de inclusión Carvacrol- $\beta$ -ciclodextrina, se alimentó el programa SQUAD con 24 espectros que incluían 48 datos de absorbancia determinados en un intervalo de longitudes de onda de 246 a 293 nm. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 5.6. Cabe mencionar que el modelo propuesto fue el de la formación de un solo complejo: Carvacrol- $\beta$ -ciclodextrina, ya que, solamente con este modelo el programa pudo llegar al refinamiento de la constante de formación.

Tabla 5. 6. Resultados obtenidos de la refinación de la constante de formación del complejo carvacrol- $\beta$ -ciclodextrina.

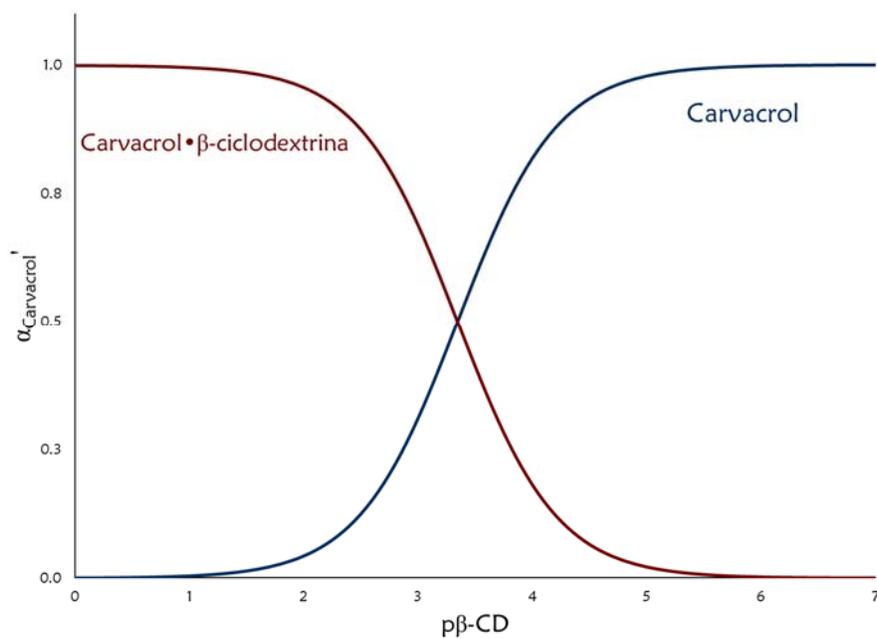
Equilibrio	Log $\beta$	$\sigma$	U
$Carv + \beta CD \rightleftharpoons Carv \cdot \beta CD$	$3.3464 \pm 0.0614$	$1.2884 \times 10^{-3}$	$1.6716 \times 10^{-3}$

El valor del logaritmo de la constante de formación del complejo Carvacrol- $\beta$ -ciclodextrina es de 3.3464. El programa SQUAD, además de refinar el valor de la constante, calcula los coeficientes de absortividad molar de cada especie presente en el sistema; de acuerdo con el programa TRIANG son dos especies las responsables de la absorbancia del sistema; para que SQUAD finalizara el refinamiento era necesario alimentarlo con un modelo en el cual existieran tres especies absorbentes, es decir, el huésped, el anfitrión y el complejo. En la Gráfica 5.13 se presentan los coeficientes de absortividad molar de las tres especies en función de la longitud de onda.



Gráfica 5.13. Coeficientes de absorptividad molar calculados por SQUAD. En verde son los coeficientes de Carvacrol; en azul, los coeficientes del complejo y en rojo los coeficientes de la  $\beta$ -ciclodextrina.

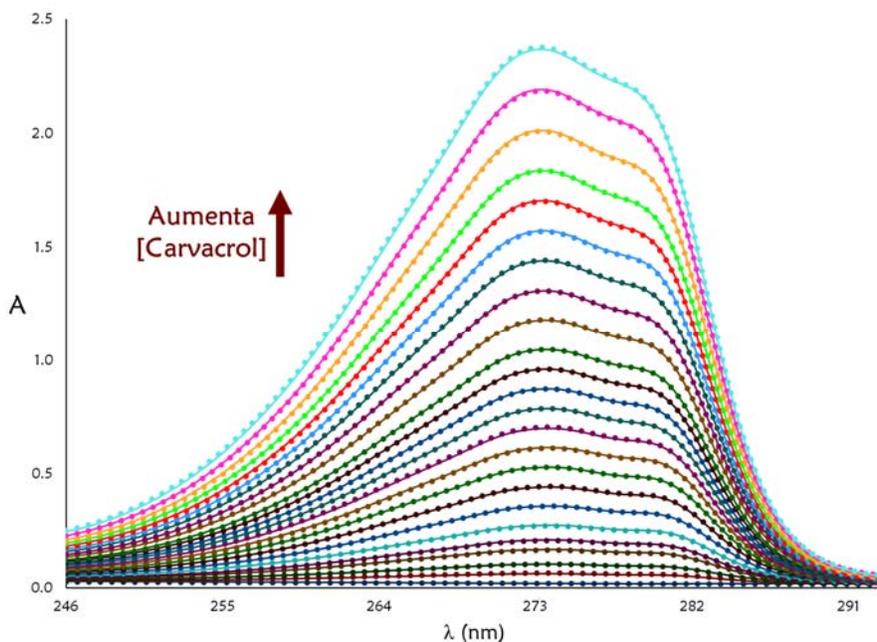
Conociendo el valor de la constante de formación del complejo carvacrol- $\beta$ -ciclodextrina, se pueden calcular las fracciones molares de las especies de carvacrol en función de la concentración de la  $\beta$ -ciclodextrina y así establecer bajo qué condiciones el complejo es la especie predominante en el sistema (Gráfica 5.14).



Gráfica 5.14. Diagrama de distribución de especies de Carvacrol en función del  $p\beta$ -CD.

Para que el complejo sea la especie predominante en solución acuosa, es necesario que el  $\beta$ -CD sea menor que 3.3464, es decir, que la concentración de  $\beta$ -ciclodextrina sea de  $4.5 \times 10^{-4}$  M o mayor.

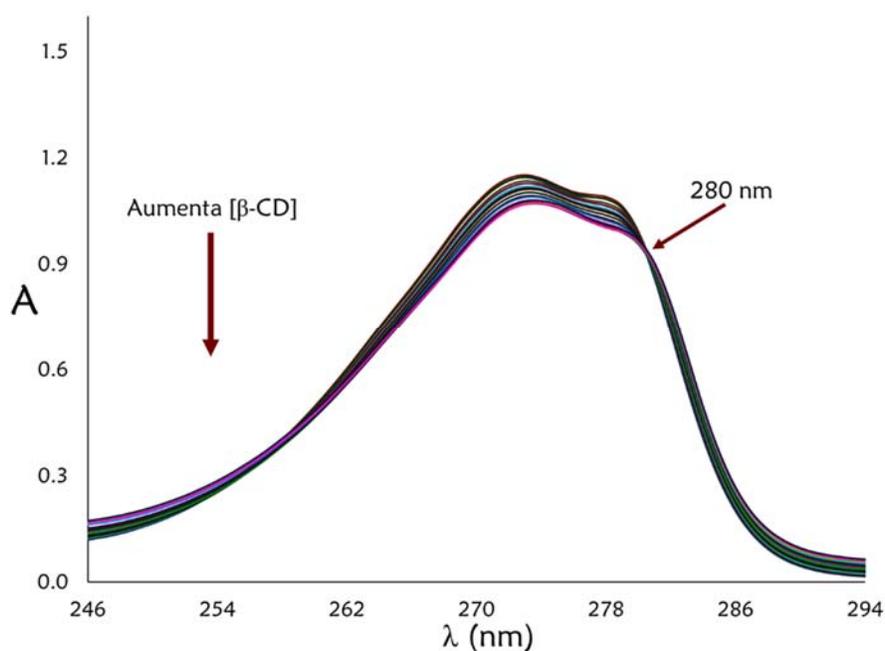
Finalmente, con los valores de los coeficientes de absorptividad molar de las especies químicas presentes en el sistema y las concentraciones calculadas con el valor de la constante de formación, se simularon los espectros de absorción determinados experimentalmente y se graficaron juntos. En la Gráfica 5.15 se presenta el empalme de los espectros experimentales (línea punteada) y los espectros teóricos (línea continua).



Gráfica 5. 15. Simulación de los espectros de absorción (línea punteada, espectros experimentales; línea continua, espectros teóricos).

Observando la Gráfica 5.15, se puede concluir que el modelo propuesto, en el cual se forma un solo complejo de inclusión con relación molar uno a uno, es el que se ajusta a lo observado experimentalmente, además los espectros simulados se asemejan bastante a los determinados experimentalmente y los parámetros estadísticos de la refinación de la constante son apropiados para la cantidad de datos analizados.

Por otro lado, se realizó la valoración de una alícuota de una solución de Carvacrol, por lo que la cantidad inicial de Carvacrol se mantuvo constante durante todo el experimento y la concentración de  $\beta$ -ciclodextrina fue variando. En la Gráfica 5.16 se presentan los espectros de absorción determinados a cada adición de valorante, los cuales se encuentran corregidos por efecto de la dilución.



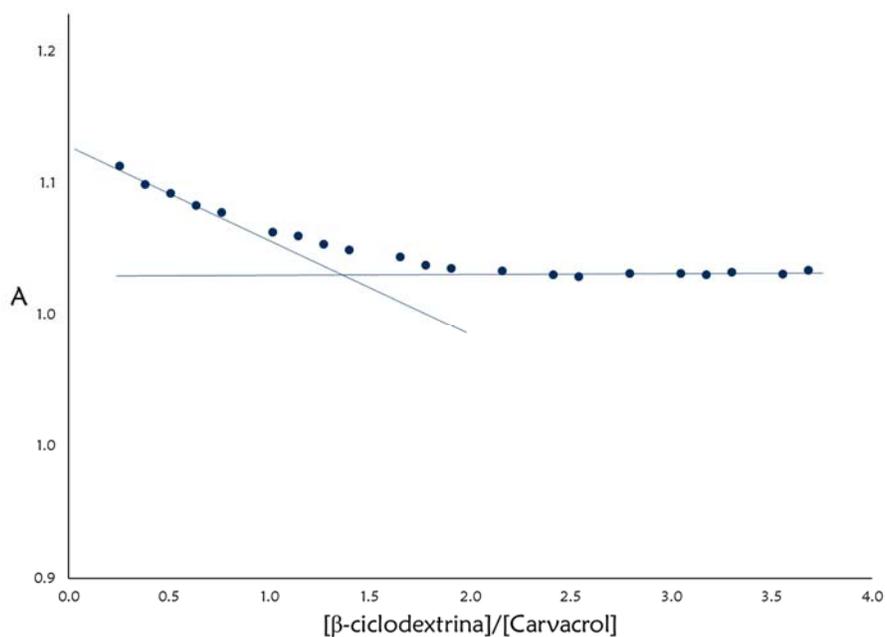
Gráfica 5. 16. Espectros de absorción determinados durante la valoración de Carvacrol con  $\beta$ -ciclodextrina.

Cuando se va aumentando la concentración de  $\beta$ -ciclodextrina, la banda de absorción del Carvacrol se ve afectada por efecto de la formación del complejo. Los efectos que sufre la banda del carvacrol son: hipocrómico, ya que los máximos de absorbancia disminuyen y batocrómico, ya que los máximos de absorbancia tienen un corrimiento pequeño hacia longitudes de onda mayores (la transición electrónica requiere de menor energía). Otro aspecto importante de la evolución de las bandas de absorción del carvacrol, es que, no desaparece el hombro que se forma en 278 nm al agregar  $\beta$ -ciclodextrina, que en el caso del timol sí sucede.

Es importante resaltar que entre los espectros presentados en el Gráfica 5.16, se forma un punto isobéptico en 280 nm, lo cual es un indicio de que existe, al menos, un

equilibrio químico relacionado con la especie química de la cual se va variando su concentración, en este caso, la  $\beta$ -ciclodextrina.

En la Gráfica 5.17 se presenta la absorbancia en función de la relación molar  $\beta$ -ciclodextrina/carvacrol. La absorbancia se determinó a 275 nm, longitud de onda a la cual corresponde el máximo de absorción del carvacrol.



Gráfica 5. 17. Absorbancia determinada a 275 nm en función de la relación molar  $[\beta\text{-ciclodextrina}]/[\text{Carvacrol}]$ .

De acuerdo con la Gráfica 5.17, se observa un cambio en el comportamiento de la curva de absorbancia en función de la relación molar, pero por ser una reacción poco cuantitativa, el cambio en la pendiente es muy tenue. A pesar de esto, se pudo realizar una extrapolación en ambos extremos de la curva y se llegaron a interceptar en una relación cercana a 1.5.

Por otro lado, se ejecutó el programa TRIANG para determinar el número de especies que sean capaces de absorber radiación electromagnética en el sistema. En la Tabla 5.7 se presentan los resultados obtenidos por TRIANG, la cual, nos muestra que hay, mínimo, dos especies que son las responsables de la absorbancia del sistema.

Tabla 5. 7. Resultados de TRIANG para determinar el número de especies absorbentes.

$\Delta T$	No. de especies
0.001	3
0.002	3
0.003	2
0.004	2
0.005	2
0.006	2
0.007	2
0.008	1
0.009	1
0.010	1

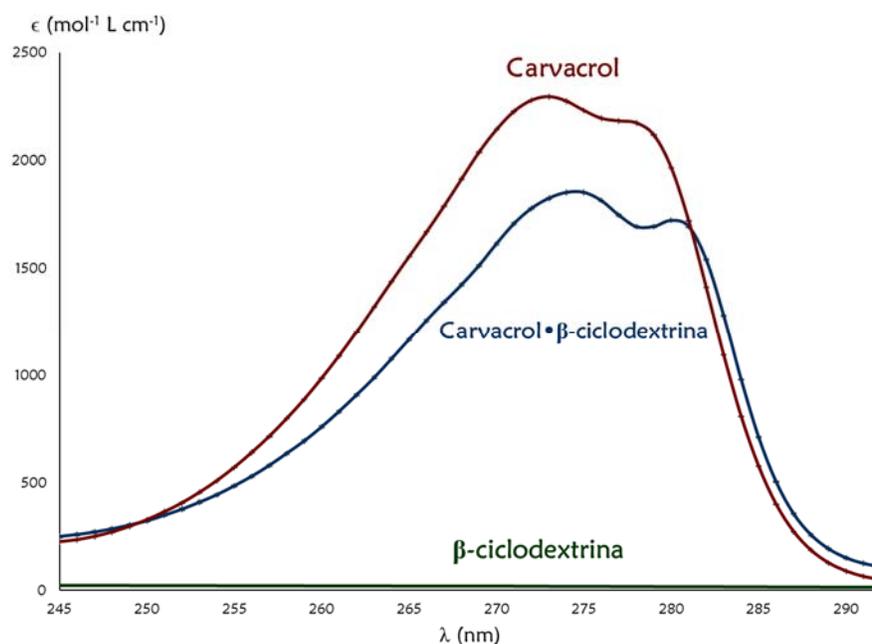
Teniendo como antecedente el número de especies que son capaces de absorber radiación y el gráfico de relaciones molares, se propusieron modelos en los que se forme un complejo de inclusión con estequiometría 1:1 y 1:2, ya que, una de las especies que absorbe es el carvacrol libre y la segunda especie debe de ser el complejo, ya que, la  $\beta$ -ciclodextrina posee coeficientes de absorptividad muy pequeños en el intervalo de longitud de onda empleado.

Para el refinamiento de la constante de formación del complejo se utilizó el programa SQUAD, el cual se alimentó con 24 espectros con 48 datos de absorbancia cada uno determinada de 245 nm a 292 nm. En la Tabla 5.8 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 5. 8. Resultados dados por SQUAD de la refinación de la constante de formación del complejo de inclusión Carvacrol- $\beta$ -ciclodextrina.

Equilibrio	Log $\beta$	$\sigma$	U
$Carv + \beta CD \rightleftharpoons Carv \cdot \beta CD$	$3.2529 \pm 0.0208$	$1.5752 \times 10^{-3}$	$2.6178 \times 10^{-3}$

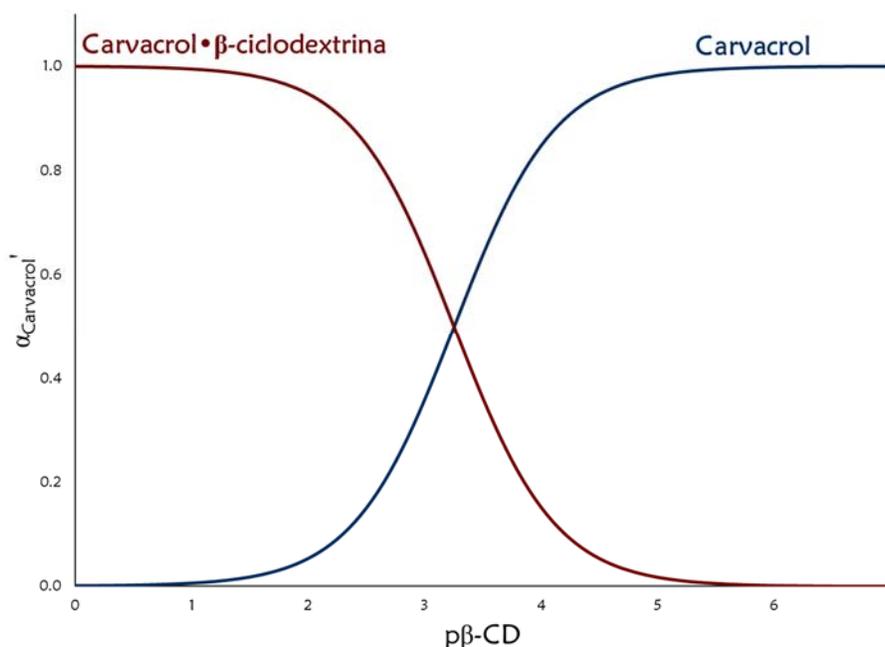
El valor de la constante de formación del complejo Carvacrol- $\beta$ -ciclodextrina es 1790.2 ( $10^{3.2529}$ ), de acuerdo al refinamiento hecho con SQUAD. En la Gráfica 5.18 se presentan los coeficientes de absorptividad molar, los cuales se encuentran graficados en función de la longitud de onda.



Gráfica 5. 18. Coeficientes de absorptividad molar calculados por SQUAD.

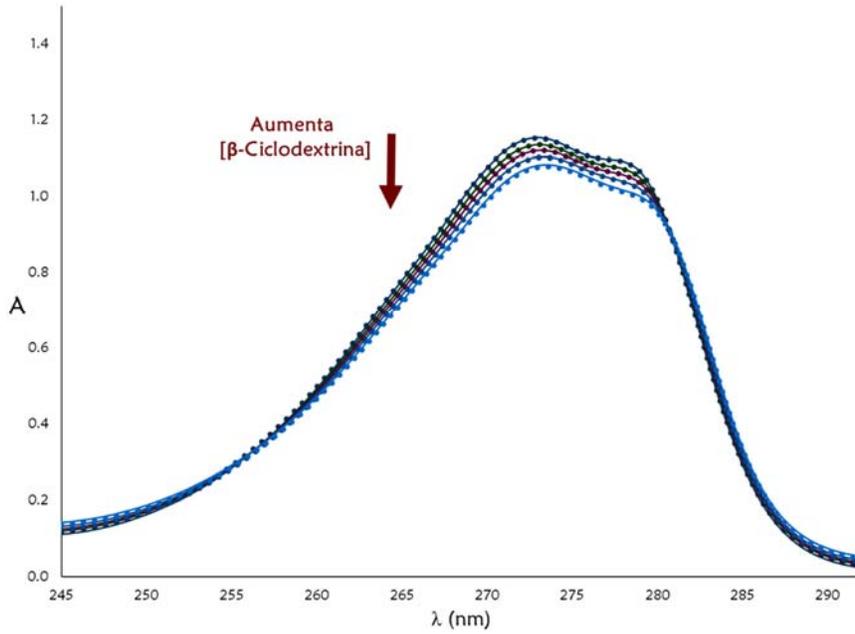
Con el valor de la constante de formación fue posible calcular las fracciones molares de las especies de Carvacrol a diferentes concentraciones de  $\beta$ -ciclodextrina. En la Gráfica 5.19 se presenta el diagrama de distribución de especies de carvacrol en función del  $p\beta$ -CD. Para que el complejo de inclusión sea la especie predominante

en el sistema, es necesario que la concentración de  $\beta$ -ciclodextrina sea mayor o igual que  $5.6 \times 10^{-4} \text{M}$ , es decir, valores de  $p\beta\text{-CD}$  menores o iguales que 3.2529.



Gráfica 5. 19. Diagrama de distribución de las especies de Carvacrol en función del  $p\beta\text{-CD}$ .

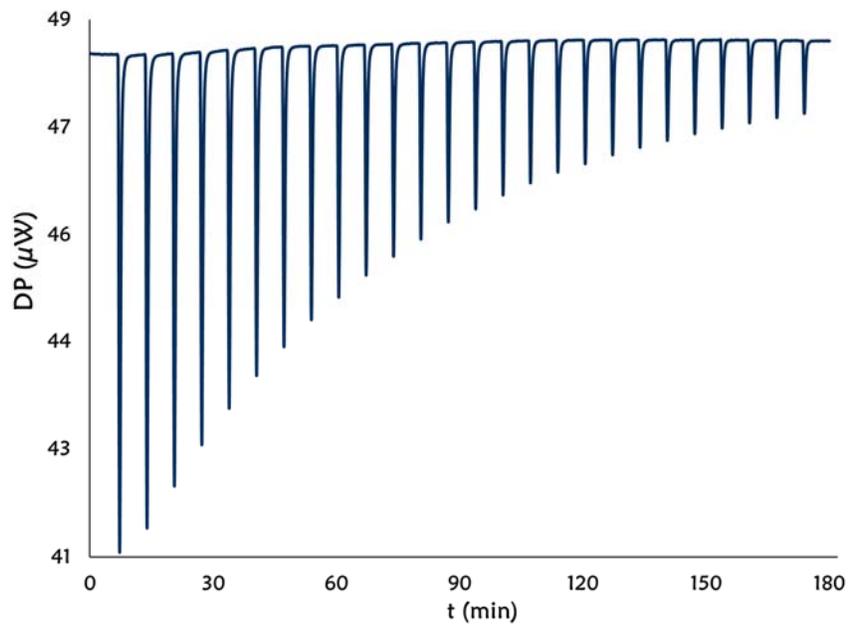
Finalmente, para corroborar la bondad del ajuste del modelo propuesto a lo observado experimentalmente, se calculó la absorbancia de cada espectro mediante la ley de Lambert-Beer y la ley de las aditividades, para lo cual se utilizaron los valores de fracciones molares calculadas en el diagrama de distribución de especies y los valores de los coeficientes de absortividad molar dados por SQUAD. En la Gráfica 5.20 se presentan los espectros experimentales (línea punteada) empalmados con los espectros teóricos (línea continua). En la simulación se observa que la diferencia entre los espectros experimentales y los teóricos es muy pequeña, sobre todo en los valores máximos de absorbancia; en donde se observan mayor diferencia en los mínimos de absorbancia.



Gráfica 5. 20. Simulación de los espectros de absorción. En línea punteada se presentan los espectros experimentales y en línea continua los teóricos.

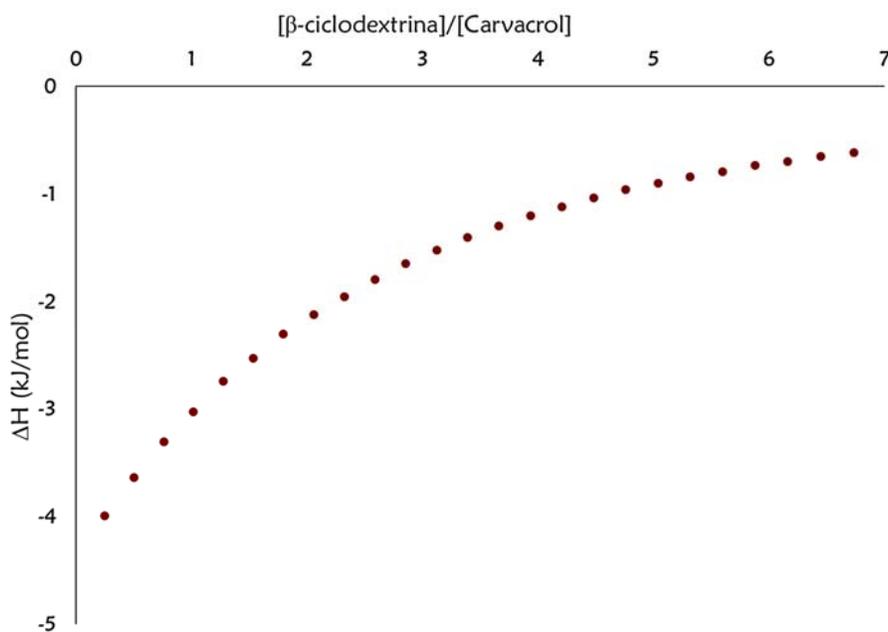
### Calorimetría de titulación isotérmica.

En la Gráfica 5.21 se presenta el termograma obtenido en la valoración de carvacrol con timol.



Gráfica 5. 21. Termograma obtenido de la titulación de calorimetría isotérmica de Carvacrol con β-ciclodextrina.

De acuerdo con la orientación de los picos de la Gráfica 5.21, la inclusión del carvacrol en  $\beta$ -ciclodextrina es exotérmica, ya que es necesario que el equipo disminuya la temperatura de la celda de reacción para que ésta sea igual a la de la celda de referencia. El termograma se integró para obtener la isoterma de enlace que se presenta en la Gráfica 5.22.



Gráfica 5. 22. Isotherma de enlace Carvacrol- $\beta$ -ciclodextrina.

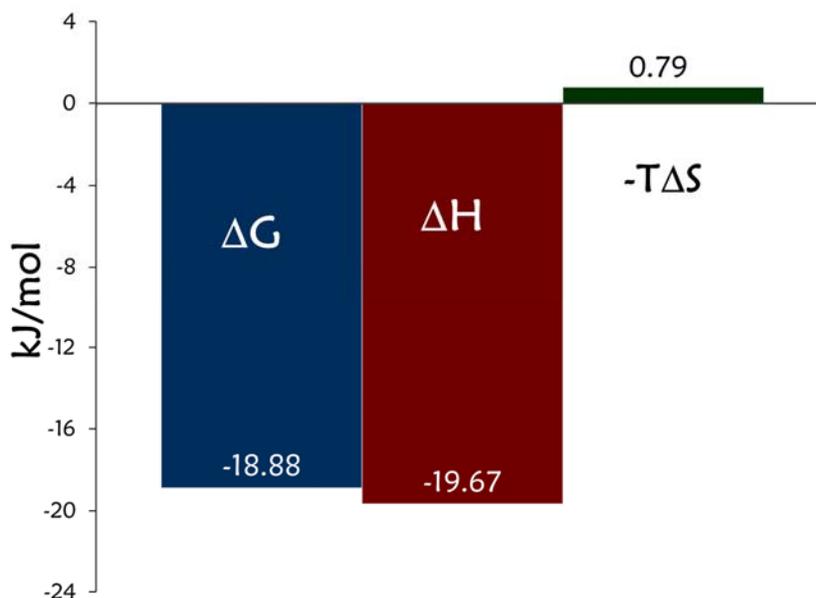
La forma de la isoterma de enlace de la Gráfica 5.22 corresponde a una reacción poco cuantitativa y exotérmica. Es una reacción poco cuantitativa porque la forma de la curva no es sigmoidea.

Los datos de la isoterma de enlace se ajustaron a un modelo de un sitio de enlace (one set of sites) con el programa MicroCal-PEAQ-ITC. Los datos se ajustaron a un modelo con una  $n$  de 1.18, por lo tanto, la relación estequiométrica del complejo de inclusión es de 1:1. En la Tabla 5.9 se presentan los parámetros del ajuste.

Tabla 5. 9. Parámetros obtenidos en el ajuste de la isoterma de enlace Carvacrol- $\beta$ -ciclodextrina a un modelo de un sitio de enlace.

Parámetro	Valor
K	2034.5 $\pm$ 2.5
Log $\beta$	3.31 $\pm$ 0.005
N	1.18
$\Delta H$	-19.67 $\pm$ 0.01 kJ mol <sup>-1</sup>
$\Delta G$	-18.88 $\pm$ 3.04 kJ mol <sup>-1</sup>
-T $\Delta S$	0.8 kJ mol <sup>-1</sup>
$\Delta S$	-2.68 J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>

En la Gráfica 5.23 se presentan los valores de los parámetros termodinámicos de la inclusión de carvacrol en  $\beta$ -ciclodextrina en forma de barras.



Gráfica 5. 23. Perfil termodinámico de la inclusión de Carvacrol en  $\beta$ -ciclodextrina.

El proceso de la inclusión de Carvacrol dentro de la  $\beta$ -ciclodextrina es espontáneo ya que la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) posee un valor negativo de 18.9 kJ/mol.

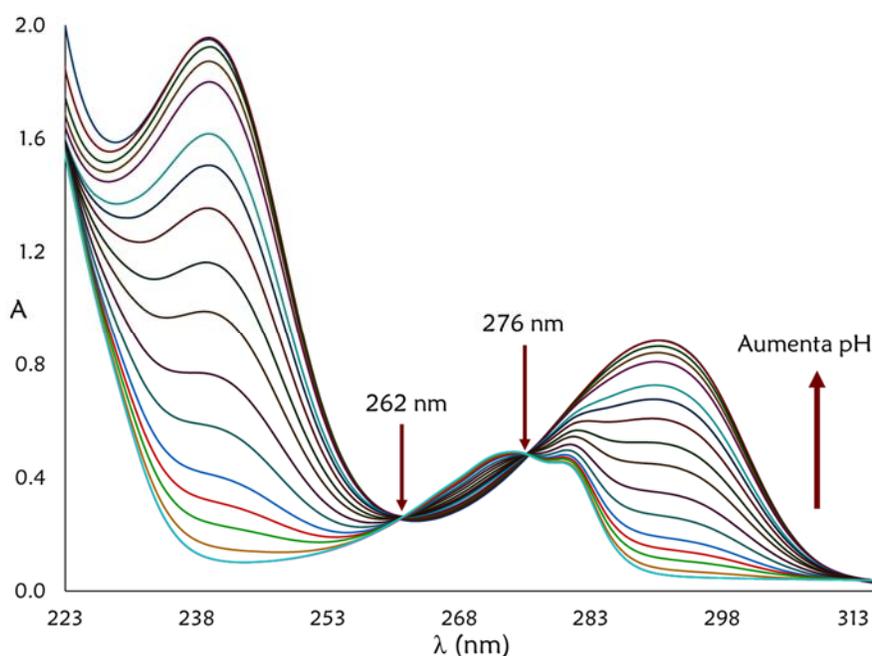
Dentro de la cavidad de la ciclodextrina, antes de la inclusión, hay moléculas de agua con una alta energía; al entrar el Carvacrol éstas salen liberando la energía en forma de calor, es decir, que la inclusión de Carvacrol en  $\beta$ -ciclodextrina es exotérmica y la

cantidad de calor que se libera es de 17.9 kJ por cada mol. La interacción que predomina entre el huésped y el anfitrión son enlaces de hidrógeno.

El cambio entrópico de la reacción es de  $-2.68 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ; el valor negativo del cambio entrópico se debe a que cuando se forma el complejo de inclusión la libertad de traslación y rotación del carvacrol disminuyen dando como resultado un sistema más ordenado (Mourtzinou, Salta, Yannakopoulou, Chiou, & Karathanos, 2007).

### Determinación del pKa del complejo Carvacrol- $\beta$ -ciclodextrina.

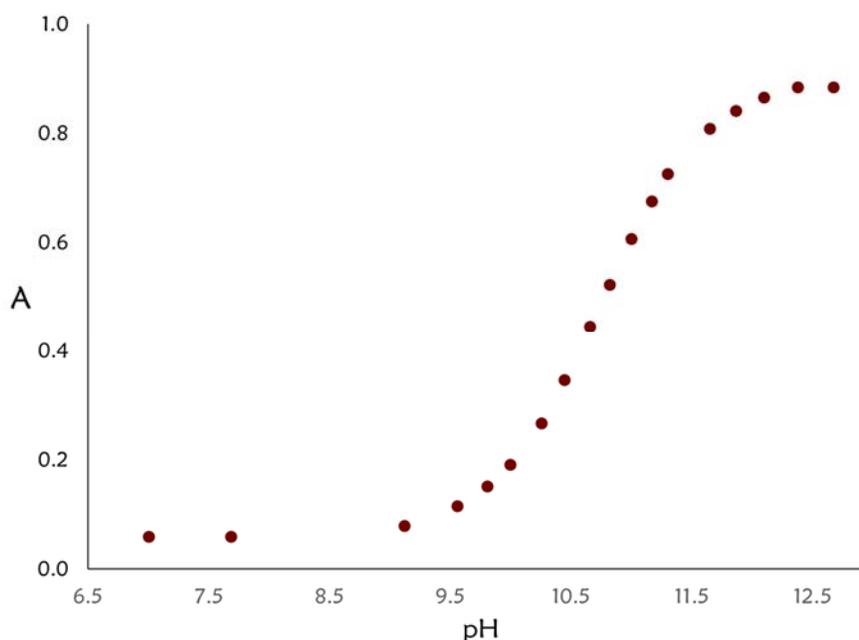
Teniendo en cuenta que el Carvacrol forma un complejo de inclusión con  $\beta$ -ciclodextrina, se determinó el pKa del complejo de inclusión imponiendo un  $p\beta$ -CD de 2 para asegurar que todo el Carvacrol se encuentre dentro de la  $\beta$ -ciclodextrina. En la Gráfica 5.24 se presentan los espectros de absorción obtenidos en la valoración ácido-base del complejo Carvacrol- $\beta$ -ciclodextrina los cuales se determinaron en un intervalo de pH de 12.67 a 7.0.



Gráfica 5. 24. Espectros de absorción de la valoración ácido-base del complejo de inclusión Carvacrol- $\beta$ -ciclodextrina

Como se puede observar en la Gráfica 5.24, entre los espectros de absorción determinados durante la valoración se forman dos puntos isobésticos: uno en 261 y el segundo en 276 nm, lo cual es un indicio de que existe, al menos, un equilibrio químico relacionado con la partícula con la cual se va variando su concentración.

En la Gráfica 5.25 se presenta la absorbancia determinada a 291 nm en función del pH.



Gráfica 5. 25. Absorbancia determinada a 291 nm en función del pH.

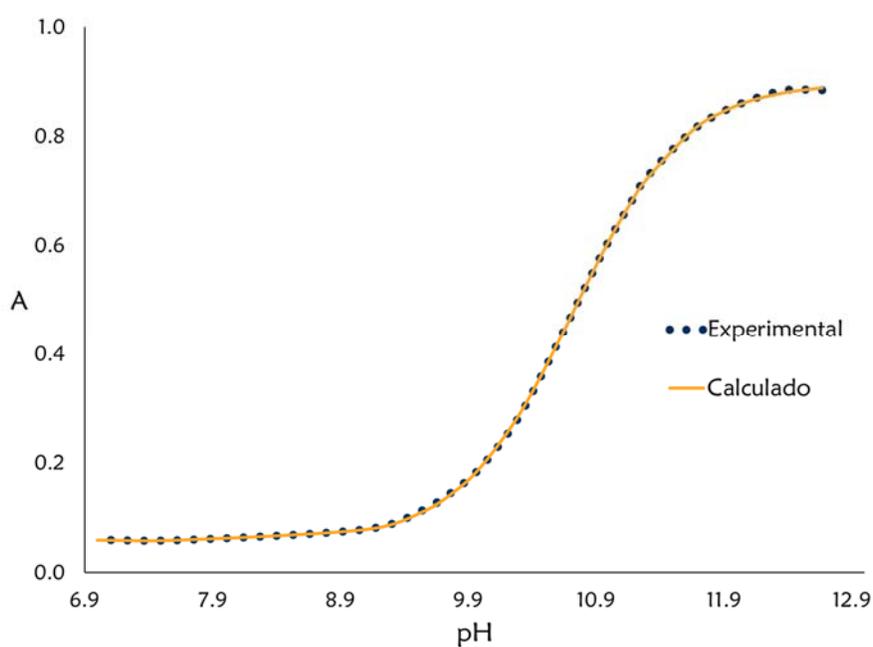
En la Gráfica 5.25 cada punto representa a un espectro de absorción y en donde se presenta un cambio pronunciado en la pendiente de la curva y es en donde se encuentra el valor del pKa del complejo de inclusión. Es por esto que para realizar el refinamiento del pKa del complejo se alimentó al programa con un modelo de un equilibrio.

Para hacer el refinamiento del pKa se alimentó el programa SQUAD con 24 espectros de absorción con 47 datos de absorbancia determinados en un intervalo de longitudes de onda de  $223 < \lambda < 315$ . En la Tabla 5.10 se presentan los resultados obtenidos para el refinamiento del pKa.

Tabla 5. 10. Resultados de SQUAD para el refinamiento de las constantes de disociación ácida del complejo Carvacrol- $\beta$ -ciclodextrina.

Equilibrio	Log $\beta$	$\sigma$	U
$CarvCD + H^+ \rightleftharpoons HCarvCD$	$10.7232 \pm 0.0034$	$1.6107 \times 10^{-2}$	$1.9483 \times 10^{-1}$

Para corroborar que el modelo propuesto es el que se ajusta a los resultados experimentales, se calculó la absorbancia a 291 nm en función del pH y se comparó con los datos de absorbancia experimentales

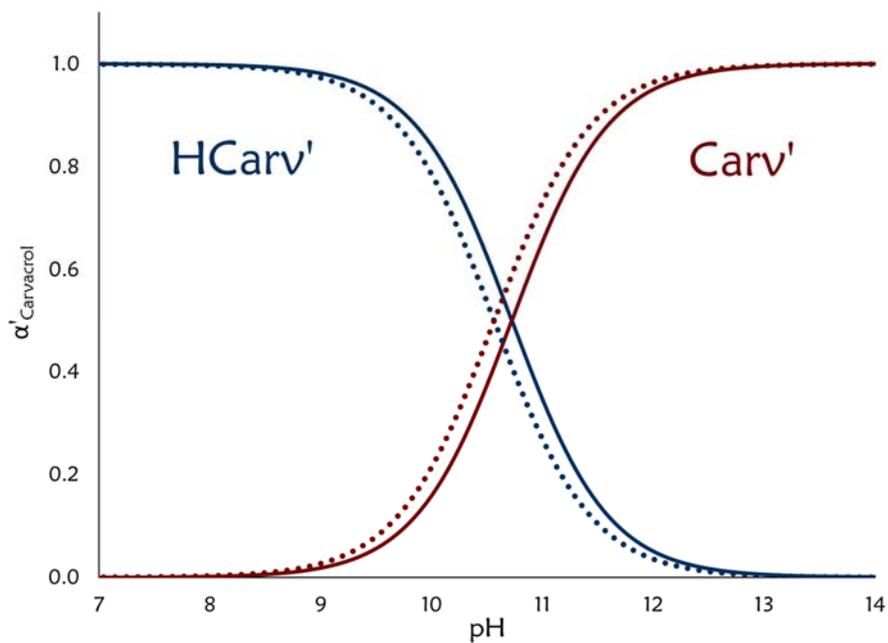


Gráfica 5. 26. Comparación de la absorbancia calculada (línea continua) y la experimental (línea punteada) en función del pH.

El complejo Carvacrol- $\beta$ -ciclodextrina se comporta como un ácido diprótico de Brønsted-Lowry en medio acuoso ya que el modelo propuesto de dos equilibrios tiene un buen ajuste a los datos experimentales además de que los parámetros estadísticos dados por SQUAD poseen valores adecuados.

La razón por la que aumenta el valor del pKa del Carvacrol, de 10.5635 a 10.7232, es porque se encuentra dentro de la cavidad de la  $\beta$ -ciclodextrina, ocasionando que las propiedades ácido-base del Carvacrol se vean modificadas.

Se construyó el diagrama de distribución de especies condicionales del Carvacrol y se comparó con el diagrama de distribución de Carvacrol sin  $\beta$ -ciclodextrina (Gráfica 5.27).



Gráfica 5. 27. Diagrama de distribución de especies ácido-base de Carvacrol. Línea punteada en ausencia de  $\beta$ -ciclodextrina; línea continua: especies ácido-base de Carvacrol a un  $p\beta$ -CD impuesto de 2.0.

El pKa del Carvacrol aumenta por efectos de complejación, es decir, que al encontrarse dentro de la cavidad de la  $\beta$ -ciclodextrina hace que disminuya su capacidad donadora de protón al medio y la estabilidad de la especie ácida aumente.

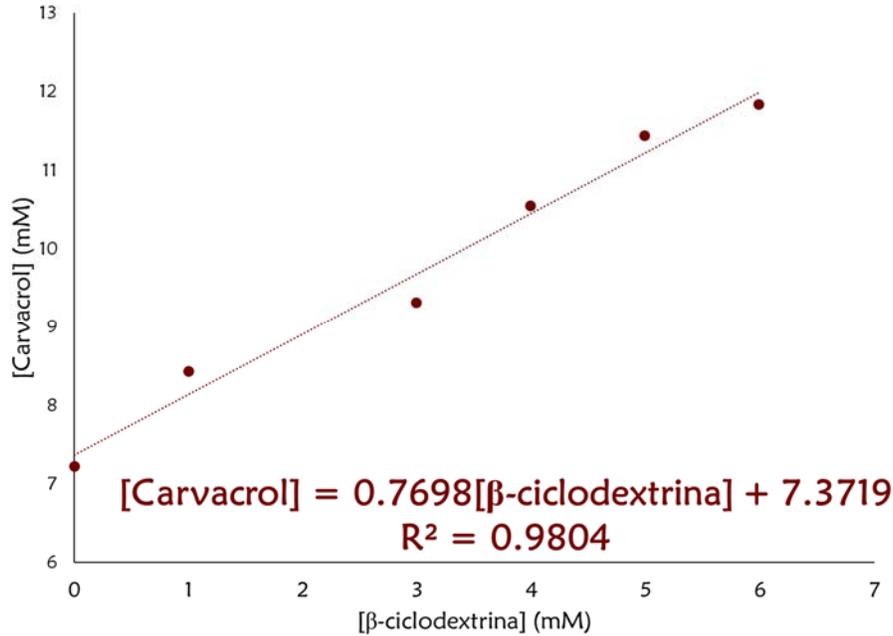
## Estudio de la solubilidad de Carvacrol en función de la concentración de $\beta$ -ciclodextrina.

En la Tabla 5.11 se presenta la cantidad de Carvacrol que se logró disolver en cada solución de  $\beta$ -ciclodextrina. El Carvacrol se cuantificó con ayuda de una curva de calibración cuya función fue:  $A^{270\text{nm}} = 1.9144[\text{Carvacrol}] - 0.0097$ .

Tabla 5. 11. Resultados del método de Higuchi-Connors para el Carvacrol.

Solución	[ $\beta$ -ciclodextrina] (mM)	[Carvacrol'] (mM)
1	0.00	7.23
2	1.00	8.44
3	2.99	9.32
4	3.99	10.55
5	4.99	11.44
6	5.98	11.84

Con los datos de la Tabla 5.11 se construyó el diagrama de solubilidad-fases que se presenta en la Gráfica 5.28.



Gráfica 5. 28. Diagrama de solubilidad-fases de Carvacrol en función de la concentración de β-ciclodextrina.

La solubilidad del Carvacrol se puede determinar cuándo a la concentración de β-ciclodextrina tiende a cero, es decir, que la ordenada al origen corresponde a la solubilidad de Carvacrol en agua. En este caso, la solubilidad de Carvacrol en agua es de  $7.3719 \times 10^{-3}$  M, lo que es equivalente a 1.11 g/L.

Es importante hacer notar que se logró disolver hasta un 60% más Carvacrol con ayuda de la β-ciclodextrina, ya que cuando se tiene una concentración de 6 mM de β-ciclodextrina la solubilidad de Carvacrol aumenta a 1.78 g/L.

Con el método de Higuchi-Connos también se puede determinar el valor de la constante de formación del complejo, la cual fue:

$$K = \frac{\alpha}{[Carvacrol]_0(1 - \alpha)}$$

$$K = \frac{0.7698}{7.3719 \times 10^{-3}(1 - 0.7698)}$$

$$K = 456.6$$

$$\log \beta = 2.66$$

El valor del  $\log \beta$  no se asemeja al determinado por el método de relaciones molares, ya que con el método de Higuchi-Connors se utilizan menos datos para determinar el valor de la constante. EL objetivo de emplear este último método es para apreciar cómo aumenta la solubilidad de Carvacrol en presencia de  $\beta$ -ciclodextrina



# Conclusiones

Tanto el timol como el carvacrol forman un complejo de inclusión con la  $\beta$ -ciclodextrina con una relación estequiométrica de 1:1, lo cual se pudo determinar por espectrofotometría UV-Vis y calorimetría por titulación isométrica.

Debido a que las interacciones que existen entre la  $\beta$ -ciclodextrina con Timol y Carvacrol son no covalentes, las reacciones de formación de los complejos de inclusión son poco cuantitativas y los logaritmos de las constantes de equilibrio determinados fueron  $3.42 \pm 0.04$  y  $3.35 \pm 0.06$ , respectivamente; los cuales son muy semejantes a los reportados por Kfoury (3.17 para timol y 3.42 para carvacrol). La diferencia en los valores de  $\log \beta$  viene dada por metodología empleada, ya que en el trabajo de Kfoury se hace mediante un método competitivo entre los monoterpenos y el naranja de metilo, además, para la determinación de las constantes en este trabajo se utilizó un número mayor de datos de absorbancia lo cual hace que los parámetros estadísticos del ajuste sean confiables.

Se logró establecer el perfil termodinámico mediante ITC de la inclusión de timol y carvacrol en  $\beta$ -ciclodextrina. La inclusión de los terpenos en  $\beta$ -ciclodextrina ocurre de manera espontánea por que el valor de la energía libre de Gibbs presenta un valor negativo y es exotérmica debido a que el valor del  $\Delta H$  es menor que cero en ambos casos. Por lo regular, los grupos ionizables quedan fuera de la ciclodextrina cuando se forman los complejos de inclusión, pero en el caso de los compuestos fenólicos, el grupo OH queda dentro de la cavidad gracias a que se pueden formar enlaces de hidrógeno (Rekharsky & Inoue, 1998). El cambio entálpico se debe a la liberación de moléculas de agua de la cavidad hacia el seno de la solución y por la formación de enlaces de hidrógenos entre los terpenos y la  $\beta$ -ciclodextrina.

La especiación química es necesaria para identificar las condiciones óptimas (pH, concentraciones de huésped y anfitrión, temperatura, fuerza iónica, etc) para obtener una especie química de interés. Por lo regular se emplea para mejorar la forma de preparación de un fármaco.



# Referencias

- Andrade-Ochoa, S., Nevárez-Moorillón, G. V., Sánchez-Torres, L. E., Villanueva-García, M., Sánchez-Ramírez, B. E., Rodríguez-Valdez, L. M., & Rivera-Chavira, B. E. (2015). Quantitative structure-activity relationship of molecules constituent of different essential oils with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0858-2>
- Arena, G., & Sgarlata, C. (2017). Modern Calorimetry: An Invaluable Tool in Supramolecular Chemistry. In *Comprehensive Supramolecular Chemistry II* (pp. 213–237). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.13716-3>
- Ben Arfa, A., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., & Chalier, P. (2006). Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*, *43*(2), 149–154. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01938.x>
- Bernad Bernad, M. J. (1998). *Interacciones intermoleculares y aspectos termodinámicos de las reacciones de complejación entre ciclodextrinas y algunos antihelmínticos*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Caron, L., Tilloy, S., Monflier, E., Wieruszkeski, J. M., Lippens, G., Landy, D., ... Surpateanu, G. (2000). Study of the inclusion complexes of beta-cyclodextrin with the sodium salt of trisulfonated triphenylphosphine. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, *38*(Scheme 1), 361–379. <https://doi.org/10.1023/a:1008165110579>
- Chaudhary, V. B., & Patel, J. K. (2013). Cyclodextrin inclusion complex to enhance solubility of poorly water soluble drugs: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, *4*(1), 68–76. Retrieved from [www.ijpsr.com](http://www.ijpsr.com)
- Connors, K. A. (1997). The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. *Chemical*

*Reviews*, 97(5), 1325–1358. <https://doi.org/10.1021/cr960371r>

Cramer, F., Saenger, W., & Spatz, H.-C. (1967). *Inclusion Compounds. XIX.1a The Formation of Inclusion Compounds of  $\alpha$ -Cyclodextrin in Aqueous Solutions. Thermodynamics and Kinetics. Journal of the American Chemical Society* (Vol. 89). UTC. <https://doi.org/10.1021/ja00977a003>

de Oliveira Makson, G., Guimarães, A. G., Araújo Adriano, A., Quintans Jullyana, S., Santos, M. R., & Quintans-Júnior, L. J. (2015). Cyclodextrins: improving the therapeutic response of analgesic drugs: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 25(8), 897–907. <https://doi.org/10.1517/13543776.2015.1045412>

Dinar, K., Sahra, K., Seridi, A., & Kadri, M. (2014). Inclusion complexes of N-sulfamoyloxazolidinones with  $\beta$ -cyclodextrin: A molecular modeling approach. *Chemical Physics Letters*, 595–596, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2014.02.004>

Dodziuk, H. (2006). *Molecules with Holes - Cyclodextrins. Cyclodextrins and Their Complexes: Chemistry, Analytical Methods, Applications*. <https://doi.org/10.1002/3527608982.ch1>

Friedman, M. (2014). Chemistry and multibeneficial bioactivities of carvacrol (4-isopropyl-2-methylphenol), a component of essential oils produced by aromatic plants and spices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf5023862>

García, R., & Palou, E. (2008). Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol.pdf. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*.

González-Mondragón, E., Torralba-González, A., García-Gutiérrez, P., Robles-González, V. S., Salazar-Govea, A. Y., & Zubillaga, R. A. (2016). Thermodynamic

analysis of ferulate complexation with  $\alpha$ -,  $\beta$ - And  $\gamma$ -cyclodextrins. *Thermochimica Acta*, 634, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2016.04.009>

Guimarães, A. G., Oliveira, M. A., Alves, R. D. S., Menezes, P. D. P., Serafini, M. R., De Souza Araújo, A. A., ... Quintans, L. J. (2015). Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with  $\beta$ -cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. *Chemico-Biological Interactions*, 227, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.12.020>

Hansen, L. D., Fellingham, G. W., & Russell, D. J. (2011). Simultaneous determination of equilibrium constants and enthalpy changes by titration calorimetry: Methods, instruments, and uncertainties. *Analytical Biochemistry*, 409(2), 220–229. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.11.002>

Hernández García, L. (2017). *Estudio de la interacción de mangiferina con  $\beta$ -ciclodextrina al formar complejos de inclusión en medio acuoso*. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA.

Jansook, P., Ogawa, N., & Loftsson, T. (2018). Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 535(1–2), 272–284. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.11.018>

Kfoury, M., Auezova, L., Fourmentin, S., & Greige-Gerges, H. (2014). Investigation of monoterpenes complexation with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 80(1–2), 51–60. <https://doi.org/10.1007/s10847-014-0385-7>

Kfoury, M., Auezova, L., Greige-Gerges, H., & Fourmentin, S. (2016). Development of a Total Organic Carbon method for the quantitative determination of solubility enhancement by cyclodextrins: Application to essential oils. *Analytica*

*Chimica Acta*, 918, 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.03.013>

Kfoury, M., Auezova, L., Ruellan, S., Greige-Gerges, H., & Fourmentin, S. (2015). Complexation of estragole as pure compound and as main component of basil and tarragon essential oils with cyclodextrins. *Carbohydrate Polymers*, 118, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.073>

Kfoury, M., Landy, D., Ruellan, S., Auezova, L., Greige-Gerges, H., & Fourmentin, S. (2016). Determination of formation constants and structural characterization of cyclodextrin inclusion complexes with two phenolic isomers: Carvacrol and thymol. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 12(January), 29–42. <https://doi.org/10.3762/bjoc.12.5>

Kowalcze, M., & Jakubowska, M. (2018). Voltammetric determination of carvacrol on Boron Doped Diamond Electrode. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.08.061>

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

Lima, P. S. S., Lucchese, A. M., Araújo-Filho, H. G., Menezes, P. P., Araújo, A. A. S., Quintans-Júnior, L. J., & Quintans, J. S. S. (2016). Inclusion of terpenes in cyclodextrins: Preparation, characterization and pharmacological approaches. *Carbohydrate Polymers*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.040>

Loftsson, T., & Duchêne, D. (2007). Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.10.044>

Martínez Mendoza, D. L. (2015). *Estudio de la especiación química del compuesto LQM 314 con el catión Cu (II) en su sal de acetato*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Menezes, P. dos P., Serafini, M. R., de Carvalho, Y. M. B. G., Soares Santana, D. V.,

- Lima, B. S., Quintans-Júnior, L. J., ... de Souza Araújo, A. A. (2016). Kinetic and physical-chemical study of the inclusion complex of  $\beta$ -cyclodextrin containing carvacrol. *Journal of Molecular Structure*, *1125*, 323–330. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.06.062>
- Mura, P. (2014). Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.02.022>
- Poon, G. M. K. (2010). Explicit formulation of titration models for isothermal titration calorimetry. *Analytical Biochemistry*, *400*(2), 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.01.025>
- Rajkumar, P., Selvaraj, S., Suganya, R., Velmurugan, D., Gunasekaran, S., & Kumaresan, S. (2018a). Vibrational and electronic spectral analysis of thymol an isomer of carvacrol isolated from *Trachyspermum ammi* seed: A combined experimental and theoretical study. *Chemical Data Collections*, *15–16*, 10–31. <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2018.03.003>
- Rajkumar, P., Selvaraj, S., Suganya, R., Velmurugan, D., Gunasekaran, S., & Kumaresan, S. (2018b). Vibrational and electronic spectral analysis of thymol an isomer of carvacrol isolated from *Trachyspermum ammi* seed: A combined experimental and theoretical study. *Chemical Data Collections*, *15–16*, 10–31. <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2018.03.003>
- Rodrigues, L. B., Martins, A. O. B. P. B., Ribeiro-Filho, J., Cesário, F. R. A. S., e Castro, F. F., de Albuquerque, T. R., ... de Menezes, I. R. A. (2017). Anti-inflammatory activity of the essential oil obtained from *Ocimum basilicum* complexed with  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) in mice. *Food and Chemical Toxicology*, *109*, 836–846. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.02.027>
- Rodríguez Orduño, F. Y. (2017). *Determinación de las constantes de equilibrio de*

*inclusión de los complejos isoxicam con 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina.*  
Universidad Autónoma Metropolitana.

- Souza, A. C. A., Abreu, F. F., Diniz, L. R. L., Grespan, R., DeSantana, J. M., Quintans-Júnior, L. J., ... Camargo, E. A. (2018). The inclusion complex of carvacrol and β-cyclodextrin reduces acute skeletal muscle inflammation and nociception in rats. *Pharmacological Reports*, *70*(6), 1139–1145. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2018.07.002>
- Steed, J. W., & Atwood, J. L. (2009). *Supramolecular chemistry*. John Wiley & Sons (Second). Chichester, UK.
- Szejtli, J. (1998). Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chemical Reviews*, *98*(5), 1743–1754. <https://doi.org/10.1021/cr970022c>
- Szejtli, J., & Szente, L. (2005). Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.05.006>
- Velazquez-Campoy, A., Ohtaka, H., Nezami, A., Muzammil, S., & Freire, E. (2004). Isothermal Titration Calorimetry. *Current Protocols in Cell Biology*, 17.8.1-17.8.24. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1708s23>
- Werker, E., Putievsky, E., & Ravid, U. (1985). The essential oils and glandular hairs in different chemotypes of *Origanum vulgare* L. *Annals of Botany*, *55*(6), 793–801. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a086958>
- Yousefi, M., Hoseini, S. M., Vatnikov, Y. A., Nikishov, A. A., & Kulikov, E. V. (2018). Thymol as a new anesthetic in common carp (*Cyprinus carpio*): Efficacy and physiological effects in comparison with eugenol. *Aquaculture*, *495*, 376–383. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.022>
- Zou, W., Wang, M., Yao, D., Zhu, Z., Sun, W., Cai, H., ... Zhang, W. (2017).

Fluorescence and circular dichroism spectroscopy to understand the interactions between cyclodextrins and  $\alpha$ -galactosidase from green coffee beans. *Food Bioscience*, 20(September), 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.09.002>



# Anexos

## I. Programa SQUAD.

El programa SQUAD (Stability QUotients from Absorbance Data) es un programa diseñado por Legget en lenguaje Fortran. La función de SQUAD es el de refinar los valores de las constantes de formación de un modelo químico propuesto a partir de datos de absorbancia determinados a diferentes longitudes de onda y a diferentes composiciones químicas (Moya Hernández, 2003).

El modelo químico propuesto puede ser dependiente o no del pH; el modelo químico propuesto puede contener una o más especies cuya fórmula sea:



Dónde: j, l, k y q deben de ser o igual o menores de 1; para  $i < 0$  indica OH y para  $i > 0$  indica la presencia de H.

El refinamiento se da cuando se minimiza la suma de los cuadrados de los residuales de la absorbancia (U) mediante el algoritmo de Gauss-Newton (Leggett, 1985)

$$U = \sum_{i=1}^I \sum_{k=1}^{NW} (A_{i,k}^T - A_{i,k}^E)^2$$

Donde:

I=todas las soluciones

NW= todas las longitudes de onda

$A_{i,k}^T$ =Todas las absorbancias calculadas por SQUAD a la  $k$ -ésima longitud de onda de la  $i$ -ésima solución.

$A_{i,k}^E$ = Todas las absorbancias determinadas experimentalmente de la  $k$ -ésima longitud de onda de la  $i$ -ésima solución.

El programa SQUAD calcula la absorbancia de la  $i$ -ésima solución a la  $k$ -ésima longitud de onda empleando la ley de Beer asignando coeficientes de absorptividad molar a cada especie y determina la concentración de éstas mediante el algoritmo de Newton-Raphson (Rodríguez-Laguna, Reyes-García, Moya-Hernández, Rojas-Hernández, & Gómez-Balderas, 2016).

La convergencia se da cuando la diferencia en la minimización entre un ciclo iterativo y otro es no mayor a 0.001 unidades. Que se cumpla este criterio no significa que se ha llegado al mejor refinamiento, ya que, se puede caer en el caso de una convergencia de un mínimo local (Rodríguez-Laguna et al., 2016).

SQUAD utiliza algunos parámetros estadísticos para establecer que el modelo químico propuesto es el que explica las observaciones experimentales. Tales parámetros son (Gómez Zaleta, 2006):

- Parámetro de correlación (matriz)
- La desviación estándar sobre los datos de absorbancia ( $\sigma_{\text{datos}}$ ) y las constantes de formación ( $\sigma_{\text{ctes.}}$ ).
- La desviación estándar sobre cada espectro ( $\sigma_{\text{espectro}}$ ).
- La desviación estándar de los coeficientes de absorptividad ( $\sigma_{\text{coeff}}$ ).

Se espera que los valores de la desviación oscilen entre 0.0001 y 0.001 (Rodríguez-Laguna et al., 2016).

Es necesario que el modelo químico propuesto tenga congruencia con las observaciones experimentales, además de tener parámetros estadísticos deseables. Los coeficientes de absorptividad calculados deber de corresponder con el comportamiento experimental de cada especie y que éstas puedan predominar bajo las condiciones experimentales (Moya Hernández, 2003).

## II. Método de Higuchi-Connors

El método de Higuchi-Connors se emplea en el estudio de la solubilidad de moléculas orgánicas formando complejos de inclusión con ciclodextrina (Hernández García, 2017). El estudio consiste en agregar diferentes cantidades de ciclodextrina (CD) a una solución saturada del huésped (G) y dejar en agitación constante para que se llegue al equilibrio. Después, se cuantifica al huésped que se pudo disolver en la solución para construir el diagrama de solubilidad-fases, en el cual, se grafica la cantidad de huésped en función de la cantidad de ciclodextrina (Piletti et al., 2017).

Los diagramas de solubilidad-fases obtenidos se clasifican en dos tipos: A y B

Diagrama tipo A: Formación de complejos solubles

Diagrama tipo B: Formación de complejos poco solubles.

Además, con el diagrama de solubilidad-fases de Higuchi-Connors, es posible determinar el valor de la constante de formación del complejo en estudio.

$$K = \frac{[G_m CD_n]}{[G]^m [CD]^n}$$

Por balance de materia se tiene

$$[G] = G_0$$

$$[G]_T = G_0 + m[G_m CD_n]$$

$$[CD]_T = [CD] + n[G_m CD_n]$$

Por lo tanto

$$[G] = G_0$$

$$[G_mCD_n] = \frac{[G]_T - G_0}{m}$$

$$[CD] = [CD]_T - [G_mCD_n]$$

$G_0$  es la concentración del huésped en la solución en ausencia de ciclodextrina. Para el sistema de solubilidad-fases cuando el complejo que se forma tiene una relación estequiométrica de 1:1 ( $m=1$ ;  $n=1$ ), se llega a la siguiente expresión.

$$[G]_T = \frac{KG_0[CD]_T}{1 + KG_0} + G_0$$

Cuando se obtiene un gráfico de solubilidad-fases del tipo A, la ordenada al origen será la solubilidad del huésped en el medio y la pendiente será:

$$\alpha = \frac{KG_0}{1 + KG_0}$$

A partir de la expresión anterior se puede determinar el valor de la constante de formación del complejo de inclusión.

$$K = \frac{\alpha}{G_0(1 - \alpha)}$$

## Referencias.

- Gómez Zaleta, B. (2006). *Determinación de las constantes de acidez de la Mangiferina y su interacción con algunos iones metálicos en medio acuoso*. Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.522>
- Hernández García, L. (2017). *Estudio de la interacción de mangiferina con  $\beta$ -ciclodextrina al formar complejos de inclusión en medio acuoso*. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA.
- Leggett, D. J. (1985). *Computational Methods for the Determination of Formation Constants*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4934-1>
- Moya Hernández, M. del R. (2003). *Estudio de especiación química de los fármacos antiinflamatorios Tenoxicam y Piroxicam con cationes metálicos de interés biológico*. Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa.
- Piletti, R., Bugiereck, A. M., Pereira, A. T., Gussati, E., Dal Magro, J., Mello, J. M. M., ... Fiori, M. A. (2017). Microencapsulation of eugenol molecules by  $\beta$ -cyclodextrine as a thermal protection method of antibacterial action. *Materials Science and Engineering C*, 75, 259–271. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.075>
- Rodríguez-Laguna, N., Reyes-García, L. I., Moya-Hernández, R., Rojas-Hernández, A., & Gómez-Balderas, R. (2016). Chemical Speciation of the System Cu(II)-Indomethacin in Ethanol and Water by UV-Vis Spectrophotometry. *Journal of Chemistry*, 2016(li), 1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/9804162>