

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

“Extracción y caracterización de L-carnitina en aguacate (*Persea americana*) mediante técnicas instrumentales y computacionales”

Disertación previa a la obtención del título de Licenciatura en Ciencias

Químicas, mención Química Analítica.

PAMELA CAROLINA CARRILLO SÁNCHEZ

Quito, 2011

CERTIFICACIÓN

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Químicas, mención Química Analítica, de la candidata Pamela Carolina Carrillo Sánchez, ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Fecha: 25 de noviembre de 2011

Dra. Lorena Meneses Olmedo

DIRECTORA

AGRADECIMIENTO

- A mis padres por ser aquellos seres maravillosos que con su esfuerzo, amor, paciencia y disciplina me han guiado por el camino del bien. Porque siempre han sido y serán mi ejemplo a seguir.
- A la Dra. Lorena Meneses, mi directora de tesis, quien siempre me ha compartido sus valiosos conocimientos, además de brindarme su amistad.
- A mi familia, por estar junto a mí, por su preocupación y soporte en todo momento. En especial, a mi hermano Esteban, por facilitarme toda la información necesaria para la elaboración de este proyecto.
- A mi Marcelito, simplemente por estar junto a mí, por hacerme muy feliz.
- A mis mejores amigas, Fati , Missy y Reina, por brindarme su amistad en todo momento y compartir hermosos momentos juntas, y a aquellos amigos que siempre han estado junto a mí, en especial, Dani, Cris y Day.
- A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y todos los docentes que han sido parte de mi formación académica. En especial, al Ing. Alexis Arias, por su colaboración para la elaboración de este trabajo.

A mis pulguitos amados: mis padres.

Lo importante de la ciencia no es tanto descubrir nuevos hechos como descubrir nuevas formas de pensar sobre ellas.

William Lawrence Bragg

TABLA DE CONTENIDOS

PORTADA	i
CERTIFICACIÓN.....	ii
AGRADECIMIENTO	iii
TABLA DE CONTENIDOS	vi
LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE DIAGRAMAS, ESQUEMAS Y FIGURAS.....	xii
LISTA DE ANEXOS	xiv
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I	6
1. MARCO TEÓRICO	6
1.1. EL AGUACATE (<i>Persea Americana</i>).....	6
1.1.1. ETIMOLOGÍA	6
1.1.2. DESCRIPCIÓN	6
1.1.3. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	8
1.1.4. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DEL FRUTO	9
1.1.5. COMERCIALIZACIÓN DEL AGUACATE	10

1.2. L-CARNITINA	11
1.2.1. DESCRIPCIÓN	11
1.2.2. ROL BIOLÓGICO	12
1.2.3. BIOSÍNTESIS	13
1.2.4. FUENTES ALIMENTICIAS	15
1.2.5. DEFICIENCIA	16
1.2.6. BENEFICIOS PARA LA SALUD COMO SUPLEMENTO	18
1.2.7. TOXICIDAD	19
1.2.8. LA L-CARNITINA Y EL AGUACATE	20
CAPÍTULO II	21
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
2.1. TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	21
2.1.1. EXTRACCIÓN CON SOLVENTES	21
2.1.2. CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA DE INTERCAMBIO IÓNICO.....	22
2.1.3. ESPECTROFOTOMETRÍA UV/VIS	23
2.1.4. ANÁLISIS CUANTITATIVO	24
2.1.5. ESPECTROFOTOMETRÍA INFRARROJA (IR).....	24
2.1.6. INSTRUMENTACIÓN.....	25
2.1.7. INTERPRETACIÓN DE ESPECTROS IR	27
2.1.8. MEDICIÓN DE LA CINÉTICA DE REACCIÓN MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA DE INFRARROJOS.....	28
2.2. TÉCNICAS COMPUTACIONALES	30
2.2.1. INTRODUCCIÓN A LA QUÍMICA COMPUTACIONAL	30

2.2.2. MÉTODOS COMPUTACIONALES	31
2.2.3. TEORÍA DEL FUNCIONAL DE LA DENSIDAD	32
2.2.4. FUNCIONES DE BASE	33
2.2.5. OPTIMIZACIÓN DE LA GEOMETRÍA MOLECULAR	34
2.2.6. APLICACIONES DE LA QUÍMICA COMPUTACIONAL	34
2.2.7. CONCEPTOS QUÍMICOS	35
2.2.7.1. POTENCIAL QUÍMICO	35
2.2.7.2. DUREZA	36
2.2.7.3. FUNCIONES DE FUKUI	37
2.2.8. ÍNDICES DE REACTIVIDAD Y SELECTIVIDAD	38
2.2.8.1. ÍNDICES DE REACTIVIDAD	38
2.2.8.1.1. ELECTROFILIA GLOBAL (ω)	38
2.2.8.1.2. NUCLEOFILIA GLOBAL (N)	39
2.2.8.2. ÍNDICES DE SELECTIVIDAD	40
2.2.8.2.1. ELECTROFILIA LOCAL (ω_k)	40
2.2.8.2.2. NUCLEOFILIA LOCAL (N_k)	40
2.3. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO	40
2.3.1. TOMA DE MUESTRA	40
2.3.2. EXTRACCIÓN DE L-CARNITINA DEL AGUACATE	43
2.3.3. PURIFICACIÓN A TRAVÉS CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA DE INTERCAMBIO IÓNICO	43
2.3.4. CUANTIFICACIÓN DE L-CARNITINA POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV/VIS	44

2.3.5. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE ACETILACIÓN DE LA L-CARNITINA	45
2.3.6. MODELAMIENTO COMPUTACIONAL.....	48
2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	50
2.4.1. DISTRIBUCIÓN t DE STUDENT	51
2.4.2. COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV)	52
CAPÍTULO III	53
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
3.1. EXTRACCION Y CUANTIFICACION DE L-CARNITINA EN AGUACATE	53
3.1.1. EXTRACCIÓN DE L-CARNITINA DEL AGUACATE	53
3.1.2. PURIFICACIÓN CON CROMATOFRÍA DE COLUMNA DE INTERCAMBIO IÓNICO	54
3.1.3. CUANTIFICACIÓN DE L-CARNITINA POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV/VIS	54
3.2. DETERMINACIÓN DE CINÉTICA DE REACCIÓN DE ACETILACIÓN DE LA L-CARNITINA.....	61
3.3. MODELAMIENTO COMPUTACIONAL.....	74
CAPÍTULO IV	90
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	90
4.1. CONCLUSIONES.....	90

4.2. RECOMENDACIONES	91
BIBLIOGRAFÍA	93
ANEXOS	102

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1. Contenido de vitaminas y minerales del aguacate por cada 100g de fruto fresco	9
Tabla 1.2. Composición nutricional de aguacate por cada 100g de fruto fresco.....	10
Tabla 1.3. Contenido de L-carnitina en 100g/ml de alimento fresco de origen animal	16
Tabla 1.4. Contenido de L-carnitina en 100g de alimento fresco vegetal.....	16
Tabla 2.1. Características morfológicas de las variedades Fuerte y Booth 8	42
Tabla 2.2. Concentraciones de hidrocioruro de L-carnitina para una concentración constante de cloruro de acetilo de 2.81M	47
Tabla 2.3. Concentraciones de cloruro de acetilo para una concentración constante de hidrocioruro de L-carnitina de 1.0M	47
Tabla 3.1. Absorbancias para la construcción de la curva de calibración para la determinación de L-carnitina por espectrofotometría UV/VIS.....	57
Tabla 3.2. Cantidad de L-carnitina en 1g de aguacate variedad Fuerte fresco determinado por espectrofotometría UV/VIS.....	57
Tabla 3.3. Cantidad de L-carnitina en 1g de aguacate variedad Booth 8 fresco determinado por espectrofotometría UV/VIS	58

Tabla 3.4. Cantidad de L-carnitina en aguacate fresco y valor t para la variedad Fuerte y Booth 8	61
Tabla 3.5. Velocidades iniciales a diferentes concentraciones para el hidrocloreuro de L-carnitina y sus logaritmos	69
Tabla 3.6. Velocidades iniciales a diferentes concentraciones para el cloruro de acetilo y sus logaritmos	69
Tabla 3.7. Constantes de velocidad para la reacción de acetilación del hidrocloreuro de L-carnitina.....	73
Tabla 3.8. Conformaciones espaciales de la L-carnitina y sus energía.....	74
Tabla 3.9. Valores de los orbitales HOMO y LUMO e índices de reactividad globales para las conformaciones espaciales de la L-carnitina.....	75
Tabla 3.10. Índices de selectividad para la L-carnitina (conformación plegada).....	76
Tabla 3.11. Valores de energía obtenidos computacionalmente para la reacción de acetilación de la L-carnitina.....	78
Tabla 3.12. Índices de reactividad para el hidrocloreuro de L-carnitina y el cloruro de acetilo	80
Tabla 3.13. Nucleofilias locales para el hidrocloreuro de L-carnitina	82
Tabla 3.14. Electrofilias locales para el cloruro de acetilo.....	84
Tabla 3.15. Estructura y energía del estado de transición de la reacción de acetilación en fase gaseosa	85
Tabla 3.16. Estructura y energía del estado de transición de la reacción de acetilación en fase acuosa.....	86

LISTA DE DIAGRAMAS, ESQUEMAS Y FIGURAS

Diagrama 2.1. Diagrama de bloques de los componentes fundamentales de un espectrofotómetro UV/VIS	26
Diagrama 2.2. Diagrama de bloques de los componentes fundamentales de un espectrofotómetro FTIR	27
Esquema 3.1. Reacción del azul de bromofenol en medio básico.....	56
Esquema 3.2. Reactividad en orden decreciente de derecha a izquierda de los derivados de ácidos carboxílicos.....	62
Esquema 3.3. Mecanismo de esterificación donde se requiere de otra molécula de alcohol	71
Esquema 3.4. Mecanismo de esterificación donde el protón se elimina por el ataque del ión cloruro y el reordenamiento de los electrones del carbono carbonílico.....	72
Figura 1.1. Frutos de aguacate (<i>Persea americana</i>) de las tres razas. De izquierda a derecha: raza Antillana, raza Guatemalteca y raza Mexicana	7
Figura 1.2. Partes del fruto del aguacate (<i>Persea americana</i>).....	8
Figura 1.3. Fórmula estructural de la L-carnitina.....	11
Figura 1.4. Funcionamiento de la L-carnitina en el transporte de ácidos grasos y regulación de la relación intramitocondrial de acil-CoenzimaA/CoenzimaA	12
Figura 1.5. Metabolitos participantes en la biosíntesis de la L-carnitina	14
Figura 1.6. Biosíntesis de la L-Carnitina.....	15
Figura 2.1. Representación de las vibraciones moleculares por la interacción con energía infrarroja	25

Figura 2.2. Llenado de la celda espectrofotométrica y lectura en el espectrofotómetro UV/VIS.....	45
Figura 2.3. Parámetros usados para la corrida de los espectros IR	46
Figura 2.4. Programa <i>Gaussian03</i>	48
Figura 2.5. Programa <i>Gaussview 3.09</i>	49
Figura 2.6. IRC del estado de transición para la acetilación de la L-carnitina.....	50
Figura 2.7. Comparación de la distribución z normal con la t de Student.....	51
Figura 3.1. Fórmula estructural del azul de bromofenol	55
Figura 3.2. Curva de calibración para la determinación de L-carnitina por espectrofotometría UV/VIS.....	56
Figura 3.3. Reproducibilidad de los resultados para la variedad Fuerte.....	59
Figura 3.4. Reproducibilidad de las muestras para la variedad Booth 8	60
Figura 3.5. Espectro IR del ácido acético	64
Figura 3.6. Espectro IR del cloruro de acetilo puro.....	64
Figura 3.7. Espectro IR del cloruro de acetilo en solución ácida	65
Figura 3.8. Curva de calibración para la determinación de cloruro de acetilo en solución ácida por FTIR.....	65
Figura 3.9. Espectro IR del hidrocloreuro de L-carnitina	66
Figura 3.10. Espectro IR del hidrocloreuro de L-carnitina en solución ácida.....	67
Figura 3.11. Curva de calibración para la determinación de hidrocloreuro de L-carnitina en solución ácida por FTIR	67
Figura 3.12. Espectro IR del hidrocloreuro de O-acetil-L-carnitina.....	68
Figura 3.13. Determinación del orden de reacción para el hidrocloreuro de L-carnitina	70
Figura 3.14. Determinación del orden de reacción para el cloruro de acetilo.....	70
Figura 3.15. Fórmula estructural de un aminoácido	77

Figura 3.16. IRC del estado de transición para la reacción en medio gaseoso..... 87

Figura 3.17. IRC del estado de transición para la reacción en medio gaseoso..... 88

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1: Certificado de análisis de la L-carnitina..... 104

ANEXO 2: Certificado de análisis del hidrocloreuro de L-carnitina..... 106

ANEXO 3: Certificado de análisis del hidrocloreuro de O-acetil-L-carnitina 108

ANEXO 4: Tabla de Distribución t de Student 110

ANEXO 5: Velocidades iniciales para el cloruro de acetilo 112

ANEXO 6: Velocidades iniciales para el hidrocloreuro de L-carnitina..... 117

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo la extracción y caracterización de la L-carnitina en aguacate (*Persea americana*) por medio de técnicas instrumentales y computacionales. Comprendió varias etapas: primeramente, se realizó la extracción y cuantificación de la cantidad de L-carnitina en dos variedades de aguacate (Booth 8 y Fuerte) por medio de espectrofotometría UV/VIS. Luego, se determinó la ley de velocidad de la reacción de acetilación del hidrocloreuro de L-carnitina con cloruro de acetilo por espectrofotometría de infrarrojos. Por último, mediante Química Computacional, se estableció la termodinámica y el mecanismo de la reacción en fase gaseosa y en fase acuosa, además la reactividad y selectividad de los reactivos empleando el Programa *Gaussian03*, con método B3LYP y el conjunto de bases 6-311G(d,p).

La variedad Fuerte contiene 82 μg de L-carnitina/gramo de fruto fresco de aguacate, mientras que la Booth, 84 $\mu\text{g/g}$. La reacción de acetilación es de orden dos, de primer orden para cada reactivo, con una constante de velocidad de $4.45 \times 10^{-4} \text{ l/mol}\cdot\text{s}$ a $298 \pm 2\text{K}$, y una entalpía de reacción de -8.198 kcal/mol en fase gaseosa y de -4.105 kcal/mol en fase acuosa. Se pudo determinar que la reacción de acetilación se da por un ataque nucleofílico del hidrocloreuro de L-carnitina con una posterior eliminación de ácido clorhídrico, con la formación de un estado de transición tetraédrico. Se estableció que la L-carnitina es una molécula altamente nucleofílica, mientras que el cloruro de acetilo es el electrófilo.

Palabras claves: L-carnitina, aguacate, acetilación, termodinámica, mecanismo de reacción, reactividad, selectividad.

ABSTRACT

The goal of this study was the extraction and characterization of L-carnitine in avocado (*Persea Americana*). It comprehended several steps: firstly, L-carnitine was extracted and quantified in two avocado varieties (Booth 8 and Fuerte) with the use of UV/VIS spectroscopy. Then, the rate law of the acetylation reaction between L-carnitine hydrochloride with acetyl chloride was determined using infrared spectroscopy. Finally, its thermodynamics and reaction mechanism were established in the gas and aqueous phase, as well as the reactivity and selectivity of its reactants by Computational Chemistry with the use of the *Gaussian 03* software, applying the B3LYP method and 6-311g(d,p) basis set.

The Fuerte variety contains 82 μg de L-carnitina/g of fresh fruit, while Booth 8 has 84 $\mu\text{g/g}$. The acetylation reaction is a second order reaction, one for each reagent, with a reaction constant of $4.45 \times 10^{-4} \text{ l/mol}\cdot\text{s}$ at $298 \pm 2\text{K}$. The enthalpy was -8.198 kcal/mol in the gas phase and -4.105 kcal/mol in the aqueous phase. Therefore, it could be determined that this reaction takes place by a nucleophilic attack of the hydrochloride L-carnitine followed by elimination of chlorhydric acid, where a tetrahedral transition state is formed. In consequence, it could be settled that L-carnitine is a highly nucleophilic molecule, while acetyl chloride is an electrophile.

Key words: L-carnitine, avocado, acetylation, thermodynamics, reaction mechanism, reactivity, selectivity.

INTRODUCCIÓN

El aguacate, por ser el miembro del reino vegetal con un alto contenido de L-carnitina, ha sido sujeto de varias investigaciones sobre la cuantificación de este nutriente mediante varias técnicas. La primera fue realizada por Fraenkel en 1953 mediante un ensayo biológico que relacionaba el crecimiento y el peso de la larva del gusano *Tenebrio Larvae* con el contenido de L-carnitina en extractos vegetales, pero éste no tuvo éxito^[1]. Así, mediante un ensayo enzimático, se pudo por primera vez cuantificar la cantidad de L-carnitina en el mesocarpio del aguacate^[2]. El primer ensayo químico para su determinación fue realizado en 1957 por Friedman por espectrofotometría visible^[3]. Décadas después, se desarrolló un método radioisotópico para su determinación con el uso de un contador de centelleo^[4]. En la actualidad, otros métodos de cuantificación de L-carnitina se han desarrollado como cromatografía líquida de alta eficiencia con detector ultravioleta (por sus siglas en inglés: HPLC/UV), espectroscopía de masas tándem (tándem MS) o HPLC/tándem MS que no incluyen una determinación en aguacate^[5].

La importancia de la L-carnitina en los organismos tanto animales como vegetales es alta, adicionalmente, su uso como suplemento para el tratamiento de varias enfermedades es evidente. Una deficiencia puede llevar a consecuencias negativas, por lo que el consumo de una dieta rica en ésta es primordial. El aguacate al ser de bajo costo, fácil acceso y parte de la dieta alimentaria de nuestro medio, además de un alimento rico en proteínas y grasas insaturadas, es una opción para personas con mayores requerimientos de L-carnitina.

El aguacate usa la L-carnitina para el mismo fin que los humanos la utilizan: la β -oxidación de las grasas, además del sistema glioxílico existente en todos los vegetales. Es claro que el mecanismo de acción en el metabolismo celular de la L-carnitina se da por reacciones de esterificación, por lo que la descripción de su reactividad y selectividad permitirá obtener información importante para el entendimiento de su mecanismo de reacción.

A pesar de que se ha reportado los niveles de L-carnitina en el mesocarpio por varias técnicas, la mayoría bioquímicas, no se ha encontrado una técnica meramente instrumental que corrobore estos datos. Así, se vio la necesidad de reportar la cantidad encontrada en dos de las variedades más consumidas en el país mediante una técnica que se adapta a las facilidades analíticas del medio.

Por otra parte, poco ha sido explorado en el campo de la descripción fisicoquímica de la molécula, por lo que el uso de técnicas computacionales e instrumentales permitirá producir información sobre los sitios reactivos de la molécula y su mecanismo de reacción en reacciones de esterificación tomando como ejemplo, en este caso, su reacción de acetilación.

Por ello, en el estudio presentado se tuvo como principal fin la caracterización de la L-carnitina en el aguacate por medio de técnicas computacionales e instrumentales. Así, se tuvo como objetivo cuantificar la L-carnitina en el aguacate por espectrofotometría UV/VIS. Seguido de esto, se procedió a realizar un análisis termodinámico de la molécula y de su reacción de acetilación, además de establecer la reactividad y regioselectividad de

la molécula con el uso de la Química Computacional. Para finalizar se midió la cinética de reacción por medio de espectrofotometría de infrarrojos con transformadas de Fourier.

Para poder guiar de una mejor manera al lector a través del trabajo, se expone cómo está organizado, lo cual se detalla a continuación:

En el Capítulo I, Marco Teórico, se encontrará una breve descripción del aguacate. Además, de una revisión bibliográfica acerca de la L-carnitina.

En el Capítulo II, se presentan los principios teóricos de las técnicas analíticas usadas, seguidos de una breve descripción sobre las técnicas computacionales usadas. Por último, se detallan los materiales y procedimientos aplicados en el desarrollo experimental.

En el Capítulo III, se muestran los resultados obtenidos, los cuales son sometidos a discusión por medio de comparación con datos experimentales y teóricos de otros estudios.

Para culminar, en el Capítulo IV, se señalan las principales conclusiones y recomendaciones derivadas del proceso investigativo.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. EL AGUACATE (*Persea americana*)

1.1.1. ETIMOLOGÍA^[6]

Su nombre más común, aguacate, proviene de la lengua azteca en la que denominan al árbol como “zhuacaquahuitl” y al fruto “ahuacatl”. Adicionalmente, es conocido como palta y abacate. Perteneció al subgénero *Persea*, el cual es conocido como el de los “verdaderos aguacates”, obteniendo la denominación de *americana* debido a que fue primeramente encontrado y descrito en el continente americano.

1.1.2. DESCRIPCIÓN^[7]

El aguacate pertenece a la familia de las Laureáceas, género *Persea*, estudiado por Miller en 1754. Se distinguen tres razas: Mexicana, Antillana y Guatemalteca. Además de estas razas definidas, la mayor parte de los aguacates cultivados es el resultado de la hibridación. Es una especie polimorfa que posee una raíz corta, débil y de sistema radicular que crece superficialmente. Los árboles pueden alcanzar hasta los 20 m, de diámetro de tronco de un poco más de un metro y de leña de color crema claro. Las hojas son alternas pecioladas y simples, de forma variable, con nervadura principal amarilla. Las flores del árbol de

aguacate se agrupan en racimos, las cuales son bisexuadas y pequeñas de color verde-amarillo. En la Figura 1.1 se aprecia el fruto del aguacate, el cual es una drupa asimétrica de tamaño, color y forma que difieren dependiendo del tipo de cultivo.



Figura 1.1. Frutos de aguacate (*Persea americana*) de las tres razas. De izquierda a derecha: raza Antillana, raza Guatemalteca y raza Mexicana ^[8]

El fruto consiste de varias partes como se muestra en la Figura 1.2. El más externo, el exocarpio (cáscara) consiste de tejidos epidérmicos recubiertos de una capa de cera, rica en lenticelas amarillas, blancas o grises que sobresalen de la superficie. El mesocarpio o parte comestible es amarilla o verde y consiste de células isodiamétricas de parénquima e idioblastos de aceite distribuidos uniformemente. En la parte más interna, está el endocarpio que es una capa frágil celular adherida fuertemente a la envoltura de la semilla. Finalmente, se encuentra la semilla, compuesta por una cubierta seminal y embrión, dos cotiledones pulposos, una plúmula, hipocótilo y radícula fuertemente adheridos al centro de los cotiledones^[8].

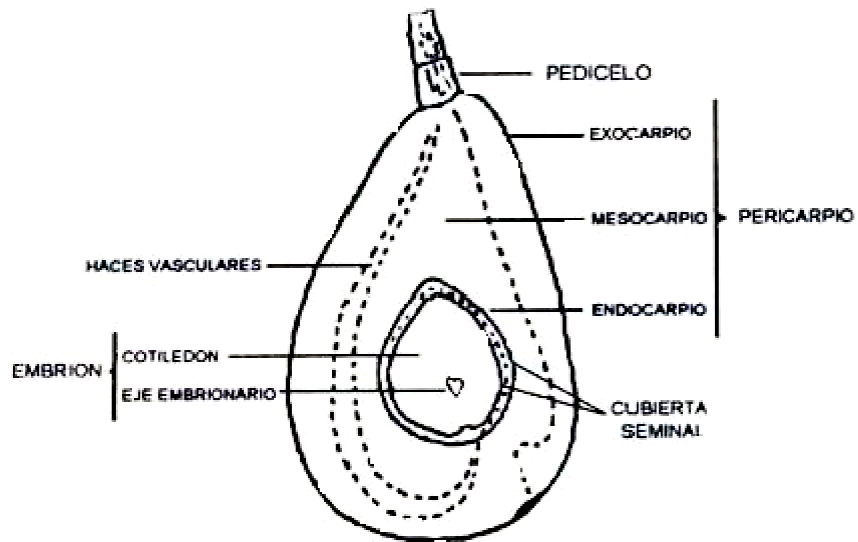


Figura 1.2. Partes del fruto del aguacate (*Persea americana*)^[9]

1.1.3. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA^[6]

- Reino: *Plantae*
- Subreino: *Tracheobionta*
- Superdivisión: *Spermathphyta*
- División: *Magnoliophyta*
- Clase: *Magnoliosida*
- Subclase: *Magnolidae*
- Orden: *Laurales*
- Familia: *Lauraceae*
- Género: *Persea*
- Especie: *Persea americana*

1.1.4. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DEL FRUTO^[8]

La composición del fruto varía de acuerdo al tipo de cultivo, región, estado de madurez y condiciones de crecimiento. Posee un alto contenido de agua, proteínas, y aminoácidos libres como aspargina, glutamina, ácido aspártico y glutámico. Con respecto a los lípidos, los ácidos grasos mayoritarios son el ácido oleico (70-80%), linoleico (10-11%) y palmítico (casi un 7%). Además de contener carbohidratos, lípidos y proteínas, el aguacate es una gran fuente de vitaminas y minerales, por lo que se considera como un alimento de alto valor nutricional, lo cual se puede observar en las Tablas 1.1 y 1.2.

Tabla 1.1. Contenido de vitaminas y minerales del aguacate por cada 100g de fruto fresco^[9]

Componente	Rango de concentración
β-caroteno (pro-vitamina A)	370-750 iu
α-tocoferol (vitamina E)	1.6-2.4 iu
Ácido ascórbico (vitamina C)	1.6-30 mg
Biotina	3.2-10 µg
Colina	17-22 mg
Niacina	30-62 µg
Ácido pantoténico	1.4-3.5 mg
Piridoxina (vitamina B6)	0.22-0.62 mg
Tiamina (vitamina B1)	60-240 µg
Fósforo	20-80 mg
Potasio	340-723 mg
Calcio	10-15 mg
Magnesio	40-60 mg
Hierro	0.5-2.0 mg
Boro	1.0-3.0 mg

Tabla 1.2. Composición nutricional de aguacate por cada 100g de fruto fresco^[9]

Agua	73.6 g
Energía	171.0 kcal
Proteína	2.2 g
Lípidos	17.0 g
Carbohidratos	6.0 g
Fibra dietética	1.5 g

1.1.5. COMERCIALIZACIÓN DEL AGUACATE

Según la FAO, la producción mundial de aguacate incrementó cuatro veces en el transcurso de las últimas cuatro décadas. Entre los principales países consumidores se encuentran México, los Estados Unidos, la Unión Europea, Brasil, Indonesia y Colombia. Así en la última década, el consumo total mundial ha aumentado en un 30% debido a la expansión de mercados emergentes como Brasil, Colombia, China y Chile, y al incremento de exportaciones de países como México, Chile, Ecuador, Perú y Sudáfrica^[10].

En Ecuador las zonas de mayor producción aguacatera son Guayllabamba, Atuntaqui y el Chota, dándose el “boom” en el año 2002. Las principales variedades cultivadas son la Fuerte, la Hass y la Guatemalteca. Así, en 2005 se alcanzó una producción de 20 858 toneladas que aumentó a 30 000 el año siguiente. Entre enero y agosto de 2007, se exportaron USD 251 470 en aguacate, siendo el principal destino Colombia, y en menor proporción los EE. UU., España e Italia. Pero aún el consumidor de mayor volumen de aguacate ecuatoriano sigue siendo el comercio local, abarcando el 90% del mismo en Quito, Guayaquil y Cuenca^[11].

1.2. L-CARNITINA

1.2.1. DESCRIPCIÓN

Fue descubierta en 1905 por dos científicos rusos, que le dieron su nombre derivado del latín *caro*, *caronis* que significa carne. Hasta 1940 era simplemente considerada como un constituyente de los músculos esqueléticos, pero Fraenkel descubrió que era un factor de crecimiento importante para el gusano *Tenebrio molitor*, tomando el nombre de vitamina B_T. Quince años después se establecieron sus funciones biológicas en la β-oxidación de las grasas, y en 1973 fue cuando se describió su importancia nutricional y deficiencia en pacientes^[12].

La carnitina (butirato de 3-hidroxi-4-N-trimetilamonio) es un aminoácido trimetilado con una estructura similar a la colina que posee dos estereoisómeros. Así, su forma levo, que se muestra en la Figura 1.3, es la estructura activa biológicamente, mientras que la forma dextro es inactiva, y puede inhibir su acción. Su forma levo está posiblemente presente en todas las especies animales, numerosos microorganismos y plantas. En los mamíferos su equilibrio es mantenido por la síntesis endógena, absorción de fuentes alimenticias y reabsorción renal^[13].

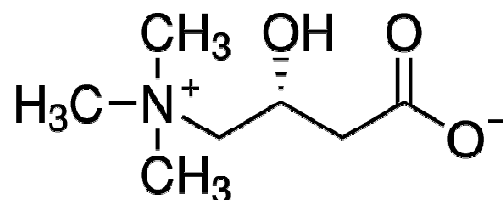


Figura 1.3. Fórmula estructural de la L-carnitina

Es un sólido cristalino higroscópico con un punto de fusión de 197°C (descomposición). Es altamente soluble en agua, etanol y alcoholes de bajo peso molecular. Con una rotación específica de $[\alpha]_D^{22} = -23.5^\circ$, es altamente estable bajo la acción de ácidos mientras que puede ser lentamente inactivada al someterla a reflujo con bases fuertes^[14].

1.2.2. ROL BIOLÓGICO^[13]

La L-carnitina es un metabolito importante en procesos metabólicos intermedios. Así, la principal función de ésta es el transporte de ácidos grasos activados desde el citosol celular a la matriz mitocondrial donde se produce la β -oxidación de las grasas como se puede observar en la Figura 1.4.

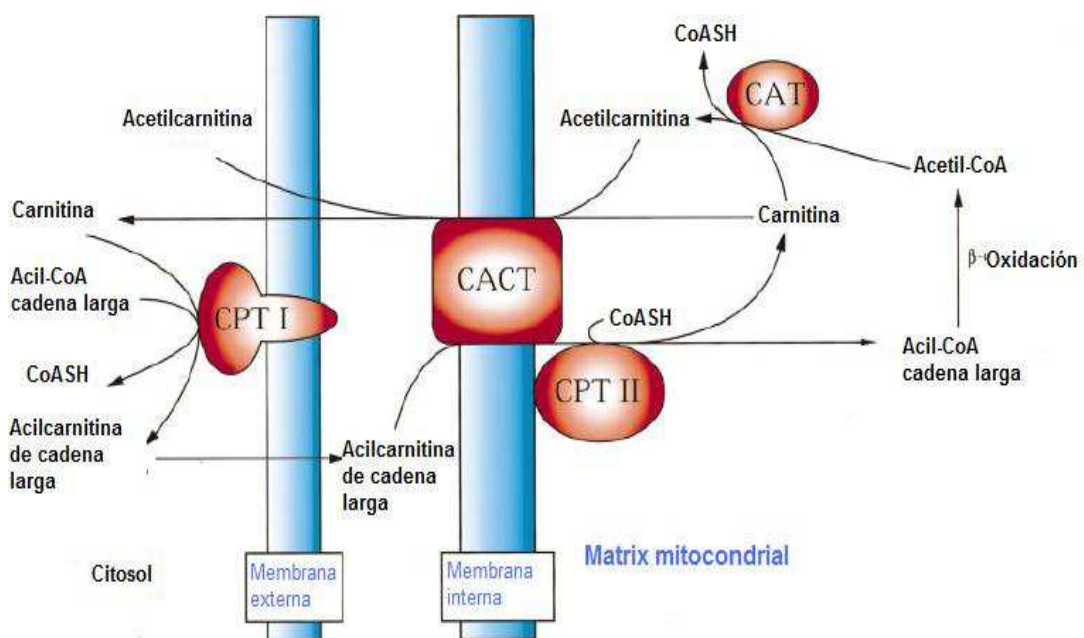


Figura 1.4. Funcionamiento de la L-carnitina en el transporte de ácidos grasos y regulación de la relación intramitocondrial de acil-CoenzimaA/CoenzimaA^[14]

Este mecanismo funciona cuando los ésteres de la coenzima A (CoA) de los ácidos grasos del citosol se transesterifican con la L-carnitina con la ayuda de la carnitina palmitotransferasa (CPT I). Aquí, el grupo acil del ácido graso se transfiere desde la CoA al grupo hidroxilo de la L-carnitina, las resultantes acilcarnitinas atraviesan la membrana interna mitocondrial con el transportador, carnitina-acilcarnitina traslocasa (CACT). Dentro de la matriz mitocondrial, se da la transesterificación catalizada por la carnitina palmitotransferasa II (CPT II) de los ácidos grasos con la CoA intramitocondrial. Así, se produce la liberación de la carnitina que deja la matriz vía CACT para continuar su función. En este proceso, otra función primordial de la carnitina se produce, la regulación de CoA libre y acil-coenzima A (acil-CoA). En la matriz, la carnitina acetiltransferasa (CAT) puede reconvertir las acil-CoAs de cadena corta y larga en acilcarnitinas usando la carnitina mitocondrial, por lo que estas acilcarnitinas pueden emerger de la mitocondria vía CACT.

1.2.3. BIOSÍNTESIS ^[13]

La L-carnitina es sintetizada a partir de los aminoácidos lisina y metionina, donde la lisina provee del esqueleto de carbono mientras que la lisina de los grupos 4-N-metil. Algunas proteínas tienen residuos de N⁶-trimetil-lisina (TML), que por medio de la catálisis de su metilación con metiltransferasas, se metilan usando el S-adenosilmetionina como donador, produciendo nuevas estructuras proteicas.

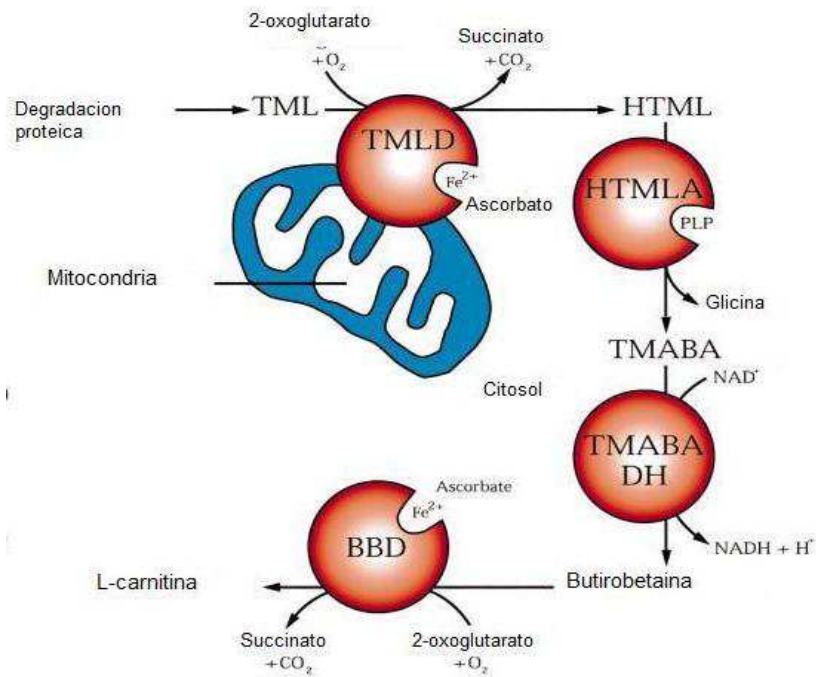


Figura 1.6. Biosíntesis de la L-Carnitina^[13]

1.2.4. FUENTES ALIMENTICIAS^[3]

La ingesta diaria recomendada de L-carnitina es de 0.3-1.9 mg/kg de masa corporal, lo cual puede aumentar dependiendo de las necesidades específicas de cada persona, como son los atletas y mujeres embarazadas. Debido a la cantidad necesaria que debe ser ingerida en el día, su biosíntesis no es suficiente para suplir los requerimientos diarios, pudiéndola encontrar en varios alimentos de fuente animal y vegetal que se presentan en las Tablas 1.3 y 1.4.

Tabla 1.3. Contenido de L-carnitina en 100g/ml de alimento fresco de origen animal^[3]

Productos cárnicos		
	Carnitina (μmol)	Carnitina (mg)
Bistec de carne	401	65.0
Carne de cerdo	130	21.1
Carne de pollo (sin piel)	64	10.4
Pescados y mariscos		
Salmón	36	5.8
Camarón	4	0.7
Atún	9	1.5
Productos lácteos		
Leche entera	62	10.0
Mantequilla	8	1.
Queso mozzarella	2	0.3

Tabla 1.4. Contenido de L-carnitina en 100g de alimento fresco vegetal^[3]

Frutas		
	Carnitina (μmol)	Carnitina (mg)
Mango	5	0.8
Pera	2	0.3
Banana	1	0.2
Vegetales		
Aguacate (sin piel)	50	8.1
Cebolla	4	0.7
Zanahoria	2	0.3
Especies y hierbas		
Cebollín	29	4.7
Menta	5	0.8

1.2.5. DEFICIENCIA

Debido a que la L-carnitina es adquirida mediante biosíntesis y a través de la dieta, existen varios casos en los que su deficiencia existe tanto en niveles sanguíneos como musculares.

La primera fuente de deficiencia es genética por la falla en el sistema de transporte de L-carnitina. La otra se da por ayuno, ejercicio prolongado, obesidad, embarazo, infertilidad masculina, infantes sin suplemento y pacientes de diálisis. Igualmente, personas que consumen dietas bajas en lisina, carnitina, vitamina C y hierro sufren el riesgo de deficiencia^[9]. También, la deficiencia a largo plazo se produce por una disfunción renal crónica o la ingesta de ciertos medicamentos, lo cual puede causar cardiomiopatía, insuficiencia cardíaca congestiva, encefalopatía, hepatomegalia, dificultad en el crecimiento y desarrollo infantil, y desordenes neuromusculares^[15].

A pesar que no se ha confirmado que una dieta vegana u ovolactovegetariana pueda llevar a un estado de deficiencia, es necesario mencionar que la dieta promedio occidental omnívora provee de 2 a 12 μmol por kilogramo de peso por día. Mientras, que personas veganas consumen menos de 0.1 μmol por kilogramo de peso por día. En personas omnívoras, del 70 al 80% de L-carnitina es absorbida, constituyendo de un octavo a la mitad de la cantidad total disponible para el organismo. En personas estrictamente vegetarianas, la síntesis endógena provee más del 90% de L-carnitina disponible^[16].

Cabe recalcar que, de hecho, los niveles de L-carnitina en sangre de personas que no consumen productos animales o derivados son menores que las personas con una dieta carnívora^{[17] [18] [19]}. Aún así, no se demuestran que niveles bajos en sangre sean un riesgo para la salud^[18], ya que la síntesis endógena recompensa estos bajos niveles. Por el contrario, una dieta escasa en metionina, lisina y hierro, produce una deficiencia de L-carnitina, ya que son parte de la síntesis endógena^[19]. Personas en dietas vegetarianas ingieren una cantidad insuficiente de estos aminoácidos, minerales y L-carnitina, por lo

que es necesario el consumo de alimentos ricos en éstos o suplementos, además de la ingesta de vitamina C y niacina que también son nutrientes requeridos para su biosíntesis.

1.2.6. BENEFICIOS PARA LA SALUD COMO SUPLEMENTO ALIMENTICIO^[15]

Se usa para el tratamiento de la anorexia nerviosa ya que promueve la ganancia de peso, normaliza la función gastrintestinal, disminuye la fatiga y aumenta la resistencia física. Además, mejora el rendimiento físico porque aumenta la velocidad al correr, disminución del consumo de oxígeno y ritmo cardíaco durante el entrenamiento y lactato en sangre al consumirla una hora antes del ejercicio. Por otra parte, en pacientes que sufren de fatiga causada por cáncer, el suplemento de su dieta con L-carnitina produce la supresión de la fatiga, depresión, y la mejora de la calidad del sueño. Además, ayuda a la disminución de síntomas en los pacientes que sufren de síndrome de fatiga crónica.

En pacientes con angina, isquemia o insuficiencia cardíaca, mejora el funcionamiento cardiovascular y los parámetros hemodinámicos. Incrementa la esperanza de vida en personas con cardiomiopatía, y disminuye los niveles de lípidos y lipoproteínas. Infusiones diarias de L-carnitina en pacientes que padecen de VIH aumentan el conteo de anticuerpos CD4. Mientras que en pacientes con SIDA produce una mejora en su sistema inmunológico.

Adicionalmente, se ha encontrado que la L-carnitina es un antagonista de la hormona tiroidea disminuyendo los efectos del hipertiroidismo. La ingesta diaria oral resulta en la

mejora del conteo de espermatozoides, calidad y movilidad de los mismos. Además, mitiga los desordenes asociados con la deficiencia renal como anemia, disfunción cardíaca, resistencia a la insulina, anormalidad lipídica y estrés oxidativo.

A pesar de que existen alimentos y bebidas enriquecidos con L-carnitina, debido, principalmente a las propiedades adelgazantes que se le atribuyen, no existen estudios que lo afirmen. Se ha demostrado que reduce los niveles de lípidos en sangre y tejidos, además de promover la utilización de estos, mas no se ha podido comprobar si existe una relación directa de esto con la pérdida de masa corporal.

1.2.7. TOXICIDAD

La mezcla racémica (D,L-carnitina) debe ser evitada ya que la D-carnitina es biológicamente inactiva y puede interferir con el correcto funcionamiento del levo isómero. Su consumo está relacionada con síntomas parecidos a la miastenia que es una enfermedad que se caracteriza por la extrema debilidad muscular debido a un desorden genético autoinmune^[20]. Por otra parte, la L-carnitina es extremadamente inofensiva y segura, sólo se han reportado casos de diarrea leve en dosis diarias extremadamente altas de 1-15 gramos de ésta^[13].

1.2.8. LA L-CARNITINA Y EL AGUACATE

El rol de la L-carnitina en el metabolismo vegetal es el transporte de grupos acilos entre organelos celulares, y la entrada de ácidos grasos de cadena larga hacia los sitios de β -oxidación mitocondriales^[21]. Centrando, así, varios estudios sobre el papel que juega en el metabolismo del aguacate. Uno de ellos estableció que a más del sistema del ciclo del ácido glioxílico en los glioxomas para la β -oxidación de grasas, existe el sistema L-carnitina en la mitocondria. Evidencia de este mecanismo es el cofactor necesario para la oxidación del palmitato, donde la L-carnitina provee del estímulo para la oxidación de los ácidos grasos^[22]. Adicionalmente, se ha detallado que la β -oxidación de los ácidos grasos en el aguacate se produce en dos lugares: en el microcuerpo y en la mitocondria. Concluyendo, que el microcuerpo carece de carnitina acetiltransferasas por lo que este proceso sólo requiere de L-carnitina para el transporte de ácidos grasos largos desde los cloroplastos como acilcarnitinas hacia la mitocondria para ser oxidados^[23].

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. TÉCNICAS ANALÍTICAS^[24,25]

Varias técnicas analíticas fueron usadas para la determinación de L-carnitina en aguacate. Se separó la misma del aguacate por medio de una extracción con solventes, seguido de esto se procedió a su purificación mediante cromatografía de columna de intercambio iónico, para finalmente cuantificarla al formar un complejo coloreado por derivatización con azul de bromofenol que se midió por espectrofotometría UV/VIS. Por su parte, para la medición de la cinética de reacción de su acetilación se escogió la espectrofotometría de infrarrojos con transformadas de Fourier. Las técnicas fueron seleccionados de acuerdo a la disponibilidad de equipos, materiales y reactivos para el estudio.

2.1.1. EXTRACCIÓN CON SOLVENTES

Se basa en la preferencia que posee un analito de solubilizarse en una de dos fases inmiscibles. Éste fenómeno de equilibrio está determinado por la *Ley de Distribución*. El reparto del soluto, generalmente, se produce entre una fase acuosa y otra orgánica, $A_{ac} \Leftrightarrow A_{org}$. Donde los subíndices se refieren a las fases acuosa y orgánica respectivamente. La relación de las actividades para el soluto A, que se muestra en la Ecuación 2.1, en las dos fases debe ser constante e independiente de la cantidad total de A, a cualquier temperatura dada. En donde α_A son las actividades de A en cada una de las

fases y los términos entre corchetes son las concentraciones molares de A. Así, la constante de equilibrio, K , se conoce como *constante de distribución*. Las concentraciones molares se pueden sustituir por actividades molares sin introducir errores importantes.

$$K = \frac{(\alpha_A)_{org}}{(\alpha_A)_{ac}} \approx \frac{[A]_{org}}{[A]_{ac}} \quad (2.1)$$

2.1.2. CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA DE INTERCAMBIO IÓNICO

La cromatografía es un método que permite separar diferentes componentes de una muestra dependiendo del equilibrio de repartición entre dos fases inmiscibles: la móvil y la estacionaria. El elemento esencial de la cromatografía de columna es un sólido poroso que se encuentra dentro de una columna. El sólido (matriz) permite el paso de la fase móvil a través de ésta, que resultará en la separación de los componentes de la muestra.

La cromatografía de columna de intercambio iónico permite la separación de iones y compuestos polares. La fase estacionaria es un polímero sintético que posee grupos enlazantes cargados que permite una interacción bipolar con los diferentes analitos de la muestra. Los que contiene grupos aniónicos enlazantes se denominan *intercambiadores catiónicos*, mientras que los que tiene grupos catiónicos, *intercambiadores aniónicos*.

2.1.3. ESPECTROFOTOMETRÍA UV/VIS

El rango del espectro electromagnético que comprende entre los 200 y 400 nm se denomina región ultravioleta (UV) y la región entre los 400-800 nm, región visible. Son regiones en donde la radiación es la suficiente para excitar los electrones de valencia de los átomos de ciertas moléculas. Aquí se da la interacción de los fotones de la fuente de luz con los iones o moléculas de una muestra. Cuando una molécula absorbe un fotón de la región del UV/VIS, la energía correspondiente es capturada por uno o más electrones de los electrones de valencia. Como consecuencia se produce un cambio en su energía electrónica (E_{elec}), rotacional (E_{rot}) y vibracional (E_{vib}) (Ecuación 2.2). Al modificar la E_{elec} , se alteran tanto E_{rot} como E_{vib} dando como resultado transiciones electrónicas.

$$\Delta E = E_{rot} + E_{vib} + E_{elec} \quad (2.2)$$

Los instrumentos que se usan para su medición se denominan espectrofotómetros. Los cuales colectan datos a lo largo de un determinado rango de longitudes de onda para generar el espectro del compuesto que está bajo análisis como un gráfico que representa, ya sea su transmitancia o absorbancia en función de la longitud de onda.

La transmitancia es la medida de la atenuación del rayo de luz monocromática basada en la comparación entre las intensidad de la luz transmitida (I) y el rayo incidente (I_0). Puede ser expresada como fracción o porcentaje al multiplicar la relación por cien, o igualmente como absorbancia al calcular el logaritmo negativo en base diez de la misma.

2.1.4. ANÁLISIS CUANTITATIVO

Se relaciona las mediciones en el espectro electromagnético con la concentración de un analito en una muestra mediante la *Ley de Lambert-Beer* (Ecuación 2.3), que bajo ciertas condiciones relaciona la absorción de la luz con la concentración de un compuesto en solución.

$$A = \varepsilon_A l C \quad (2.3)$$

Así, la absorbancia es proporcional a la longitud del camino óptico l (cm), la concentración molar C (mol L^{-1}) y el coeficiente de absortividad molar ε_A ($\text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a una determinada longitud de onda (λ).

2.1.5. ESPECTROFOTOMETRÍA INFRARROJA (IR)

La radiación electromagnética entre los 1 y 1000 μm se denomina región del infrarrojo y es usada ampliamente para la identificación y cuantificación de compuestos. Está subdividida en tres regiones: IR-cercano (1-2.5 μm), IR- medio (2.5-25 μm) e IR-lejano (25-1000 μm). Siendo la de mayor importancia la del IR- medio, ya que provee información estructural. En esta región se produce una interacción de la radiación con los enlaces del compuesto. Esta absorción varía de acuerdo a la longitud de onda y es presentada en forma de un espectro, donde se gráfica la transmitancia o absorbancia versus el número de onda (inverso de la longitud de onda expresada en cm^{-1}).

Cuando un enlace asimétrico es irradiado con luz monocromática cuya frecuencia es la misma que la del dipolo formado, se producen vibraciones moleculares. Existen dos tipos de vibraciones moleculares: de estiramiento y de deformación o flexión que se ilustran en la Figura 2.1.



Figura 2.1. Representación de las vibraciones moleculares por la interacción con energía infrarroja^[26]

Las deformaciones de estiramiento cambian la distancia entre los átomos sin cambiar su posición en el plano, mientras que las de deformación producen un cambio en el ángulo y la posición en el plano.

2.1.6. INSTRUMENTACIÓN

Un espectrofotómetro tiene cuatro componentes fundamentales: fuente, sistema monocromador, compartimiento de muestra y detector el cual está graficado en el Diagrama 2.1. La fuente de luz para el rango UV/VIS es una lámpara de arco de xenón que abarca desde los 200 a los 1100 nm; para el UV, una de deuterio y para la región del VIS, una lámpara incandescente con un filamento de tungsteno. Seguido una rejilla cóncava o

plana llamada monocromador, el cual permite la selección de una determinada longitud de onda. Por último, se encuentra el detector que convierte la intensidad de la luz en una señal eléctrica. Éste puede ser un fototubomultiplicador o un semiconductor (fotodiodos de silicio o arreglo de diodos).



Diagrama 2.1. Diagrama de bloques de los componentes fundamentales de un espectrofotómetro UV/VIS

La fuente que corresponde a la región del IR-medio es una lámpara de filamento incandescente, una mezcla de óxidos de zircono o de tierras raras (fuente de Nernst), o un filamento de carburo de silicio (fuente Globar). Dependiendo del tipo de sistema para la selección de la longitud de onda, se pueden distinguir dos tipos de espectrofotómetros de infrarrojo: dispersivos y de transformadas de Fourier (FTIR). Los primeros poseen una serie de espejos que permiten direccionar la luz hacia una rejilla de difracción que selecciona la longitud de onda. Los otros tienen un interferómetro de Michelson que posee un espejo móvil, un espejo fijo y un divisor de haz. La información recolectada está representada como un interferograma y es convertida a un espectro mediante el uso de la función matemática de transformadas de Fourier. En el Diagrama 2.2. se observa el diagrama de bloques correspondiente a un espectrofotómetro FTIR.



Figura 2.2. Diagrama de bloques de los componentes fundamentales de un espectrofotómetro FTIR

Los detectores en IR son sensores que permiten medir los cambios en temperatura del material que absorbe la radiación electromagnética, como termistores, termocuplas, y termopilas. Actualmente, para espectrofotómetros FTIR, se usan sensores piroeléctricos que poseen un cristal de sulfato de triglicina deuterado o tantalato de litio entre dos electrodos. También se usan fotodiodos y un arreglo de diodos que poseen un semiconductor.

2.1.7. INTERPRETACIÓN DE ESPECTROS IR

Para identificar un compuesto por medio de su espectro infrarrojo hay que tomar en cuenta el número, intensidad, forma y posición de los picos. Es un estudio sistemático donde se identifican sus grupos funcionales con la ayuda de un gráfico de correlación o una tabla, donde se encuentran las frecuencias de vibración para cada grupo funcional. Se debe tomar en cuenta que debido a la geometría de la molécula, estos picos se desplazan o pueden dar lugar a sobretonos. Los sobretonos son réplicas de un pico que se ubica al doble de frecuencia de la vibración fundamental. La zona de mayor aplicación para la identificación de un compuesto es la denominada huella digital ($1400-600\text{ cm}^{-1}$), la cual es única para cada compuesto.

2.1.8. MEDICIÓN DE LA CINÉTICA DE REACCIÓN MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA DE INFRARROJOS^[27,28]

La cinética química es el estudio de las velocidades de reacción mediante la demostración de cómo éstas pueden ser medidas e interpretadas. Para la determinación de la velocidad de reacción es necesario monitorear la variación de la concentración de productos o reactivos en relación al tiempo. La espectrofotometría permite medir la formación de un producto o la disminución de un reactivo mediante la asociación de la radiación absorbida o emitida con la concentración de los mismos. Con el uso de la espectrofotometría FTIR se puede medir un pico característico del compuesto a estudiarse en relación a cómo un pico característico de éste aumenta (producto) o disminuye (reactivo) su área o altura con el tiempo. La relación se la realiza mediante la Ley de Beer-Lambert que permite determinar la concentración dependiendo de la cantidad de luz absorbida.

Así, la velocidad de reacción puede ser reportada dependiendo del producto o reactivo que sea monitoreado. Al considerar la reacción:



La velocidad de reacción (v) se describe como:

$$v = -\frac{1}{a} \frac{\Delta[A]}{\Delta t} = -\frac{1}{b} \frac{\Delta[B]}{\Delta t} = \frac{1}{c} \frac{\Delta[C]}{\Delta t} = \frac{1}{d} \frac{\Delta[D]}{\Delta t} \quad (2.5)$$

La velocidad de reacción es proporcional a la concentración de los reactivos elevada a una potencia, por ejemplo para la Ecuación 2.6, la velocidad de reacción es proporcional a la concentración molar de los reactivos A y B:

$$v = k[A]^x[B]^y \quad (2.6)$$

Donde k es la constante de velocidad, la cual es independiente de la concentración pero depende de la temperatura, mientras que x y y son los órdenes de reacción con respecto a esa especie.

Una ecuación de este tipo determinada experimentalmente se denominada: ley de velocidad de la reacción. La ley de velocidad de una reacción es una ecuación que expresa la velocidad de reacción en función de la concentración de todas las especies presentes en la ecuación química total para la reacción:

$$v = f([A], [B], \dots) \quad (2.7)$$

Un método para la determinación experimental de la velocidad de reacción es el de las velocidades iniciales como la Ecuación 2.8, donde se realiza varias corridas variando las concentraciones iniciales de uno de los componentes de la reacción manteniendo las concentraciones de los otros constante. Así, se mide la variación de la concentración de éste con relación al tiempo, determinando la velocidad inicial de ese componente al graficar su concentración molar versus tiempo en los primeros instantes de la reacción.

$$-\frac{1}{a} \frac{\Delta[A]}{\Delta t} = v_0 = k[A]_0^a \quad (2.8)$$

Esta ecuación también puede expresarse en la forma de la Ecuación 2.9. Al graficar las velocidades iniciales versus la concentración inicial del componente se obtendrá el orden de reacción de acuerdo a ese componente de la reacción.

$$\log v_0 = a \log[A]_0 + \log k \quad (2.9)$$

Por su parte, para la obtención de las velocidades iniciales, uno de los métodos usados para su determinación es el de aislamiento donde uno de los reactivos se encuentra en un gran exceso con respecto a los demás, por lo que la variación en su concentración no variará grandemente, manteniéndose relativamente constante.

2.2. TÉCNICAS COMPUTACIONALES

2.2.1. INTRODUCCIÓN A LA QUÍMICA COMPUTACIONAL

Es una rama de la química que usa los principios de la química cuántica para calcular propiedades moleculares, sus cambios, y simular sistemas macromoleculares con el uso de un software computacional. Utiliza métodos matemáticos usados por programas computacionales para el cálculo de propiedades. Complementa la información obtenida experimentalmente, además de predecir fenómenos químicos que no han podido ser antes observados^[28].

2.2.2. MÉTODOS COMPUTACIONALES

Los métodos teóricos proveen soluciones a problemas químicos reales donde se escoge el nivel teórico del método adecuado. Así, se inicia por los más simples que son los empíricos y semiempíricos, usados para sistemas demasiado grandes para ser tratados por métodos *ab initio*. Tienen sus bases en el método Hartree-Fock pero realizan aproximaciones e infieren información de datos empíricos, estos son el de Hückel y el extendido de Hückel^[29].

Ab initio viene del latín que significa desde el inicio, ya que comienza con el cálculo de propiedades físicas fundamentales y la interacción entre los electrones y el núcleo. Estos requieren soluciones aproximadas a la ecuación dependiente del tiempo de Schrödinger (Ecuación 2.10).

$$E \psi(\mathbf{r}) = -\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2(\mathbf{r}) \psi(\mathbf{r}) + V(\mathbf{r}) \psi(\mathbf{r}) \quad (2.10)$$

Donde $-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2$ es la energía cinética y m es la masa de la partícula; ∇^2 , el operador de Laplace; $V(r)$, el potencial de energía en la posición r dependiente del tiempo, y $\psi(r)$, la probabilidad de amplitud de una partícula al encontrarse en la posición r .

También existen métodos basados en la Teoría del Funcional de la Densidad que en general son considerados *ab initio* y una alternativa a los métodos basados en funciones de onda. A pesar de esto, la mayoría de funciones son construidas a partir de datos empíricos, por lo que han derivado en métodos híbrido funcionales^[23].

2.2.3. TEORÍA DEL FUNCIONAL DE LA DENSIDAD

La Teoría del Funcional de la Densidad (DFT, Parr) ^[30] es una alternativa a los métodos *ab initio* para la solución de la ecuación de Schrödinger. La energía del estado fundamental de un sistema polielectrónico se expresa a partir de la densidad electrónica, en lugar de la función de onda para calcular la energía. La DFT usa aproximaciones de las fórmulas matemáticas para relacionar la energía con la densidad electrónica. El mayor problema de los métodos basados en la DFT es que pueden producir resultados erróneos, por lo que se usan, principalmente, para sistemas de un cierto tamaño y complejos de metales de transición^[23].

Para un sistema N -electrónico, N (número de electrones) y $v(r)$ (potencial externo) determinan todas las propiedades para un sistema en estado fundamental, ya que $v(r)$ define el marco molecular para una molécula, que junto con el número de electrones, N , establecen las propiedades electrónicas. Según esto el primer teorema de Hohenberg-Kohn dice que “*El potencial externo $v(r)$ está determinado, dentro de una constante trivial aditiva, por la densidad electrónica $\rho(r)$* ”. Así, ρ determina la función de onda Ψ , y todas las propiedades electrónicas del sistema. Por lo tanto, ρ puede determinar N , v , y todas las propiedades del estado basal, por ejemplo, la energía cinética $T[\rho]$, el potencial energético $V[\rho]$ y la energía total $E[\rho]$. Como consecuencia la energía dependiente de v igual a:

$$E_v[\rho] = T[\rho] + V_{ne}[\rho] + V_{ee}[\rho] \quad (2.11)$$

Donde $V_{ne}[\rho]$ es la energía de repulsión núcleo- electrón y $V_{ee}[\rho]$, la energía de repulsión electrón-electrón.

En el segundo teorema de Hohenberg-Kohn se introduce el principio de variación de la energía, el cual establece “Para una densidad $\tilde{\rho}(r)$ donde $\tilde{\rho}(r) \geq 0$ y $\int \tilde{\rho}(r)dr = N$, $E_0 \leq E_v[\tilde{\rho}]$, $E_v[\tilde{\rho}]$ es la energía funcional de la Ecuación 2.11”^[24].

2.2.5. FUNCIONES DE BASE

Son el conjunto de funciones matemáticas a partir de las cuales se construyen las funciones de onda. Son fijadas semiempíricamente por cálculos de calibración en una variedad de moléculas y en secuencia hasta alcanzar la convergencia. Éstas deben dar resultados lo suficientemente buenos para un rango de moléculas con un desarrollo matemático relativamente fácil para que el proceso computacional sea económico y razonable^[31].

En general, son un conjunto de números que estiman numéricamente donde pueden estar ubicados los electrones. J.C. Slater desarrolló algoritmos que facilitaron este cálculo que produjeron la ecuación de Slater (Ecuación 2.12) conocida como la de Orbital Tipo Slater, STO, donde ζ es un exponente que se escoge mediante simples reglas establecidas por Slater dependiendo del número atómico y r es el radio en angstroms. La ecuación STO provee de una solución para encontrar las funciones de base de una molécula, más el cálculo de las mismas es demasiado complejo. Así, S.F. Boys desarrolló un método usando

una combinación de Orbitales de Tipo Gaussiano, GTO, para poder expresar la ecuación STO (Ecuación 2.13.), donde α es el exponente del orbital y r , el radio en angstroms^[31].

$$STO = \frac{\zeta^3}{\pi^{0.50}} e^{(-\zeta r)} \quad (2.12)$$

$$GTO = \frac{2\alpha}{\pi^{0.75}} e^{(-\alpha r^2)} \quad (2.13)$$

2.2.6. OPTIMIZACIÓN DE LA GEOMETRÍA MOLECULAR^[31]

La geometría de una molécula determina sus propiedades químicas y físicas, ésta cuenta con tres factores importantes: el ángulo de enlace, la longitud de enlace y los ángulos dihedros. Se requiere optimizar la geometría molecular, a fin de encontrar el arreglo espacial que sea el más estable, es decir, el de más baja energía. Se debe probar con varias opciones por lo que se calcula la superficie de energía potencial (SEP). La SEP es una relación matemática entre diferentes geometrías moleculares y sus energías de single point (cálculo de energía para una determinada geometría).

2.2.6. APLICACIONES DE LA QUÍMICA COMPUTACIONAL

Debido a la gran versatilidad que la química computacional brinda a la predicción de propiedades físicas y químicas de las sustancias, el campo de su aplicación crece cada día y se ha reafirmado con los grandes avances que produce. Por mencionar algunos, en la

industria farmacéutica y bioquímica, se usa para el diseño de fármacos, análisis y modelamiento de moléculas biológicas. Permite la predicción de la cinética y modelos de reacción, y de la termodinámica de líquidos, sólidos y gases. En investigación, es una poderosa herramienta para realizar estudios teóricos de reactividad de sistemas y conjuntos moleculares, cálculo de índices de reactividad e identificación de las correlaciones entre las estructuras espaciales, y propiedades físicas y químicas.

2.2.7. CONCEPTOS QUÍMICOS^[30]

Por la importancia que la densidad electrónica y el número de electrones juegan en la Teoría del Funcional de Densidad (DFT), es posible establecer conceptos ligados a la estructura y reactividad química como lo son el potencial químico, la dureza y las funciones de Fukui. Antes de establecer las definiciones de estos conceptos, es necesario definir dos términos elementales para el cálculo de los mismo: orbitales HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) y orbitales LUMO (Lowest Unnoccupied Molecular Orbital), los cuales son orbitales de frontera que determinan cómo las moléculas pueden interactuar unas con otras.

2.2.7.1. POTENCIAL QUÍMICO (μ)

Es la medida de la tendencia que poseen los electrones de escapar de un sistema. Así se puede definir como la Ecuación 2.14, que corresponde a la de Milliken para la

electronegatividad pero con signo contrario, donde A es la afinidad electrónica e I el potencial de ionización del sistema.

$$\mu = -\frac{(A+I)}{2} = -\chi_M \quad (2.14)$$

Al seguir la aproximación de Koppmans^[32] nos da como resultado la Ecuación 2.15.

$$-\mu = \chi_M = \frac{(A+I)}{2} = -\frac{\epsilon_{HOMO} + \epsilon_{LUMO}}{2} \quad (2.15)$$

2.2.7.2. DUREZA (η)

Matemáticamente, la dureza se define como la segunda derivada de la energía con respecto al número de electrones a potencial constante ilustrada en la Ecuación 2.16.

$$\eta = \frac{1}{2} \left(\frac{\delta^2 E}{\delta N^2} \right)_v \quad (2.16)$$

La primera derivada de la energía con respecto al número de electrones es igual al potencial químico, μ , obteniéndose la Ecuación 2.17, donde N , el número de electrones y μ , el potencial químico.

$$\eta = \frac{1}{2} \left(\frac{\delta \mu}{\delta N} \right)_v \quad (2.17)$$

Haciendo una aproximación de diferencias finitas nos lleva a la Ecuación 2.18 y omitiendo el factor de un medio hacia la Ecuación 2.19, donde I es el potencial de ionización, A , la afinidad electrónica, y ϵ_{LUMO} y ϵ_{HOMO} , los valores de las energías de los orbitales LUMO y HOMO, respectivamente.

$$\eta = \frac{I-A}{2} \cong \frac{\epsilon_{LUMO}-\epsilon_{HOMO}}{2} \quad (2.18)$$

$$\eta \cong \epsilon_{LUMO} - \epsilon_{HOMO} \quad (2.19)$$

La dureza es considerada como la medida de la resistencia a la transferencia de carga. Al variar el número de electrones en un sistema duro, esto tiene un alto costo energético, por lo que el sistema tendrá poca tendencia a dar o aceptar electrones. Al referirse a la Ecuación 2.19, se puede ver que la dureza no es más que la diferencia entre los orbitales HOMO y LUMO. Una gran diferencia entre estos dos corresponde a sistemas estables y poco reactivos, por el contrario, cuando la diferencia es pequeña, se espera un sistema poco estable y altamente reactivo.

2.2.7.3. FUNCIONES DE FUKUI

Pueden definirse como una medida de la sensibilidad del potencial químico de un sistema ante un cambio en el potencial externo, o de la medida del cambio de la densidad electrónica al aumentar el número de electrones del sistema. Así se obtiene la Ecuación 2.20, donde $f(r)$ es la función de Fukui, $\rho(r)$, la densidad electrónica, y N , el número de

electrones del sistema. Se pueden diferenciar tres tipos de funciones de Fukui: $f^+(r)$ que nos da la región del sistema frente a un ataque nucleofílico), $f^-(r)$, frente a un ataque electrofílico y $f^0(r)$, frente a un ataque radicalario.

$$f(\mathbf{r}) = \left(\frac{\partial \rho(\mathbf{r})}{\delta N} \right)_{\mathbf{v}} \quad (2.20)$$

2.2.8. ÍNDICES DE REACTIVIDAD Y SELECTIVIDAD

Un índice de reactividad es un dato numérico derivado de un modelo mecánico cuántico que permite predecir la reactividad relativa en moléculas diferentes. Se basan en diversas teorías y relacionando varios tipos de reacciones^[34]. Por su parte, los índices de selectividad permiten ubicar los sitios reactivos frente a ataques nucleofílicos, electrofílicos y/o radicalarios.

2.2.8.1. ÍNDICES DE REACTIVIDAD

2.2.8.1.1. ELECTROFILIA GLOBAL (ω)^[35]

El índice de electrofilia global, ω , mide la estabilización en energía cuando un sistema adquiere una carga electrónica adicional, ΔN , del ambiente, y está dada en términos de potencial químico, μ , y dureza química, η , por:

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} \quad (2.21)$$

2.1.8.1.2. NUCLEOFILIA GLOBAL (N)

Uno de los modelos propuestos para el cálculo de la nucleofilia global es empírico, y toma en cuenta un sustrato electrofílico específico. De esa manera, la cantidad de carga transferida está establecida por:

$$N = \frac{1}{2} \frac{(\mu_A - \mu_B)^2}{(\eta_A + \eta_B)^2} \eta_A \quad (2.22)$$

Donde μ_A es el potencial químico del nucleófilo, μ_B , del electrófilo, y η_A y η_B sus durezas, respectivamente^[30].

Desde un enfoque más simple se usa el descriptor del orbital HOMO (Ecuación 2.23).

$$N_{(Nu)} = \epsilon_{HOMO(Nu)}(eV) - \epsilon_{HOMO(TCE)}(eV) \quad (2.23)$$

Donde $\epsilon_{HOMO(Nu)}$ es el valor del orbital HOMO del nucleófilo y $\epsilon_{HOMO(TCE)}$, el valor del orbital HOMO del tetracianoetileno (TCE)^[37].

2.2.8.2. ÍNDICES DE SELECTIVIDAD

2.1.8.2.1. ELECTROFILIA LOCAL (ω_k)^[38]

La máxima electrofilia se localiza en el sitio más blando del sistema. Al usar la relación entre blandura local y la función de Fukui electrofílica, se produce:

$$\omega = \frac{\mu^2}{2} S_k^+ = \frac{\mu^2}{2} S f_k^+ = \omega f_k^+ \quad (2.24)$$

2.1.8.2.2. NUCLEOFILIA LOCAL (N_k)^[36]

Se puede derivar la nucleofila local a un átomo k (Ecuación 2.25), a través de la función nucleofílica de Fukui, f_k^- , y la nucleofilia global, N .

$$N_k = N f_k^- \quad (2.25)$$

2.3. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO


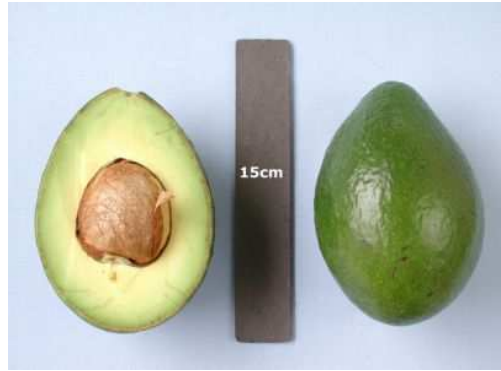
2.3.1. TOMA DE MUESTRA

La toma de muestra significa obtener una pequeña porción de material que tenga una composición que represente el valor y la distribución del analito en el material original.

Ésta debe ser representativa y homogénea. Así, se escoge de manera aleatoria para que todos los miembros de éste tengan la misma probabilidad de ser elegidos. La mano del analista es considerado como el instrumento la cual es la encargada de realizar todos los procedimientos. Adicionalmente, si la muestra tomada es mayor a la necesaria para el análisis en el laboratorio se procederá a obtener una porción representativa y homogénea del material.

- Muestra: Aguacate (*Persea americana*) variedades Fuerte y Booth 8. Las variedades fueron identificadas de acuerdo a sus características morfológicas como peso, color, apariencia y grosor de la cáscara que se muestran en la Tabla 2.1. Adicionalmente, se listan algunas otras características morfológicas.
- Toma de muestra: se recogió un kilogramo de muestra al azar que se mantuvo a 4°C y analizó dentro de las 6 horas después de la recolección ^[3].
- Lugar: Cuatro mercados de Quito: Central, Mayorista, Iñaquito y Santa Clara, y seis supermercados de Quito: Supermaxi de la 12 de Octubre, Megamaxi de la Av. Seis de Diciembre, Santa María de Santa Clara e Iñaquito, Magda Espinoza del Parque el Ejido, Akí del Parque el Ejido.
- Período de la toma de muestras: Se tomaron dos muestras semanales de cada variedad en los diferentes lugares por cinco semanas, recogiendo dos muestras en el mismo lugar en diferentes semanas.
- Número total de muestras: 20 realizadas por triplicado.
- Preparación de las muestras: Para poder extraer la L-carnitina del mesocarpo del aguacate, se procedió a lavar los aguacates, pelarlos, partir su mesocarpio, molerlo y mezclar.

Tabla 2.1. Características morfológicas de las variedades Fuerte y Booth 8

Característica	Fuerte	Booth 8
		
Peso	200-350 g	260-530 g
Cáscara	Verde y de grosor mediano	Verde opaca, gruesa y áspera
Apariencia	Piriforme	Oval alargada
Largo	Alrededor de 12 cm	Alrededor de 15 cm
Tipo de hibridación	Guatemalteco-mejicano	Guatemalteco-antillano
Tipo de flor	B	
Contenido de aceite	24-26%	6-12%
Calidad de la pulpa	Excelente	Aceptable a buena
Información adicional	Es verde tanto al ser cosechado como al madurar, es fácil de pelar.	Cáscara rígida, difícil de pelar.
Árbol	De follaje amplio, muy productivo.	Productivo.
Semilla	Pequeña adherida al epicarpio.	Mediana a grande adherida a la pulpa.

2.3.2. EXTRACCIÓN DE L-CARNITINA DEL AGUACATE

Se pesó aproximadamente 1 g de muestra en un vaso de precipitación de 50 ml en la balanza analítica Mettler Toledo modelo AB204, se agregó 5 ml de etanol al 95% y se agitó. Se filtró y lavó con 2 ml de etanol al 95%, juntándose al extracto anterior. Se añadió 1 ml de hidróxido de bario 0.3N y 1 ml de sulfato de zinc heptahidratado al 5% p/v, se llevó a 10 ml con agua destilada y se centrifugó^[4].

2.3.3. PURIFICACIÓN A TRAVÉS CROMATOGRFÍA DE COLUMNA DE INTERCAMBIO IÓNICO

Se cambió a fase de sodio la resina Amberlite IRC-50^[40]. Se mezcló 25 g de resina con 50 ml de ácido clorhídrico 2N en un matraz de 250 ml, se agitó por una hora, se decantó y se repitió una vez más. Se lavó con 1 l de agua destilada a través de un embudo Buchner, se transfirió la resina lavada al matraz, se mezcló con 125 ml de hidróxido de sodio 2N y se agitó tapado por una hora. Por último, se lavó con agua destilada hasta alcanzar un pH de 8 y se almacenó en una botella. Se empacó 2.5 ml de la resina hidratada en columnas de 1x10 cm de vidrio, se lavó con 12 ml de buffer pH 7 y agua destilada. A 1 ml del sobrenadante resultante de la centrifugación de la extracción de L-carnitina, se agregó 1 ml de buffer pH 7, y se pasó a través de la columna de Amberlite IRC-50 (fase sodio) a razón de un 1 ml/min, se eluyó con 12 ml de agua destilada y se evaporó a sequedad en un baño maría a 80°C^[4].

2.3.4. CUANTIFICACIÓN DE L-CARNITINA POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV/VIS^[4]

A la muestra seca resultante del baño maría, se agregó 10 ml de etanol absoluto y 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado, se agitó en baño maría a 80°C por una hora; seguido de esto se evaporó a sequedad en baño maría a la misma temperatura. Se añadió 1 ml de fosfato ácido de potasio al 60% p/v, se añadió 300 mg de carbonato de sodio anhidro y se agitó. Se agregó 0.5 ml de solución de azul de bromofenol (0.075% p/v en fosfato ácido de potasio al 30% p/v) y dejó reposar por 10 min. Se lavó con 5 ml de dicloroetano (4% v/v alcohol isoamílico) y se agitó tapado rápidamente por 10 min. Se transfirió la fase superior orgánica a la celda espectrofotométrica de vidrio y se leyó su absorbancia a los 602 nm en el espectrofotómetro UV/VIS: Genesys 10 Vis que se ilustra en la Figura 2.2. Por último se determinó su concentración mediante el uso de una curva de calibración realizada con un estándar de L-carnitina.

Para la realización de la curva de calibración se preparó una solución madre en etanol absoluto con un estándar de L-carnitina con una concentración de 10 mg/l. Se diluyó 10 ml de la solución madre a 100 ml con etanol absoluto, obteniéndose una solución con concentración de 1µg/ml. Se agregó 5, 10, 15 y 20 ml de la solución de 1µg/ml en sendos vasos de precipitación de 50 ml, y se procedió como lo descrito para la cuantificación de L-carnitina por espectrofotometría UV/VIS.

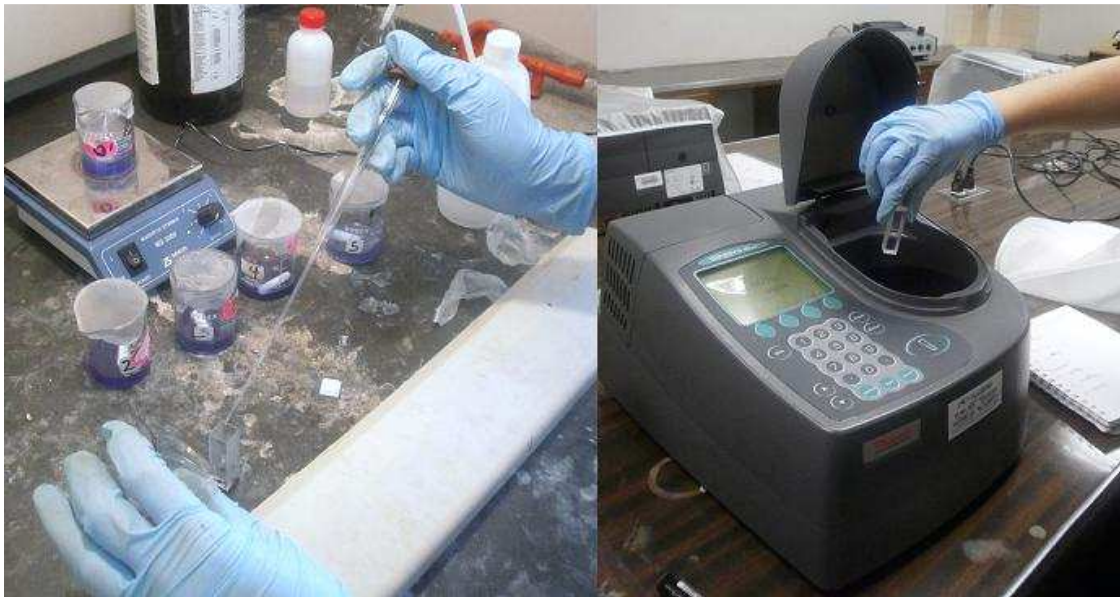


Figura 2.2. Llenado de la celda espectrofotométrica y lectura en el espectrofotómetro UV/VIS

2.3.5. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE ACETILACIÓN DE LA L-CARNITINA

Se usó hidrocloreuro de L-carnitina como reactivo de partida, cloruro de acetilo como agente acilante, y ácido acético como medio de reacción ^[41,42]. Para la determinación de la cinética se aplicó el método de las velocidades iniciales para la deducción de la ley de velocidad donde se midió la disminución de la concentración de los reactivos de acuerdo al tiempo a una temperatura de $298 \pm 2\text{K}$, se controló la temperatura con la ayuda de un baño maría.

Primeramente, se ubicaron los picos característicos de los reactivos que se medirían. Para esto se corrieron espectros del hidrocloreuro de L-carnitina, cloruro de acetilo, hidrocloreuro

de O-acetil-L-carnitina y ácido acético puros, y en solución usando ácido acético como solvente. En la Figura 2.3 se pueden observar los parámetros usados en las corridas.

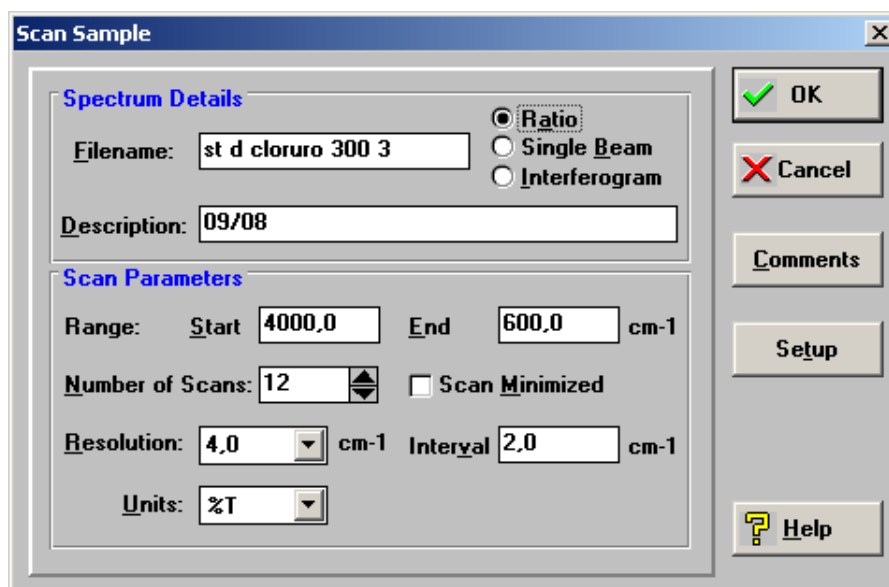


Figura 2.3. Parámetros usados para la corrida de los espectros IR

Determinados los picos específicos para cada sustancia a medirse, se realizaron curvas de calibración para el hidrocloreto de L-carnitina y el cloruro de acetilo en ácido acético. Para la curva de hidrocloreto de L-carnitina se pesaron 40, 60, 80 y 100 mg de hidrocloreto de L-carnitina, se aforaron a 100 ml con ácido acético glacial y se leyeron sus espectros en el espectro FTIR. Mientras que para la curva del cloruro de acetilo se midieron 10, 20,30 y 40 ml de cloruro de acetilo y se aforaron a 100 ml con ácido acético glacial y se leyeron sus espectros en el espectrofotómetro FTIR.

Posteriormente, se realizaron varias soluciones en ácido acético glacial en matraces de 100 ml, donde uno de los reactivos estaba en exceso y con una concentración constante, siguiendo el método de aislamiento para la determinación de la velocidad inicial. Por su

parte, para la determinación de la ley de velocidad se usó el método de las velocidades iniciales donde se usaron varias concentraciones de los reactivos usados. Las concentraciones para el hidrocloreuro de L-carnitina a una concentración constante de cloruro de acetilo de 2.81 M se muestran en la Tabla 2.2, mientras que las de cloruro de acetilo se encuentran en la Tabla 2.3, para una concentración constante de hidrocloreuro de L-carnitina de 1.0 M.

Tabla 2.2. Concentraciones de hidrocloreuro de L-carnitina para una concentración constante de cloruro de acetilo de 2.81 M

	Concentración de hidrocloreuro de L-carnitina (M)
1	2.53E-03
2	3.04E-03
3	4.05E-03
4	5.06E-03

Así, la variación en la concentración de los reactivos se midió durante la primera media hora de reacción cada cinco minutos para cada uno de las soluciones realizadas en el espectrofotómetro FTIR.

Tabla 2.3. Concentraciones de cloruro de acetilo para una concentración constante de hidrocloreuro de L-carnitina de 1.0 M.

	Concentración de cloruro de acetilo (M)
1	2.81
2	3.81
3	5.05
4	5.77

Por último, se realizaron los cálculos de las velocidades iniciales, órdenes de reacción para cada reactivo por el método gráfico y, finalmente, el cálculo de la constante de velocidad.

2.3.6. MODELAMIENTO COMPUTACIONAL

Para el estudio se usó el software *Gaussian03*^[43] que se muestra en la Figura 2.4, con el cual se optimizó las geometrías moleculares, calculó las energías de single point y los valores de los orbitales moleculares.

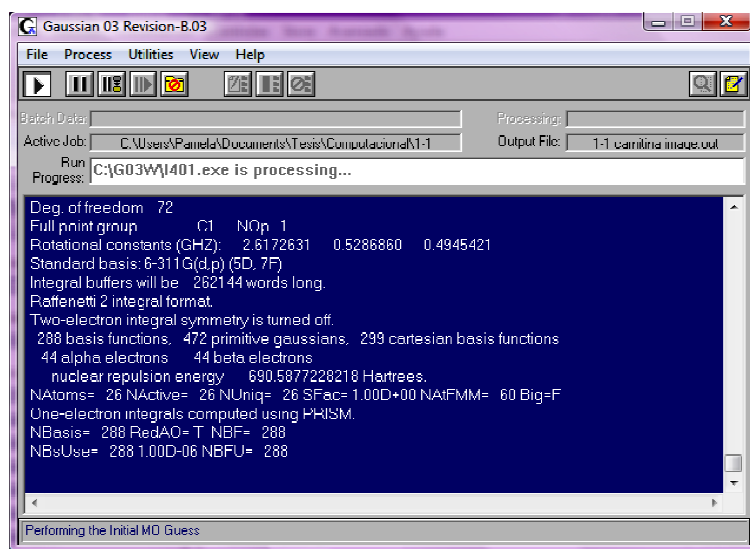


Figura 2.4. Programa *Gaussian03*

Se dibujaron varias posibles estructuras con el programa *GaussView 3.09*, ilustrado en la Figura 2.5, para cada molécula, las cuales se optimizaron haciendo uso del método B3LYP y la base 6-311G**. Luego de su optimización, se escogió la estructura de menor energía.

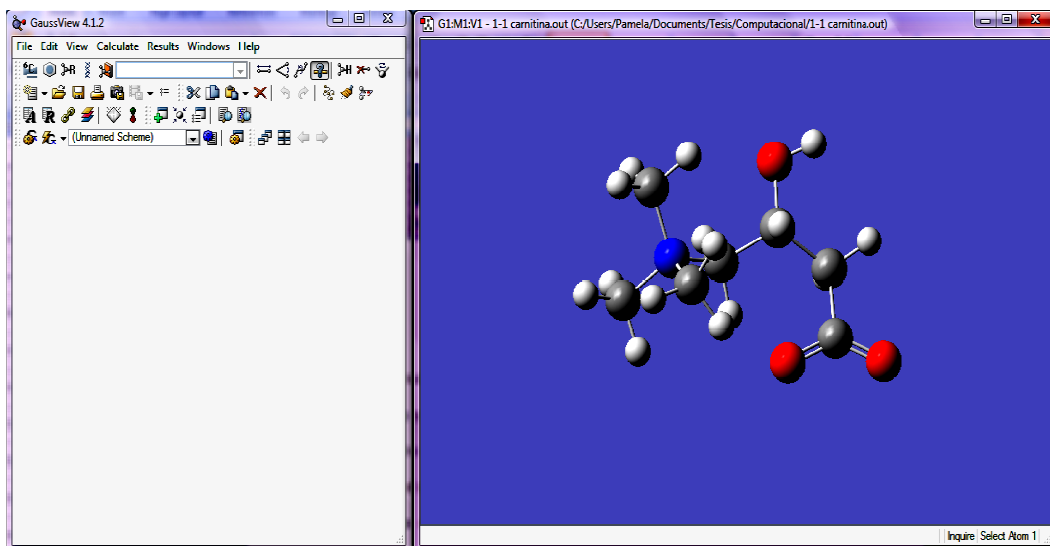


Figura 2.5. Programa Gaussview 3.09

Seguido de esto se realizó el cálculo de energía para las estructuras más estables (energía de Single Point) con la base 6-31G y método HF, para la obtención de los orbitales moleculares. Con los valores de las energías de los orbitales HOMO y LUMO se procedió a calcular la nucleofilia y electrofilia de cada una de los reactivos. Con la estructura optimizada se realizó un Single Point usando el comando # SP IOP(3/31=1) SCF=TIGHT POP=FULL para el cálculo de las funciones de Fukui locales, las cuales permiten el análisis de la regioselectividad de las moléculas al calcular las mismas por los índices globales obtenidos. El mismo procedimiento se realizó para el estudio de la reacción en fase acuosa añadiendo el comando SCRF= (solvent= water).

Finalmente, se buscó el estado de transición para la acetilación de la L-carnitina donde se usó las mismas especificaciones para todas las optimizaciones, donde, además se añadió un cálculo de frecuencias, donde una frecuencia imaginaria produce información sobre si un estado de transición ha sido encontrado, y los key word TS (del inglés Transition State) y CALCFC para el cálculo de las constantes de fuerza. A continuación, se realizó el IRC

(coordenada intrínseca de reacción) que se puede ver en la Figura 2.6 del estado de transición en fase gaseosa y acuosa, el IRC describe el camino entre reactivos y productos, donde se observa la formación y ruptura de enlaces. Adicionalmente, se calculó la energía de activación en fase gaseosa y acuosa con el uso de la Ecuación 2.26.

$$E_a = E_{\text{estado de transición}} - E_{\text{reactivos}} \quad (2.26)$$

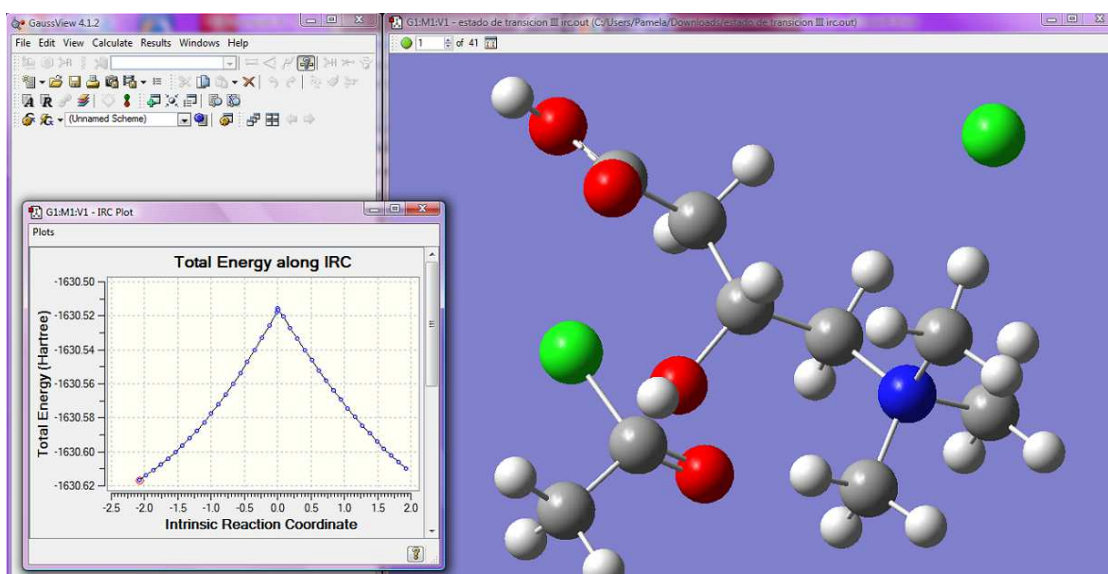


Figura 2.6. IRC del estado de transición para la acetilación de la L-carnitina

2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO^[43]

2.4.1. DISTRIBUCIÓN t DE STUDENT

Permite analizar datos procedentes de análisis donde se desconoce la media estándar poblacional (σ) y el tamaño de muestra es pequeño (menos de 30 observaciones). Al igual

que la distribución z normal, es continua, acampanada y simétrica pero es menos aguda y más extendida. A medida que aumenta el tamaño de la muestra, ésta tiende a parecerse más a la distribución z normal, como se lo puede observar en la Figura 2.7. Así, los valores críticos de t para un nivel de significancia dado son mayores en magnitud que los valores z correspondientes.

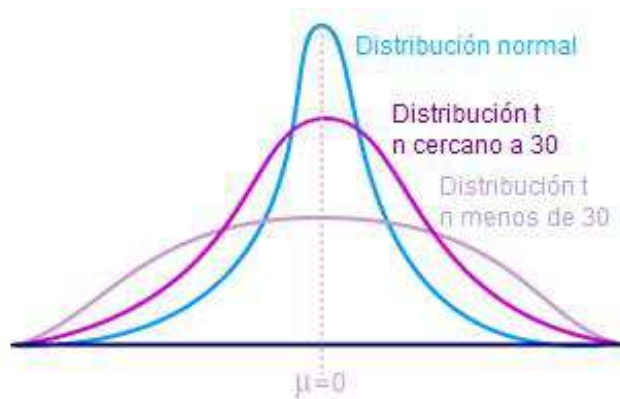


Figura 2.7. Comparación de la distribución z normal con la t de Student^[44]

Permite comparar una media muestral con una media poblacional donde el número de observaciones es menor que 30. Se considera que la población es aproximadamente normal, y se emplea la desviación estándar de la muestra. Obteniéndose:

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{\frac{s}{\sqrt{n}}} \quad (2.27)$$

Donde \bar{x} es la media de la muestra, μ , la media poblacional hipotética, s , la desviación estándar de la muestra y n , el tamaño muestral. Para los valores críticos de t (Anexo 5), se deben localizar en la parte izquierda los grados de libertad, gl , que es la cantidad total de observaciones en la muestra, menos el número de muestras ($n-1$). Además de determinar el

nivel de significancia para “una o dos colas”. Para una cola quiere decir que solo se van a comparar los valores extremos a un lado de la media, es decir a un lado de la distribución. En contraste, para dos colas se utiliza cuando tanto los valores hacia la derecha e izquierda de la media son de interés, en otras palabras, a los dos lados de la distribución.

2.4.2. COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV)

También conocido como desviación estándar relativa, es la razón o cociente de la desviación estándar a la media aritmética expresada como porcentaje. Para una muestra es:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} * 100 \quad (2.28)$$

Donde s es la desviación estándar de la muestra y \bar{x} , la media.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA L-CARNITINA EN AGUACATE (*Persea americana*)

3.1.1. EXTRACCIÓN DE LA L-CARNITINA DEL AGUACATE (*Persea americana*)

La extracción de L-carnitina del mesocarpio del aguacate se la realiza con etanol por la alta solubilidad de la L-carnitina en este solvente. Se vio que no era necesario pretratamientos de secado o extracción de grasa en la muestra. Al contrario, cuando la muestra era secada o sometida a extracción Soxhlet para grasas era imposible obtener un extracto alcohólico del mesocarpio.

Es necesaria la desproteinización del extracto alcohólico para eliminar el alto contenido de histidina (25 mg/100 g de fruto fresco^[8]) al ser una interferencia en la medición espectrofométrica, ya que produce un complejo de la misma intensidad que la L-carnitina lo hace con el azul de bromofenol^[4]. Se desnaturizó la proteína del aguacate al agregar soluciones de hidróxido de bario y sulfato de zinc. Los metales pesados producen un enlace cruzado coordinado entre los grupos aminos libres con los carboxílicos, causando un tipo de desnaturalización, ya que irrumpen los puentes salinos de la proteína y los enlaces disulfuro por la gran afinidad y atracción de estos iones por el azufre. Así, la

proteína del aguacate coagula pudiéndola separar por centrifugación, impidiendo que sea liberada por una hidrólisis posterior.

3.1.2. PURIFICACIÓN CON CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

Además de la histidina, la colina y la betaína son interferencias en la medición espectrofotométrica de la L-carnitina. Para separar la colina de la L-carnitina se usó la resina de intercambio catiónico débilmente ácida Amberlite IRC-50 en su forma de sodio. Esto se da al regular el pH de la columna con un buffer de pH 7, al igual que el extracto alcohólico desproteinizado de aguacate, ya que a este pH se da la adsorción de la L-carnitina en la columna y eliminación de la colina. Al igual que la colina, la betaína se puede separar por medio de la resina Dowex 50. En la práctica no fue necesario su uso, ya que al respetar y mantener el tiempo de adición de los reactivos de derivatización, la betaína no produce un complejo coloreado^[4].

3.1.3. CUANTIFICACIÓN DE L-CARNITINA POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV/VIS

El complejo coloreado formado con el azul de bromofenol (4,4'-(1,1-dióxido-3H-2,1-benzoxatiol-3,3-diil) bis(2,6-dibromofenol)), donde su fórmula estructural se puede observar en la Figura 3.1, usado para la medición colorimétrica de la L-carnitina se

produce cuando ésta se encuentra como sal de amonio cuaternaria^[45]. Por esto, es necesario el tratamiento con ácido clorhídrico para convertirla de amina terciaria a sal.

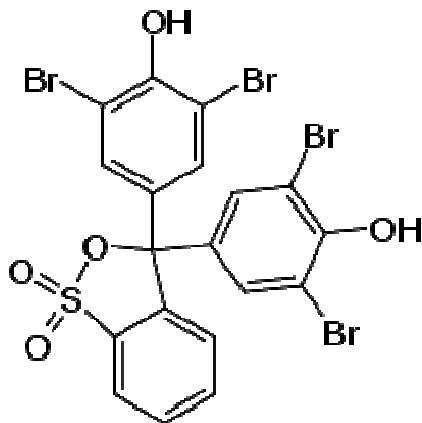
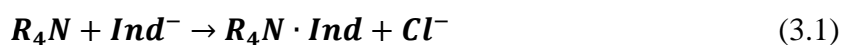
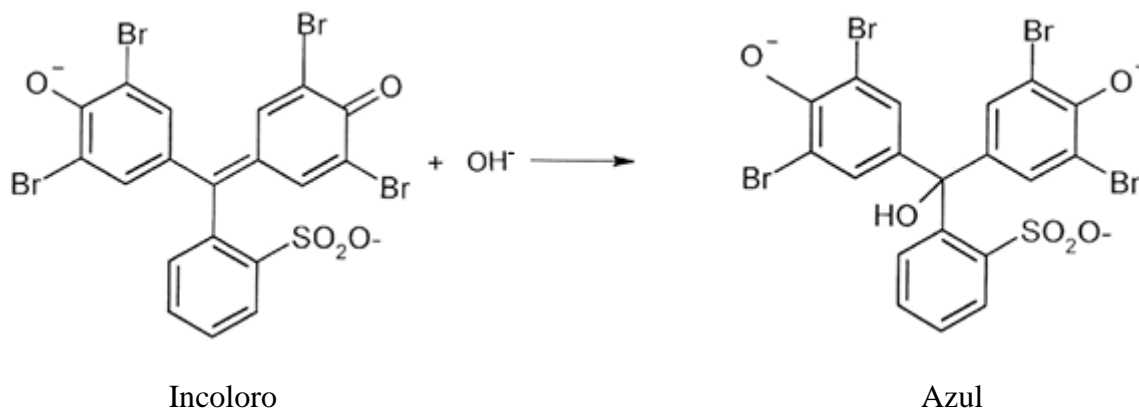


Figura 3.1. Fórmula estructural del azul de bromofenol

En este proceso de derivatización, el azul de bromofenol actúa como un reactivo ácido apareador de iones^[46]. Por su parte, la L-carnitina es una sustancia con mayor densidad electrónica, sustancia nucleofílica, que juntos forman un ion complejo par. La sal de amonio cuaternaria coloreada resultante, en presencia de carbonato de sodio y medio alcalino, es extraíble con un solvente no polar, en este caso, dicloruro de etileno^[47]. En la Ecuación 3.1. se esquematiza la formación del complejo, R_4N representa la L-carnitina e Ind, el azul de bromofenol. El azul de bromofenol se encuentra cargado negativamente^[48], explicando la necesidad de regular el pH en el momento de la adición de los agentes acomplejantes, ya que con pH 4.6 o mayor el indicador pierde iones hidrógenos y se carga negativamente que se ilustra en el Esquema 3.1.





Esquema 3.1. Reacción del azul de bromofenol en medio básico

En la Tabla 3.2 y Tabla 3.3 se muestran los resultados obtenidos espectrofotométricamente de cada muestra realizada por triplicado para cada variedad. La concentración se calculó a través de una curva de calibración que se encuentra en la Figura 3.2, y en la Tabla 3.1, los datos para su construcción, la cual se multiplicó por el factor de dilución de 10.

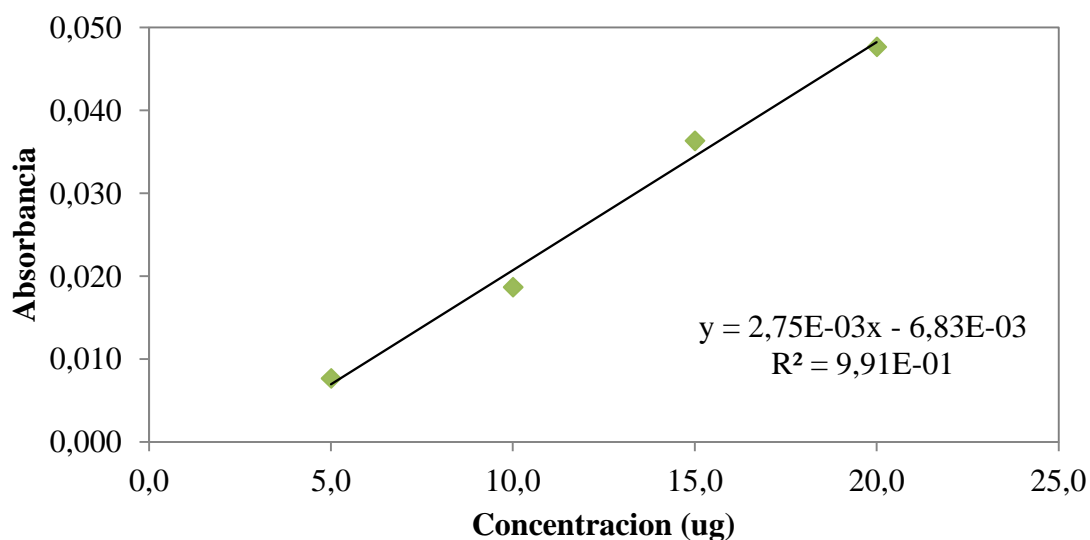


Figura 3.2. Curva de calibración para la determinación de L-carnitina por espectrofotometría UV/VIS

Tabla 3.1. Absorbancias para la construcción de la curva de calibración para la determinación de L-carnitina por espectrofotometría UV/VIS

Concentración (µg)	Absorbancia
5.0	0.008
10.0	0.019
15.0	0.036
20.0	0.048

Tabla 3.2. Cantidad de L-carnitina en 1g de aguacate variedad Fuerte fresco determinado por espectrofotometría UV/VIS

Muestra	Peso (g)	Absorbancia	Media	C(ug)	C(ug/g)
1	1.0217	0.016	0.016	8.4	84
	1.0321	0.014			
	1.0855	0.017			
2	1.0800	0.016	0.015	8.0	80
	1.0107	0.018			
	1.0696	0.012			
3	1.0620	0.015	0.016	8.4	84
	1.0037	0.016			
	1.0086	0.018			
4	1.0094	0.014	0.015	8.0	80
	1.0048	0.015			
	1.0093	0.015			
5	1.0944	0.014	0.016	8.4	84
	1.0171	0.015			
	1.0424	0.020			
6	1.0121	0.015	0.015	8.0	80
	1.0088	0.016			
	1.0083	0.015			
7	1.0042	0.017	0.016	8.4	84
	1.0055	0.016			
	1.0048	0.016			
8	1.0045	0.018	0.016	8.4	84
	1.0075	0.014			
	1.0055	0.017			
9	1.0054	0.017	0.015	8.0	80
	1.0004	0.015			
	1.0070	0.012			
10	1.0820	0.018	0.016	8.4	84
	1.0595	0.014			
	1.0861	0.016			
				\bar{X}	82
				s	1.9
				CV	2.3%

Se determinó una cantidad de 82 µg de L-carnitina/g de fruto fresco Fuerte, y de 84 µg/g para la variedad Booth 8. Se puede explicar el alto contenido de L-carnitina por los elevados niveles de vitamina B₆ y C que son esenciales para la biosíntesis de la L-carnitina. Asimismo, posee un poco mayores de lisina y metionina, que proveen del esqueleto para la síntesis endógena de la L-carnitina.

Tabla 3.3. Cantidad de L-carnitina en 1g de aguacate variedad Booth 8 fresco determinado por espectrofotometría UV/VIS

Muestra	Peso	Absorbancia	Media	C (ug)	C(ug/g)
1	1.0044	0.018	0.016	8.4	84
	1.0027	0.018			
	1.0045	0.011			
2	1.0080	0.018	0.016	8.4	84
	1.0110	0.016			
	1.0035	0.014			
3	1.0042	0.016	0.016	8.4	84
	1.0055	0.014			
	1.0048	0.018			
4	1.0078	0.015	0.017	8.7	87
	1.0030	0.016			
	1.0034	0.019			
5	1.0048	0.016	0.015	8.0	80
	1.0091	0.014			
	1.0415	0.016			
6	1.0347	0.019	0.016	8.4	84
	1.0513	0.013			
	1.0341	0.015			
7	1.0014	0.018	0.017	8.7	87
	1.0031	0.017			
	1.0068	0.017			
8	1.0048	0.016	0.016	8.4	84
	1.0083	0.017			
	1.0434	0.016			
9	1.0045	0.017	0.015	8.0	80
	1.0050	0.015			
	1.0362	0.014			
10	1.0032	0.016	0.016	8.4	84
	1.0125	0.018			
	1.0352	0.014			
				X̄	84
				s	2.4
				CV	2.9%

La precisión fue medida a través del coeficiente de variación (Ecuación 2.28), que permite tener una comparación significativa de los datos con respecto a la precisión de las medidas. Así, se puede comparar la razón entre los errores de las varianzas en dos muestras diferentes. Al analizar los valores de las desviaciones estándares para la determinación de L-carnitina de las dos variedades, se puede apreciar que la correspondiente a la Fuerte es menor, en otras palabras, que la medición fue más precisa que la realizada para Booth 8, ya que exhiben una menor dispersión con respecto a la media.

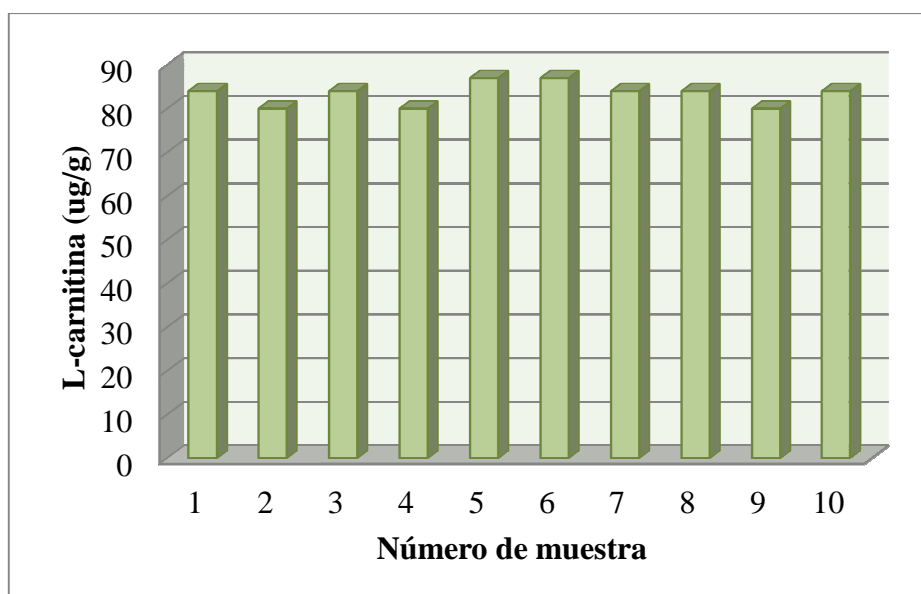


Figura 3.3. Reproducibilidad de los resultados para la variedad Fuerte

La dispersión de los datos se encuentra graficada en las Figuras 3.3 y 3.4. Se puede apreciar que a pesar que las muestras corresponden a la misma variedad y lote de producción, la variación de los resultados se da debido errores aleatorios y sistemáticos. Uno de ellos se da en el momento de la extracción del mesocarpio, la presencia de fibras disminuye la cantidad de mesocarpio extraíble y, por lo tanto la cantidad de L-carnitina medible espectrofotométricamente.

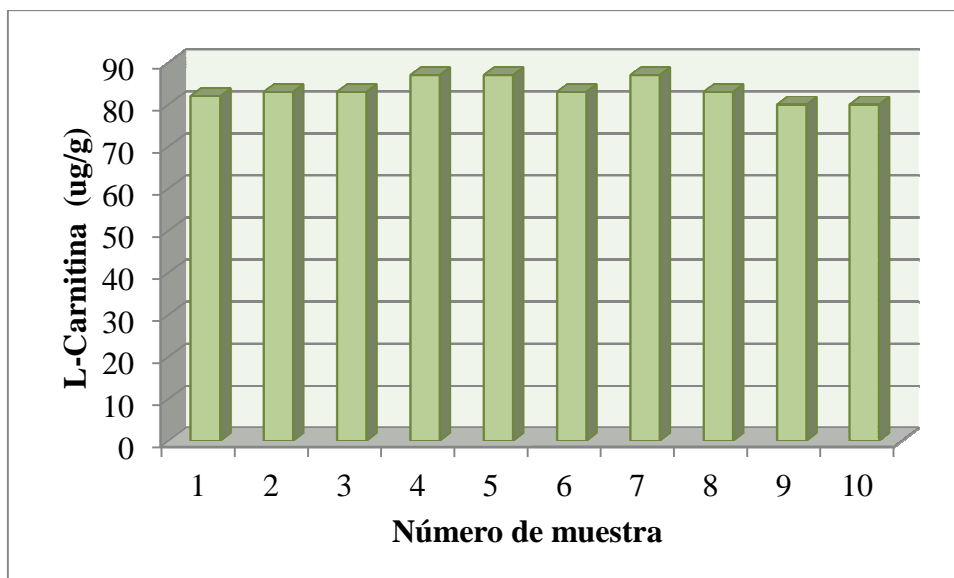


Figura 3.4. Reproducibilidad de las muestras para la variedad Booth 8

Adicionalmente, en el momento de la purificación, pequeñas cantidades de L-carnitina pueden perderse, o a su vez betaína eluirse junto a la L-carnitina, aumentando la absorbancia al formar un complejo de la misma intensidad que la L-carnitina. Además, al momento de extraer el complejo cuaternario con dicloruro de etileno, es necesario cerrar herméticamente. El dicloruro de etileno es un compuesto altamente volátil que por simple agitación se evapora alterando los volúmenes de las dos fases, y por lo tanto el equilibrio para la repartición de la sal entre la fase acuosa y orgánica.

Para el estudio de exactitud del método escogido, se comparó la cantidad de L-carnitina obtenido espectrofotométricamente con un valor teórico obtenido a través de un método radioisotópico (81 $\mu\text{g/g}$), por medio de la prueba t de Student (Ecuación 2.27). Debido a que éste método usa muestra fresca^[3], en contraste con el método enzimático que se reporta en muestra seca (48 $\mu\text{g/g}$ ^[2]). Así, en la Tabla 3.4 se pueden observar los valores promedios para cada variedad analizada y su valor t.

Tabla 3.4. Cantidad de L-carnitina en aguacate fresco y valor t para la variedad

Fuerte y Booth 8

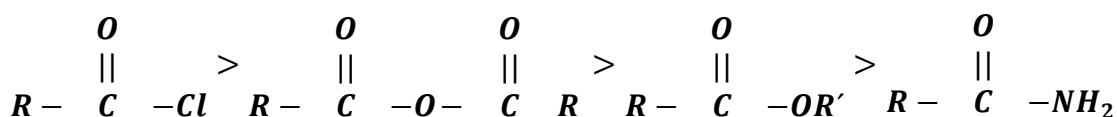
	Fuerte	Booth 8
L-carnitina ($\mu\text{g/g}$)	82	84
Valor t ($\alpha=0.05$)	1.67	3.95

Para $gl=9$ y $\alpha=0.05$ el valor teórico de t corresponde a 1.833 (Anexo 4), por lo tanto al comparar los valores de $t_{\text{experimental}}$ con t_{tabulado} , se puede ver que no hay diferencias significativas para la variedad Fuerte, ya que $t_{\text{experimental}} < t_{\text{tabulado}}$, mientras que para la variedad Booth 8 $t_{\text{experimental}} > t_{\text{tabulado}}$, por lo que hay diferencias significativas. A pesar que esto significa que los dos métodos no son comparables, esta diferencia se puede explicar por el tipo de aguacate utilizado, ya que, así como los aguacates pueden variar su contenido de humedad y grasa por las condiciones de cultivo y variedad, la cantidad de L-carnitina también puede ser un nutriente que varíe por estos mismos factores. Pero el método radioisotópico no especifica que variedad de aguacate usa por lo que sería necesaria la cuantificación con otro método paralelo como HPLC/UV para tener una mayor confiabilidad de los datos obtenidos.

3.2. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE REACCIÓN DE ACETILACIÓN DE LA L-CARNITINA

Una de las dificultades para la acetilación de la L-carnitina es su insolubilidad en solventes adecuados para reacciones de acilación (metanos halogenados o disulfuro de carbono) por lo que requiere siempre de un exceso de agente acilante, en este caso, cloruro de acetilo^[40]

si se usa otro tipo de solventes. Así, debido a la mayor polaridad del ácido acético, es el solvente más adecuado, a pesar de que puede dar lugar a una reacción de esterificación que, generalmente, requiere un catalizador. La reactividad del ácido acético es mucho menor comparada a la del cloruro de acetilo, debido al grupo saliente que posee. En el caso del cloruro de acetilo su grupo saliente es el ión cloruro; éste es excelente ya que es una base extremadamente débil. En el Esquema 3.2 se puede observar la reactividad de los derivados de ácido, encontrando que el más reactivo es el cloruro de acilo. Por su parte, el ácido acético tiene como grupo saliente el ión hidroxilo, una base muy fuerte y por lo tanto un grupo saliente menos adecuado. Igualmente, se ha encontrado experimentalmente que el ácido acético no toma parte en la reacción, por lo que es el solvente más adecuado ^[49].



Esquema 3.2. Reactividad en orden decreciente de derecha a izquierda de los derivados de ácidos carboxílicos

En la Figura 3.5. se puede observar el espectro IR para el ácido acético, se distingue el pico ubicado en los 3037.77 cm^{-1} , que corresponde a la vibración de extensión del O-H. Otra banda importante es la ubicada en los 1730.80 cm^{-1} la cual se produce por el estiramiento del enlace C=O, indicando que es un ácido carboxílico monobásico alifático. Adicionalmente se aprecian otros dos picos importantes: 1407.71 cm^{-1} y 1286.68 cm^{-1} debido al estiramiento C-O.

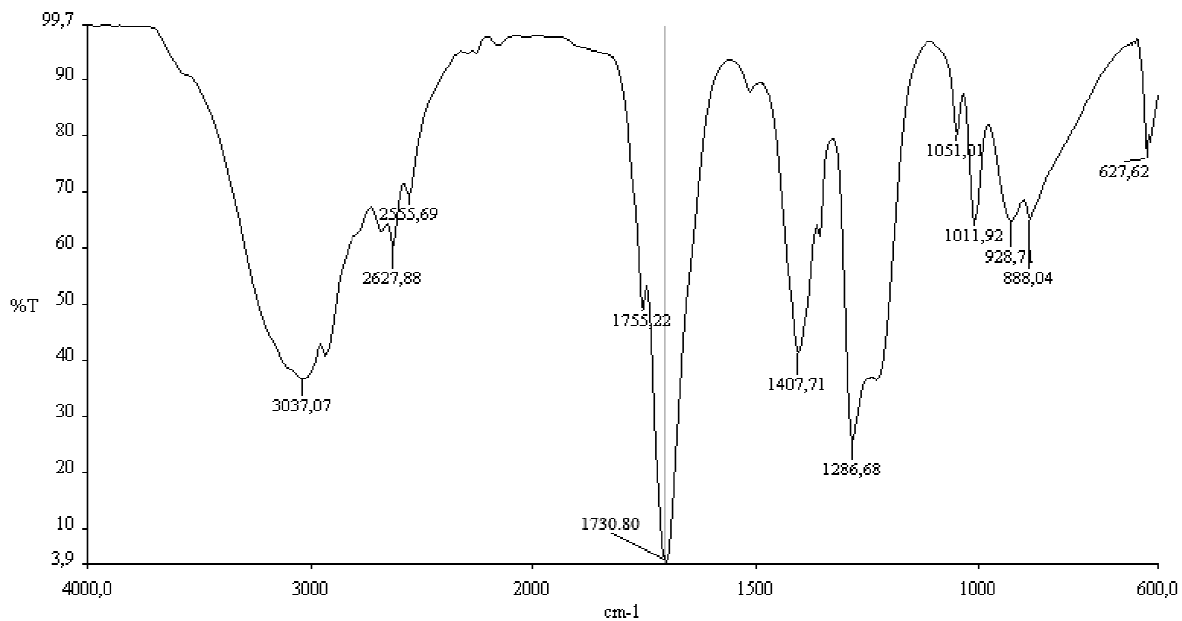


Figura 3.5. Espectro IR del ácido acético

En la Figura 3.6 se presenta el espectro IR del cloruro de acetilo puro, donde se puede ubicar la banda de mayor importancia en 1797.92 cm^{-1} producida por el grupo carbonilo, la cual se desplaza a la región de los 1800 cm^{-1} por la presencia de un átomo halógeno.

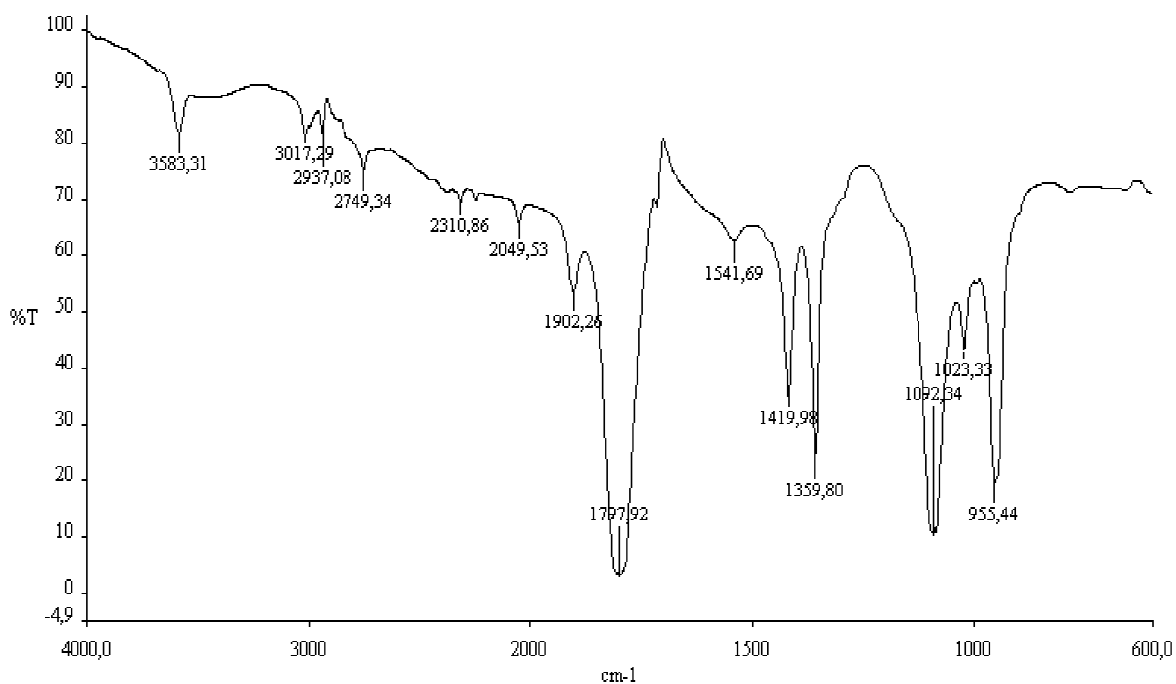


Figura 3.6. Espectro IR del cloruro de acetilo puro

Además, en la Figura 3.7 se muestra el espectro del cloruro de acetilo en solución ácida. Se denota un ligero desplazamiento de la banda del carbono carbonílico del cloruro de acetilo hacia los 1807.02 cm^{-1} , la cual fue la escogida como pico para determinación de la concentración del reactivo al realizar la curva de calibración se presenta a continuación del espectro como la Figura 3.8.

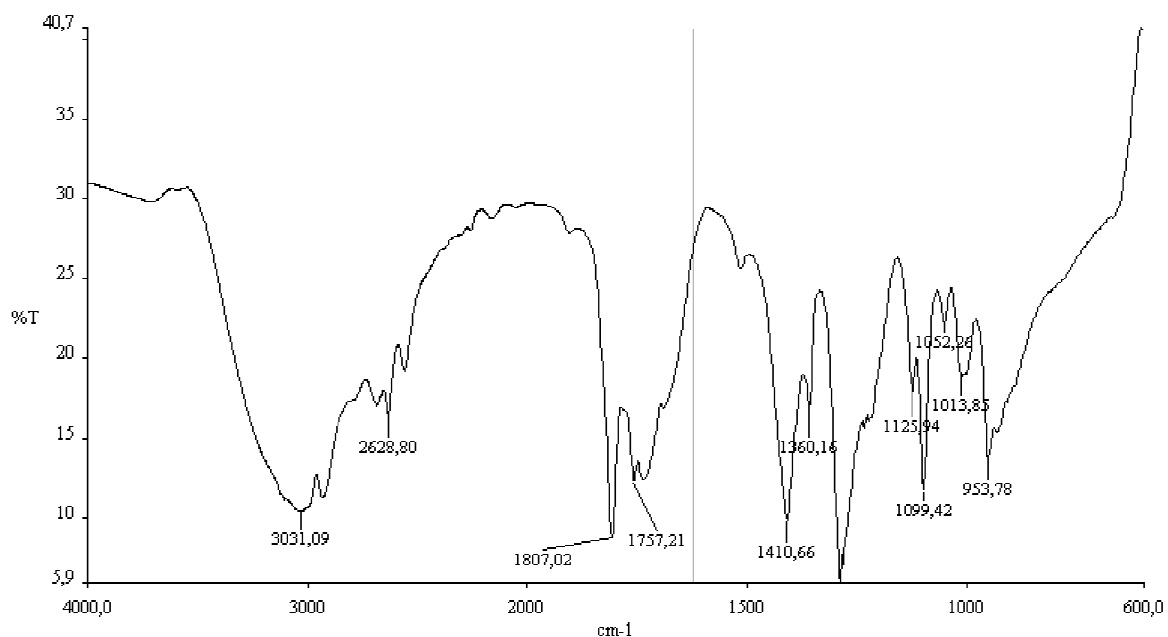


Figura 3.7. Espectro IR del cloruro de acetilo en solución ácida

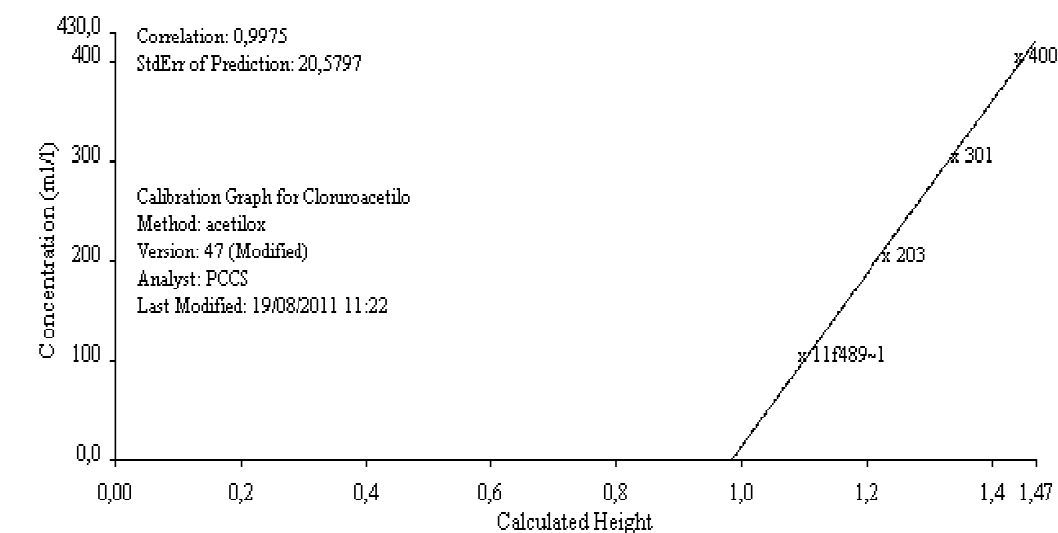


Figura 3.8. Curva de calibración para la determinación de cloruro de acetilo en solución ácida por FTIR

Por su parte, al analizar el espectro IR del hidrocloreto de L-carnitina mostrado en la Figura 3.9, se observan varias bandas importantes debido a que es un molécula polifuncional. Para empezar, el pico ubicado en 3375.50 cm^{-1} corresponde al estiramiento

de O-H del grupo hidroxilo ubicado en el carbono tres, este corresponde a un alcohol secundario debido al apareamiento de la banda de 1089.06 cm^{-1} . Seguido de éste se encuentra 2827.73 cm^{-1} , correspondiente a la misma vibración pero del enlace correspondiente al carbono carboxílico ubicado en la posición uno de la molécula. El estiramiento C=O se ubica en la banda de 1718.70 cm^{-1} del carbono uno. Por su parte para el reconocimiento de la función de amina terciaria se distinguen dos bandas^[50]: 963.79 y 931.20 cm^{-1} , producidas por el estiramiento simétrico y asimétrico de $\text{C-N}^+(\text{CH}_3)_3$, respectivamente.

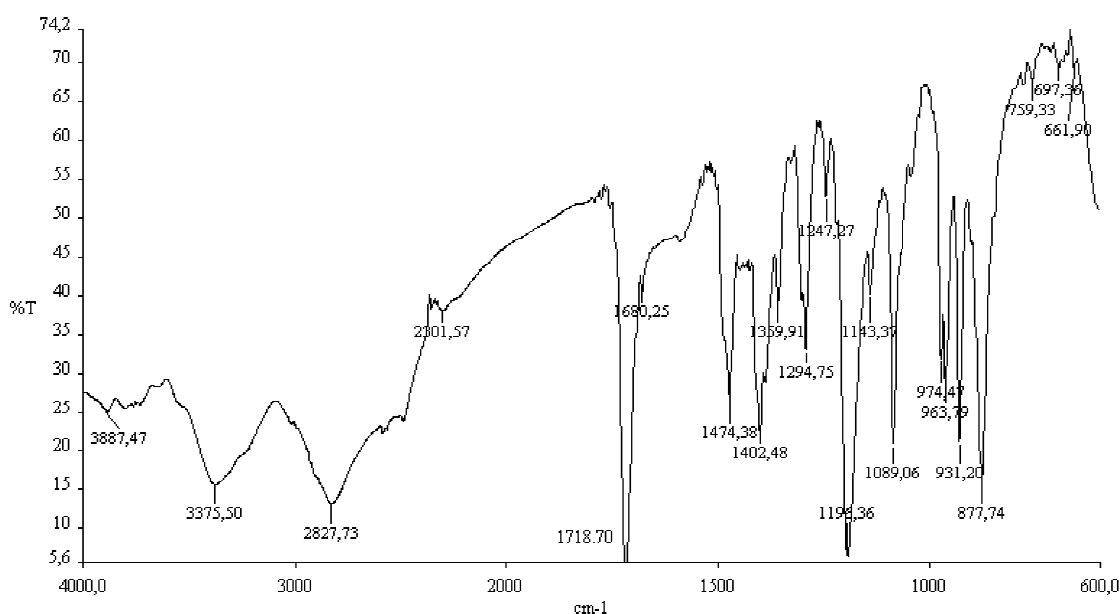


Figura 3.9. Espectro IR del hidrocloreto de L-carnitina

En contraste con la complejidad del espectro del hidrocloreto de L-carnitina puro, el espectro IR del hidrocloreto de L-carnitina en solución ácida mostrado en la Figura 3.10, tiene la ausencia de varias bandas, mas la persistencia de la banda del estiramiento del -OH del alcohol secundario que se ve desplazada hacia los 3427.03 cm^{-1} , y fue la escogida para la medición de la concentración del hidrocloreto de L-carnitina para determinación de la

cinética de acetilación, lo cual fue corroborado con el análisis del producto principal de la reacción, siendo la banda que no producía interferencia para su medición. La curva de calibración se ilustra en Figura 3.11.

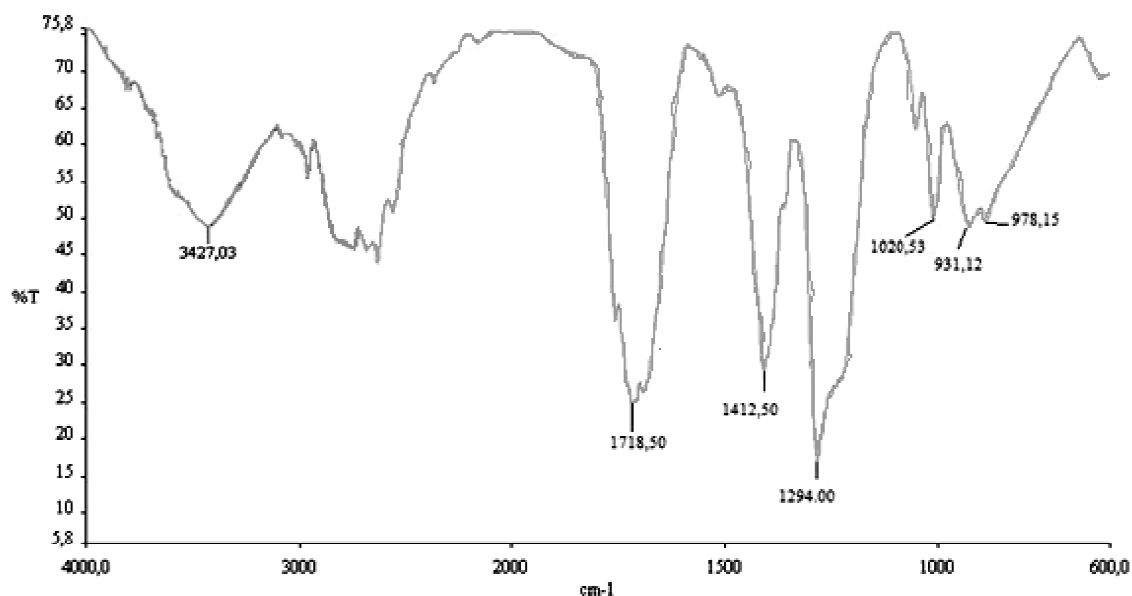


Figura 3.10. Espectro IR del hidrocloreuro de L-carnitina en solución ácida

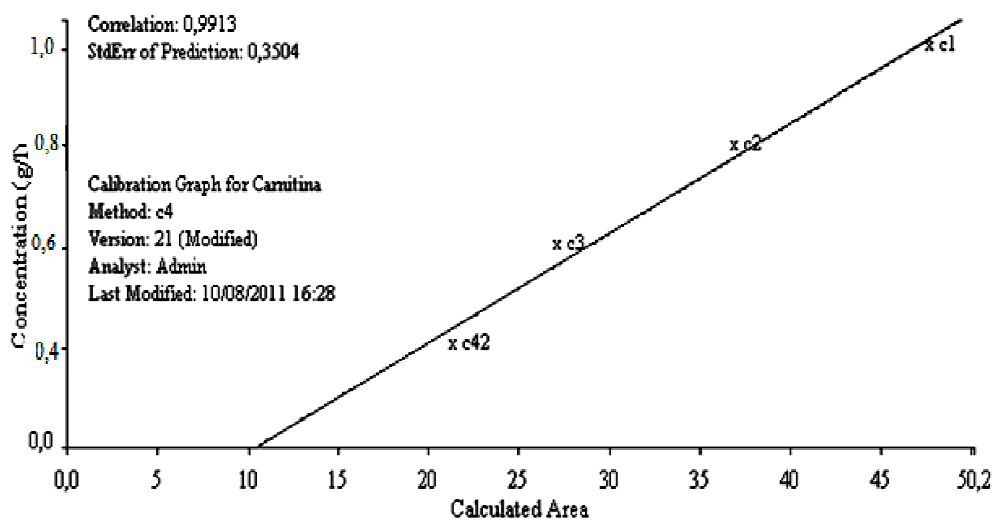


Figura 3.11. Curva de calibración para la determinación de hidrocloreuro de L-carnitina en solución ácida por FTIR

Adicionalmente, se analizó el espectro IR del producto principal: el hidrocloreuro de O-acetil-L-carnitina, Figura 3.12. Se puede observar la desaparición de las bandas correspondientes al estiramiento O-H: 3375.50 cm^{-1} y 1089.06 cm^{-1} . Se puede distinguir el desplazamiento de las banda de 1718.70 a 1723.68 cm^{-1} del estiramiento C=O. Además se observa, las dos bandas características para un éster en 1746.23 cm^{-1} debido al estiramiento de C=O, y la de 1241.58 cm^{-1} por el estiramiento de C-O del enlace R-CO-OR'.

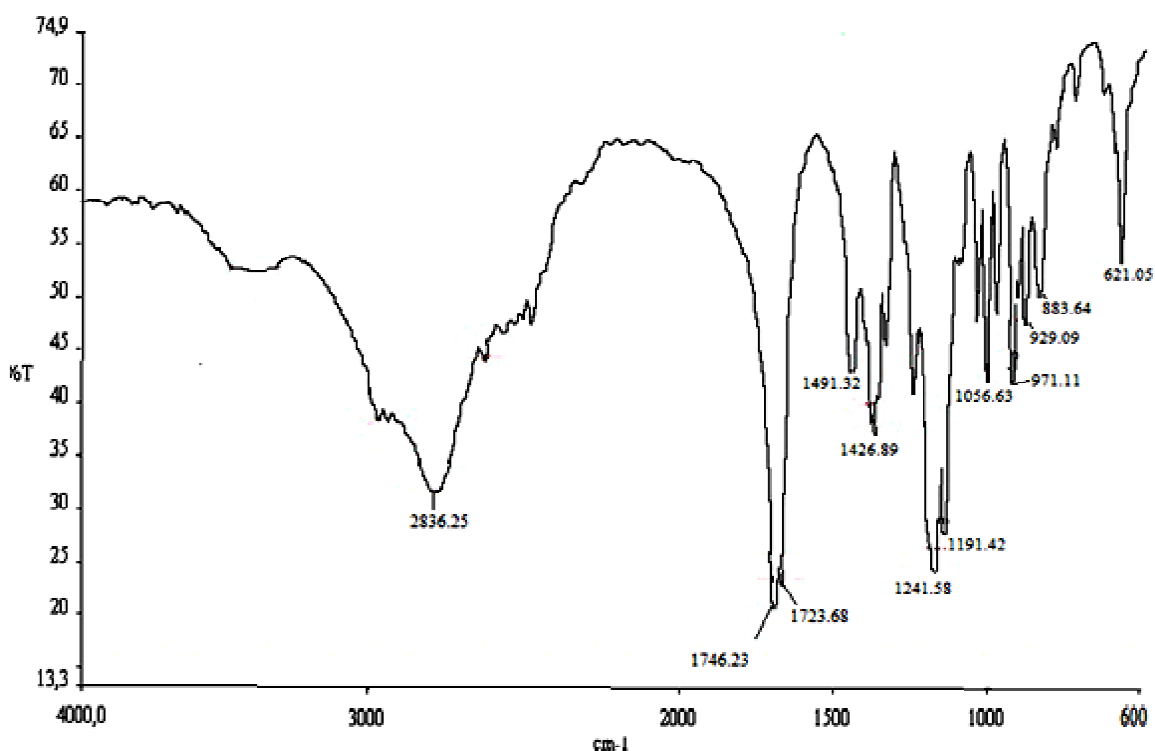


Figura 3.12. Espectro IR del hidrocloreuro de O-acetil-L-carnitina

Así, se pudo medir la concentración de los dos reactivos: hidrocloreuro de L-carnitina y cloruro de acetilo para determinar sus velocidades iniciales por la interpolación de las curvas de calibración (Figura 3.8 y 3.11). Los datos para obtener la ley de velocidad de la reacción de acilación del hidrocloreuro de L-carnitina se presentan en las Tablas 3.5 y 3.6.

Tabla 3.5. Velocidades iniciales a diferentes concentraciones para el hidrocloreuro de L-carnitina y sus logaritmos

Concentración (M)	Log M	Velocidad inicial (M/s)	Log Vo
5.06E-03	-2.30	2.42E-07	-6.62
4.05E-03	-2.39	1.87E-07	-6.73
3.04E-03	-2.52	1.22E-07	-6.91
2.53E-03	-2.57	1.02E-07	-6.99

Tabla 3.6. Velocidades iniciales a diferentes concentraciones para el cloruro de acetilo y sus logaritmos

Concentración (M)	Log M	Velocidad inicial (M/s)	Log Vo
2.81	0.45	3.32E-04	-3.48
3.81	0.58	4.43E-04	-3.35
5.05	0.70	6.09E-04	-3.22
5.77	0.76	6.63E-04	-3.18

En los Anexos 5 y 6 se encuentran los datos usados para la determinación de las velocidades iniciales de cada reactivo. Obtenidas las velocidades iniciales se procedió a determinar el orden de reacción al aplicar la Ecuación 2.9. Se graficó el logaritmo de la velocidad inicial en función del logaritmo de la concentración con el fin de obtener, a partir de la pendiente de la gráfica, el orden de reacción para cada reactivo.

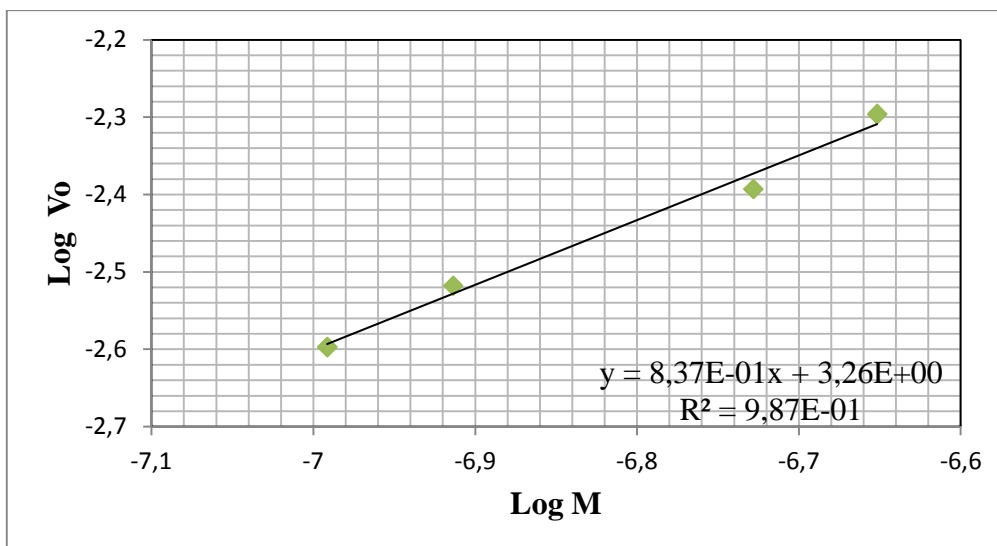


Figura 3.13. Determinación del orden de reacción para el hidrocloreuro de L-carnitina

Así, mediante las Figuras 3.13 y 3.14 se pudo determinar el orden de reacción para el hidrocloreuro de L-carnitina mediante la pendiente de la gráfica la cual es de 0.837, que corresponde a un orden de reacción de uno. Por su parte, la pendiente de la gráfica para el cloruro de acetilo es de 0.98 que corresponde, de igual manera, a un orden de reacción de uno.

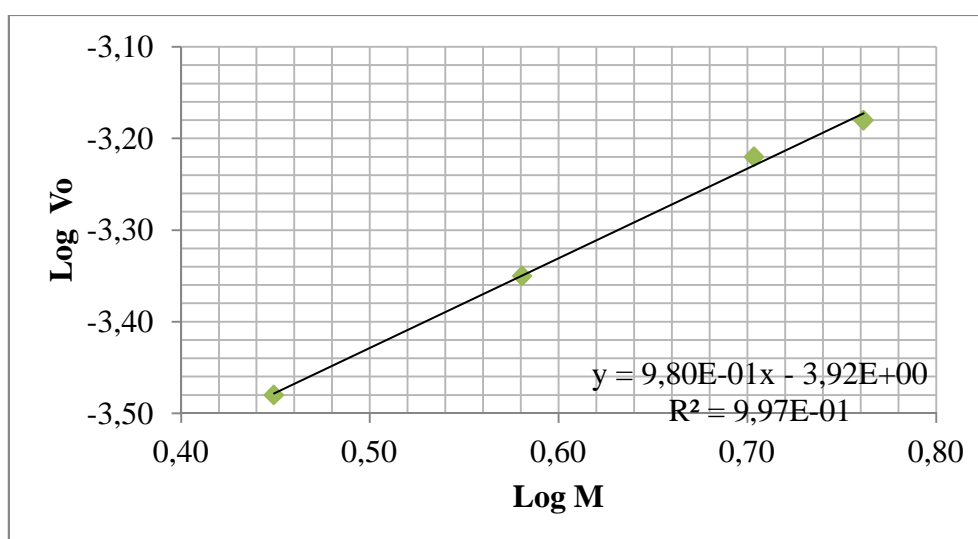


Figura 3.14. Determinación del orden de reacción para el cloruro de acetilo

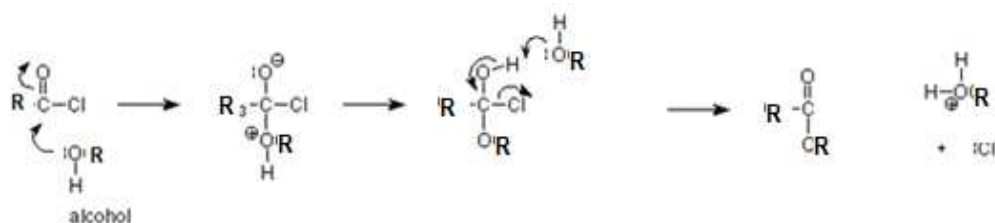
Como consecuencia se obtiene un orden global de reacción de dos, es una reacción bimolecular donde ambos reactivos toman parte de la reacción. En consecuencia la ley de la velocidad de reacción para la acetilación del hidrocloreuro de L-carnitina es:

$$r = k[\text{hidrocloreuro de L - carnitina}][\text{cloruro de acetilo}] \quad (3.2)$$

$$r = k[(\text{CH}_3)_3\text{N}(\text{Cl})\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{COOH}][\text{CH}_3\text{COCl}] \quad (3.3)$$

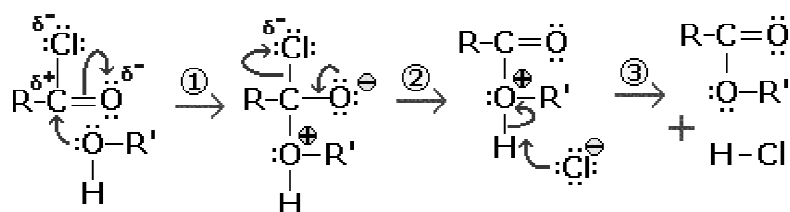
En general las reacciones de esterificación que usan un cloruro de acilo y un alcohol, tienen como orden de reacción uno con respecto al cloruro de acilo y de uno o dos con respecto al alcohol. El orden de reacción con respecto al alcohol depende de su concentración y el poder de solvatación del solvente usado para la reacción^[51].

Una mejor manera de poder explicar el orden de reacción es refiriéndonos al mecanismo de reacción de la esterificación. Existen dos mecanismos propuestos, ambos concuerdan en que el primer paso se produce un intermediario tetraédrico, mas difieren en el segundo paso de la reacción. En uno de estos se establece que una segunda molécula de alcohol toma parte y permite la eliminación de un protón, ilustrado en el Esquema 3.3^[52], si se sigue este mecanismo la reacción sería de segundo orden con respecto al alcohol.



Esquema 3.3. Mecanismo de esterificación donde se requiere de otra molécula de alcohol^[52]

Por otra parte, el otro mecanismo sugiere que la eliminación del protón se da por la eliminación del cloro en forma de ión y un reordenamiento de los electrones en el carbono carbonílico, como se observa en la Esquema 3.4^[53,54]. En este caso la reacción es de orden uno con respecto al alcohol concordando con lo calculado para el hidrocloreto de L-carnitina.



Esquema 3.4. Mecanismo de esterificación donde el protón se elimina por el ataque del ión cloruro y el reordenamiento de los electrones del carbono carbonílico^[54]

Adicionalmente se calculó la constante de velocidad mediante la ecuación de velocidad integrada:

$$kt = \frac{1}{[B]_0 - [A]_0} \ln \frac{[A]_0([B]_0 - x)}{[B]_0([A]_0 - x)} \quad (3.4)$$

Donde se toma $[B]_0$ como la concentración inicial del cloruro de acetilo y $[A]_0$, del hidrocloreto de L-carnitina. Se calculó la constante para cada concentración de hidrocloreto de L-carnitina y cloruro de acetilo encontrado en la Tabla 3.6, determinándose la media de los cálculos como su constante: $4.45 \times 10^{-4} \text{ l/mol} \cdot \text{s}$ a $298 \pm 2 \text{ K}$. Estos valores se encuentran en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7. Constantes de velocidad para la reacción de acetilación del hidrocloreuro de L-carnitina

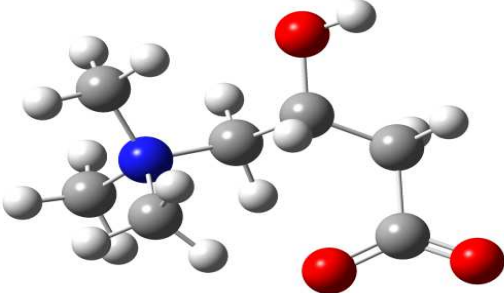
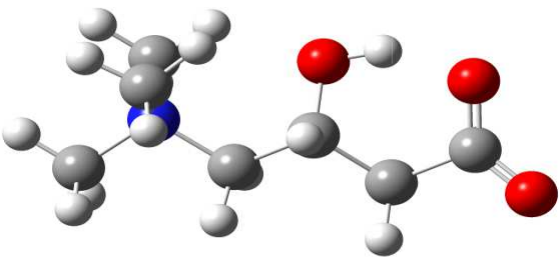
$[A]_0$	k (l/mol s)
2.53E-03	4.26E-05
3.04E-03	3.07E-05
4.05E-03	5.53E-05
5.01E-03	2.82E-05
$[B]_0$	k (l/mol s)
2.81	4.14E-05
3.81	1.50E-04
5.05	2.12E-04
5.77	2.04E-04
\bar{x}	4.45E-04

Al comparar ésta con otras reacciones de esterificación, la primera entre ácido acético e isobutanol con una constante de velocidad de 1.25×10^{-7} l/mol·s a 348 K ^[55] y la segunda entre radicales hidroxilo y cloruro de acetilo con una constante de 1.02×10^7 l/mol·s ^[56] a 298K, no existe una relación con los valores calculados. Estas son las reacciones más cercanas a la de acetilación de la L-carnitina debido a que estudios relacionados a su cinética no han sido realizados. Los valores no son comparables debido a la diferencia existente entre los reactivos usados, medios de reacción, y, en el primer caso, temperatura. La velocidad de una reacción es afectada por el mecanismo de reacción, polaridad y naturaleza del solvente, temperatura, entre otros, por lo que los valores de la constante de velocidad se ven alterados si se cambia una de estas variables.

3.3. MODELAMIENTO COMPUTACIONAL

Varias etapas conforman la caracterización de la L-carnitina a través de medios computacionales. Se buscó su estructura energéticamente más estable. Por lo tanto se pudo confirmar que la L-carnitina presenta dos conformaciones espaciales^[57]: una plegada y otra extendida encontradas en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8. Conformaciones espaciales de la L-carnitina y sus energías

Tipo	Estructura	Energía (kcal)
Plegada		-346716.166
Extendida		-346714.673

La estructura más estable (de menor energía) en fase gaseosa es la plegada, con una diferencia energética de 1.493 kcal. Esto se puede explicar debido a la atracción coulombica que se produce entre el grupo carboxílico negativamente cargado y el grupo

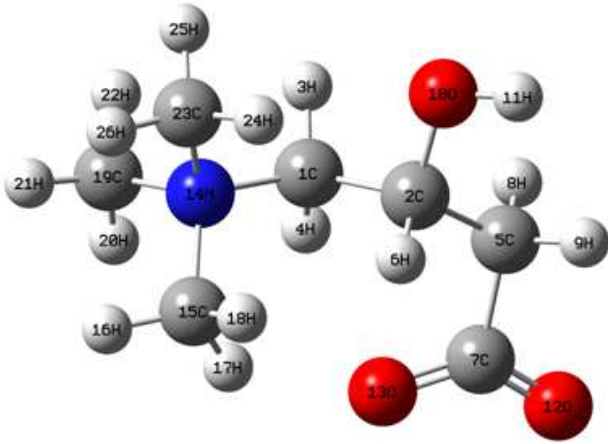
amino cargado positivamente. Además, la configuración plegada minimiza el efecto estérico existente entre el grupo carboxílico y oxidrilo de la molécula. Al comparar la dureza calculada con la Ecuación 2.19 de los dos arreglos espaciales, se confirma que la menos estable es la conformación extendida debido a que posee un menor valor de dureza, clasificándose como una especie más reactiva. Los datos se presentan en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9. Valores de los orbitales HOMO y LUMO e índices de reactividad globales para las conformaciones espaciales de la L-carnitina

	HOMO (au)	LUMO (au)	Potencial químico (μ) (eV)	Dureza (η) (eV)	Nucleofilia (N) (eV)	Electrofilia (ω) (eV)
Plegada	-0.31917	0.15972	-2.1693	13.034	3.4728	0.1806
Extendida	-0.31908	0.13630	-2.4867	12.391	3.4753	0.2495

Al analizar los índices de reactividad para la estructura más estable (plegada), se puede observar que es una molécula altamente nucleofílica. Su nucleofilia calculada con la Ecuación 2.23 es de alrededor de 20 veces mayor que su electrofilia calculada con la ecuación Ecuación 2.21. Se usó la Ecuación 2.23 para la nucleofilia en lugar de Ecuación 2.22 porque se trata de caracterizar a la molécula de L-carnitina de manera aislada, ya que al usar la Ecuación 2.22 se requiere de un electrófilo específico para su cálculo.

Tabla 3.10. Índices de selectividad para la L-carnitina (conformación plegada)



Átomo número	Nucleofilia Local (N_k) (eV)	Electrofilia Local (ω_k)(eV)
1 C	0.0076	0.1102
2 C	0.0007	0.0041
3 H	0.0003	0.0010
4 H	0.0014	0.0012
5 C	0.0010	0.0064
6 H	0.0000	0.0052
7 C	0.0017	0.0002
8 H	0.0000	0.0001
9 H	0.0000	0.0014
10 O	0.0007	0.0002
11 H	0.0000	0.0000
12 O	1.5982	0.0002
13 O	1.8600	0.0002
14 N	0.0000	0.0816
15 C	0.0007	0.0363
16 H	0.0000	0.0000
17 H	0.0000	0.0009
18 H	0.0000	0.0000
19 C	0.0000	0.0757
20 H	0.0000	0.0008
21 H	0.0000	0.0000
22 H	0.0000	0.0015
23 C	0.0000	0.0510
24 H	0.0000	0.0001
25 H	0.0000	0.0015
26 H	0.0000	0.0000

Una vez obtenidos los índices de reactividad globales, se procedió a calcular los índices de selectividad con la ayuda de las funciones de Fukui con el uso de las Ecuaciones 2.24 y 2.25. Así, en la Tabla 3.10 se diferencia que los átomos 12O y 13O son los que exhiben los mayores valores de nucleofilia, debido a que existe resonancia, además de adquirir una carga parcialmente negativa. Al comparar estos dos oxígenos con el número diez del grupo hidroxilo, éste posee un carácter nucleofílico reducido ya que se encuentra unido a un hidrogeno el cual le otorga estabilidad. Por lo tanto, a pesar de que se esperaba el oxígeno del oxidrilo fuera el más nucleofílico, éste no lo es debido a que existen otros dos átomos de igual electronegatividad pero con una mayor capacidad de atraer electrones como lo son los oxígenos del grupo carboxílico.

Los lugares que exhiben el mayor valor de electrofilia son el átomo 14N y el 1C. El átomo de nitrógeno posee una deficiencia de electrones al compartir sus electrones con cuatro carbonos adyacentes. Mientras que el carbono uno se ve polarizado debido a la existencia de grupos polares a sus extremos. Esta regioselectividad también influye en los lugares de la molécula en donde se concentra la carga, así, en el átomo donde se concentra la electrofilia, la molécula está cargada positivamente, mientras que donde posee la mayor nucleofilia, existe una carga negativa. Esto da lugar a una estructura similar a la de un aminoácido que se observa en la Figura 3.15, tomando la conformación de un zwitterion.

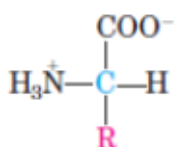
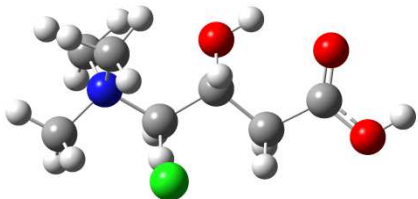
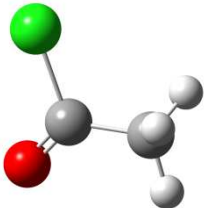
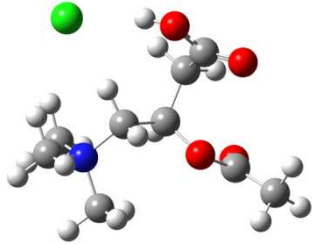
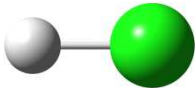


Figura 3.15. Fórmula estructural de un aminoácido

En la siguiente etapa, se estudió la termodinámica de la reacción de acetilación de la L-carnitina con el fin de complementar los estudios experimentales cinéticos realizados. Para poder comparar los valores calculados con datos tabulados se realizó el estudio en fase gaseosa y acuosa, además de analizar la variación energética entre los dos medios de reacción. Así, se procedió a calcular las energías de cada una de las moléculas en fase gaseosa y acuosa que participan en la reacción. Los valores se observan en la Tabla 3.11.

Tabla 3.11. Valores de energía obtenidos computacionalmente para la reacción de acetilación de la L-carnitina

Reactivos	
<p>Hidrocloruro de L-carnitina</p>  <p>Fase Gaseosa: -638294.253 kcal Fase Acuosa: -638332.400 kcal</p>	<p>Cloruro de acetilo</p>  <p>Fase Gaseosa: -384989.600 kcal Fase Acuosa: -384993.021 kcal</p>
<p>Hidrocloruro de acetyl-O-L-carnitina</p>  <p>Fase gaseosa: -734114.443 kcal Fase acuosa: -734146.301 kcal</p>	<p>Ácido clorhídrico</p>  <p>Fase gaseosa: -289177.608 kcal Fase acuosa: -289183.135 kcal</p>

Con el uso de la Ecuación 3.5 se calcularon las entalpías de acetilación. Así, en fase gaseosa es de -8.198 kcal/mol y en fase acuosa de -4.105 kcal/mol. No existen datos experimentales de la hidrólisis o acetilación del hidrocloreuro de L-carnitina, por lo que el estudio presentado es el primero realizado de este tipo. En los dos medios, la reacción de acetilación es exotérmica, es decir, libera energía en forma de calor.

$$\Delta H_{reacción} = \sum \Delta H_{productos} - \sum \Delta H_{reactivos} \quad (3.5)$$

En la mayoría de reacciones no se producen diferencias notables entre las reacciones en fase gaseosa y en solución, pero éstas existen si el medio en el que ocurren experimentalmente es en solución^[58], en este caso la reacción de acetilación se da en solución explicando la diferencia del doble en su entalpía en los dos diferentes medios. Así, las propiedades del solvente son importantes en determinar las energías de los reactivos y productos^[59]. Las diferencias existentes entre los dos medios de reacción de acetilación se dan por las distintas interacciones que las moléculas de reactivo y producto pueden experimentar.

En fase gaseosa, las moléculas tienen poca interacción unas con otras, por lo que su energía no se ve afectada por las moléculas que la rodean. Al contrario, en fase acuosa se debe tomar en cuenta las interacciones, soluto-soluto, solvente-solvente y soluto-solvente, que provocan una interacción energética por la existencia de fuerzas intermoleculares. Las moléculas que se encuentran en fase gaseosa están en una región de baja energía potencial, como resultado de la baja fuerza de atracción que las moléculas adyacentes producen en ellas. Al analizar las energías de las moléculas participantes de la reacción de acetilación se puede ver que éstas son más estables en fase acuosa que en gaseosa, se puede asumir

que en solución las moléculas tienden a estabilizarse debido a las interacciones con el solvente, principalmente, electrostáticas.

Adicionalmente, se analizó la reactividad y regioselectividad de los reactivos usados tanto en fase gaseosa como acuosa. Así, en la Tabla 3.12. se encuentran los índices de reactividad para el hidrocloreuro de L-carnitina y el cloruro de acetilo calculados con las Ecuaciones 2.21 y 2.22.

Tabla 3.12. Índices de reactividad para el hidrocloreuro de L-carnitina y el cloruro de acetilo

		Fase gaseosa	Fase acuosa
Hidrocloreuro de L-carnitina	Nucleofilia (N) (eV)	0.0325	0.0165
Cloruro de acetilo	Electrofilia (ω) (eV)	0.6676	0.6661

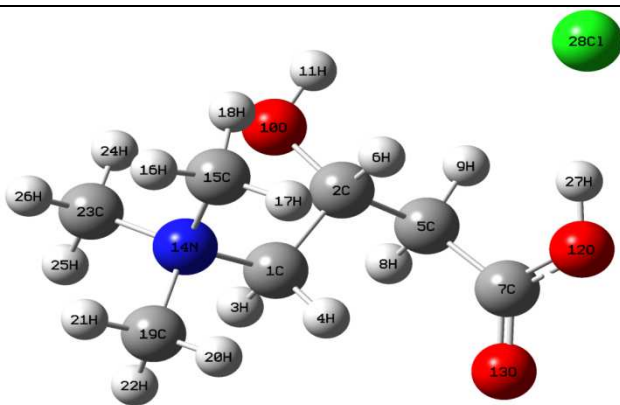
En fase acuosa, la nucleofilia del hidrocloreuro de L-carnitina disminuye en un 50%, como se puede observar en la Tabla 3.12, debido a que el agua es un solvente polar prótico que experimenta puentes de hidrógeno con ésta, disminuyendo su habilidad de donar electrones. Por lo que la presencia de puentes de hidrógeno requiere de una energía adicional para romper los enlaces de hidrógeno que aumenta la energía de activación de la reacción^[53].

En contraste, la electrofilia disminuye cuando existe un fenómeno de solvatación en ligandos electrofílicos neutros^[60]. El cloruro de acilo usado, ligando neutro, posee un bajo nivel de solvatación al ser un compuesto apolar, además, reacciona con el agua, hidrolizándose, por lo que el efecto que posee el solvente sobre su reactividad es mínimo, lo cual puede ser observado en la Tabla 3.12.

Ya que el hidrocloreuro de L-carnitina es una molécula polifuncional se analizó su índice de nucleofilia local, presentado en la Tabla 3.13. El oxígeno del grupo oxidrilo que participa en la reacción de acetilación, no es el más nucleofílico en fase gaseosa y acuosa. Por el contrario en fase acuosa, éste pierde todo su carácter nucleofílico debido al efecto que el agua tiene sobre la nucleofilia.

Por otra parte, no existe una reubicación del carácter nucleofílico entre los átomos del hidrocloreuro de L-carnitina, sólo una disminución en su valor cuando la reacción se analizó en medio acuoso. La mayor nucleofilia se localiza en el cloro tanto en fase gaseosa como acuosa, más éste no forma parte de la molécula debido a que no está unido al esqueleto mediante un enlace químico, como se lo observa en la Tabla 3.13, por lo que no se lo considera dentro del análisis de regioselectividad. Así, se puede ver que la mayor cantidad de nucleofilia en fase gaseosa se ubica en el átomo 15C, porque se encuentra ligado a un átomo altamente electrófilo como lo es el nitrógeno, por lo que se dará un fenómeno de polarización, aumentando su poder nucleofílico. A pesar que este carbono es equivalente al 23 y 19, el mayor valor de nucleofilia se produce por la menor distancia de enlace entre 15C y 14N de 1.50450 Å, mientras que para 23C y 19C es de 1.51039 y 1.50698 Å, respectivamente. Al analizar el átomo 10 O, el participante en la reacción de acetilación, se observa que posee un carácter nucleofílico moderado, dada la estabilización que le provee su enlace al hidrógeno.

Tabla 3.13. Nucleofilias locales para el hidrocloreuro de L-carnitina



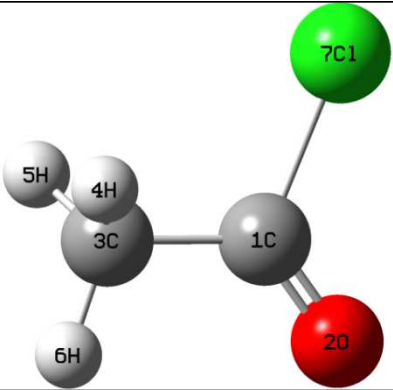
Átomo	Nucleofilia Local (medio gaseoso) (eV)	Nucleofilia Local (medio acuoso) (eV)
1 C	3.249E-06	0.000
2 C	1.007E-04	1.646E-06
3 H	3.249E-06	0.000
4 H	0.000	0.000
5 C	3.249E-06	6.584E-06
6 H	3.249E-06	0.000
7 C	3.249E-06	0.000
8 H	3.249E-06	0.000
9 H	0.000	0.000
10 O	2.599E-05	0.000
11 H	0.000	0.000
12 O	3.899E-05	6.584E-06
13 O	9.747E-05	1.646E-06
14 N	3.246E-06	0.000
15 C	1.560E-04	0.000
16 H	3.249E-06	0.000
17 H	2.274E-05	0.000
18 H	0.000	0.000
19 C	6.498E-06	0.000
20 H	3.249E-06	0.000
21 H	0.000	0.000
22 H	0.000	0.000
23 C	0.000	0.000
24 H	0.000	0.000
25 H	0.000	0.000
26 H	0.000	0.000
27 H	0.000	1.646E-06
18 Cl	3.209E-02	1.644E-02

En fase acuosa, se ve una reubicación de la nucleofilia, así, los de mayor valor de índice de nucleofilia local son el 5C y el 12O. El 12O aumenta su nucleofilia en relación a los demás átomos, pero en relación a la calculada para fase gaseosa disminuye, debido a la formación

de puentes de hidrógeno con el agua. Adicionalmente se puede inferir, que la acción de los puentes de hidrógeno y las interacciones electrostáticas entre moléculas de soluto y solvente pueden producir una relocalización del índice de nucleofilia local.

Suplementariamente, al comparar los lugares reactivos hacia un ataque nucleofílico entre la L-carnitina y el hidrocloreuro de L-carnitina, se puede ver que la sal cuaternaria beneficia el ataque ya que disminuye el carácter nucleofílico de los oxígenos del grupo carboxílico y aumenta el del oxígeno hidroxílico

Tabla 3.14. Electrofilias locales para el cloruro de acetilo



Átomo	Electrofilia local (medio gaseoso) (eV)	Electrofilia local(medio acuoso) (eV)
1 C	0.3519	0.3511
2 O	0.2720	0.2714
3 C	0.0016	0.0016
4 H	0.0154	0.0153
5 H	0.0153	0.0153
6 H	0.0000	0.0000
7 Cl	0.0114	0.0114

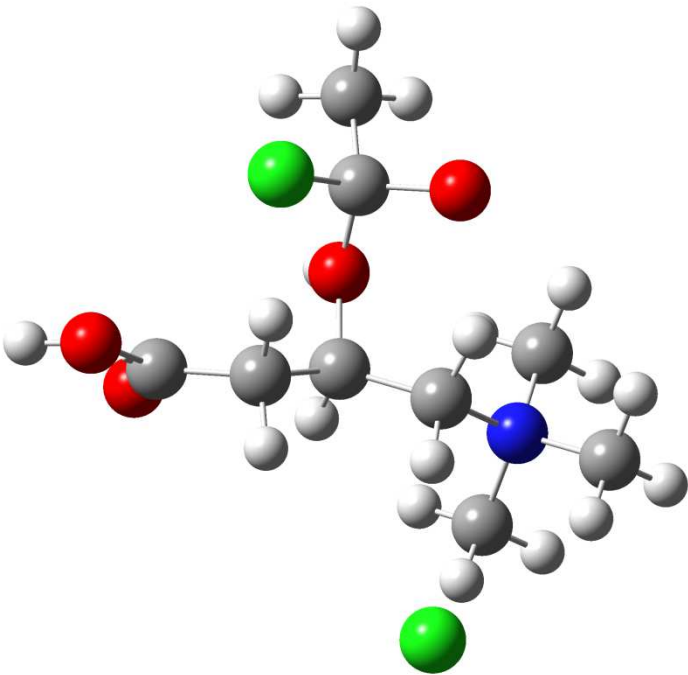
Al analizar los índices de electrofilia locales encontrados en la Tabla 3.14 para el cloruro de acetilo, el carbono uno es el receptor del ataque nucleofílico por lo que exhibe los mayores valores de electrofilia en los dos medios de reacción. Hay una ligera disminución

de la electrofilia local en medio acuoso con respecto al gaseoso porque la electrofilia global disminuye. El carbono carbonílico es el determinante en la reactividad de este derivado del ácido acético, es decir es el que incitaría el ataque electrofílico al hidrocloreto de L-carnitina debido al bajo índice de nucleofilia exhibido por el oxígeno del hidroxilo.

Por último, se obtuvo el estado de transición para la reacción de acetilación tanto en medio gaseoso como acuoso. Al determinar el orden de reacción se dedujo que el estado de transición es un estado tetraédrico donde el protón se elimina por el ataque del ión cloruro y el reordenamiento de los electrones del carbono carbonílico.

En la Tabla 3.15 se puede observar el estado de transición y la energía del estado de transición para la reacción en fase gaseosa, mientras que para en fase acuosa se observa en la Tabla 3.16.

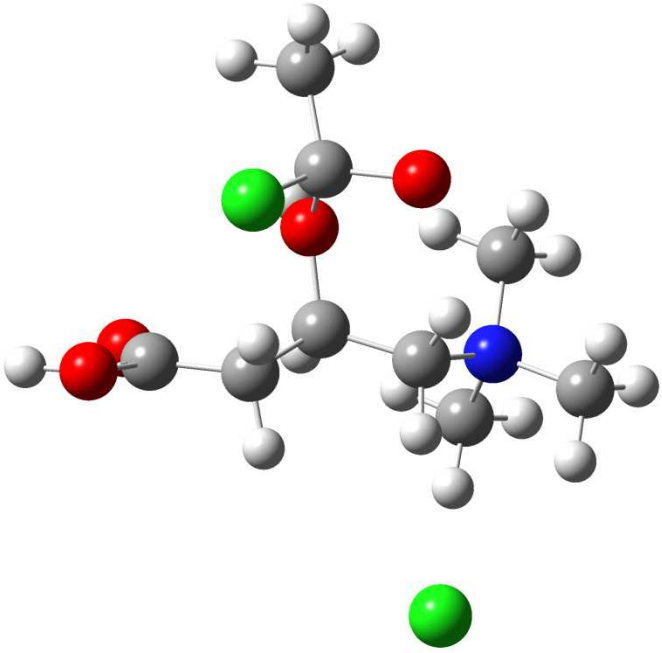
Tabla 3.15. Estructura y energía del estado de transición de la reacción de acetilación en fase gaseosa

<p>Estructura</p>	
<p>Energía</p>	<p>-1023165.343 Kcal</p>

El mecanismo de esterificación es de una reacción donde se da la adición nucleofílica del hidrocóloruro de L-carnitina y posterior eliminaci3n del cloro como anión, formando acido clorhídrico. Comienza con el ataque nucleofílico al carbono carbonílico, aquí, el nucleófilo posee un par de electrones desapareados en un átomo de oxígeno neutro que corresponde al oxígeno del grupo oxidrilo del hidrocóloruro de L-carnitina en el carbono tres. En el complejo activado ocurre una rápida transición del prot3n (H^+) al O^- , por lo que el carbono carbonílico cambia su hibridaci3n de sp^2 a sp^3 , adoptando una configuraci3n tetraédrica momentánea. Es importante recalcar que el enlace O-H no se rompe hasta que el C-O es

formado^[53]. El ataque se favorece por la facilidad estérica del carbono carbonílico y la habilidad del oxígeno carbonílico de reacomodar un par de sus electrones ubicados en el enlace doble del carbono-oxígeno. Seguido de esto, se da la eliminación del átomo de cloro que regenera el doble enlace entre el carbono carbonílico y el oxígeno, produciendo un producto de sustitución, en particular, el hidrocloreuro de O-acetil-L-carnitina.

Tabla 3.16. Estructura y energía del estado de transición de la reacción de acetilación en fase acuosa

Estructura	
Energía	-1023210.668 Kcal

Se obtuvo la energía de activación usando la Ecuación 2.26 para la reacción en ambas fases. En fase gaseosa la energía de activación es de 118.510 kcal/mol, mientras que en

fase acuosa es de 114.753 kcal/mol. Cabe recalcar que no existen estudios sobre energía de activación de la reacción, siendo éste el primero de su tipo.

La energía de activación es la mínima cantidad de energía cinética que los reactivos deben poseer para incitar la formación de productos. En fase acuosa la energía es menor en 3.757 kcal/mol, ya que el complejo activado está más fuertemente solvatado que los reactivos favoreciendo la formación de productos^[53]. Por otra parte, en fase gaseosa la reacción se da por colisiones aleatorias entre reactivos, sólo una pequeña proporción lo suficientemente energética dará lugar al hidrocloreuro de O-acetil-L-carnitina, por lo que la energía de activación debe ser mayor para asegurar que las colisiones produzcan un complejo activado lo suficientemente estable que lleve hacia un estado de transición y finalmente a productos, ya que no existen otras fuerzas, como las electrostáticas de un solvente que permitan su estabilización.

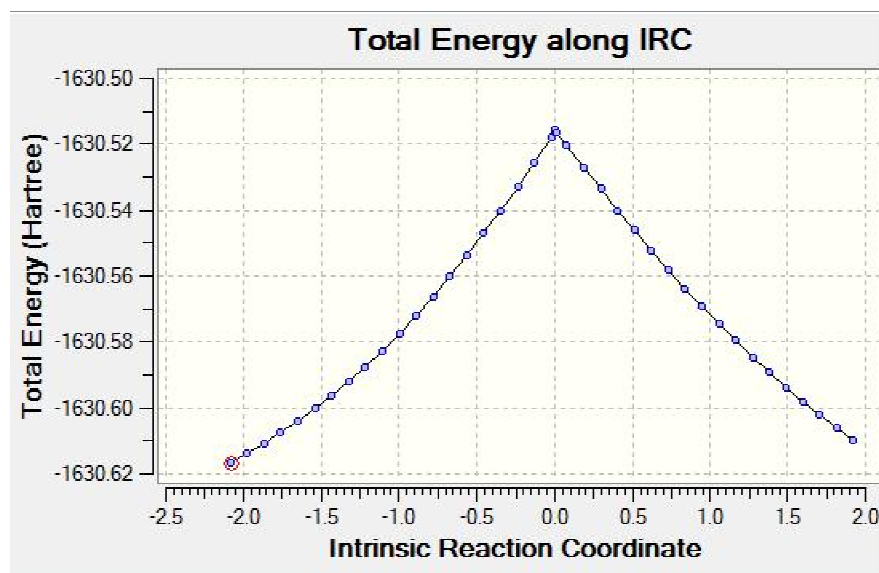


Figura 3.16. IRC del estado de transición para la reacción en medio gaseoso

En las Figuras 3.16 y 3.17 se observan los IRC de los dos estados de transición. El mayor punto de energía a lo largo de la coordenada de reacción es el estado transición, el cual posee una configuración tal que indica que los reactivos se han acercado tanto y se han distorsionado tanto (ángulos, dihedros y distancias de enlaces), que una pequeña distorsión beneficiará la formación de productos. Las figuras 3.16 y 3.17 son perfiles bidimensionales que permiten ver la variación de la energía potencial de un espacio (3N-6) dimensional.

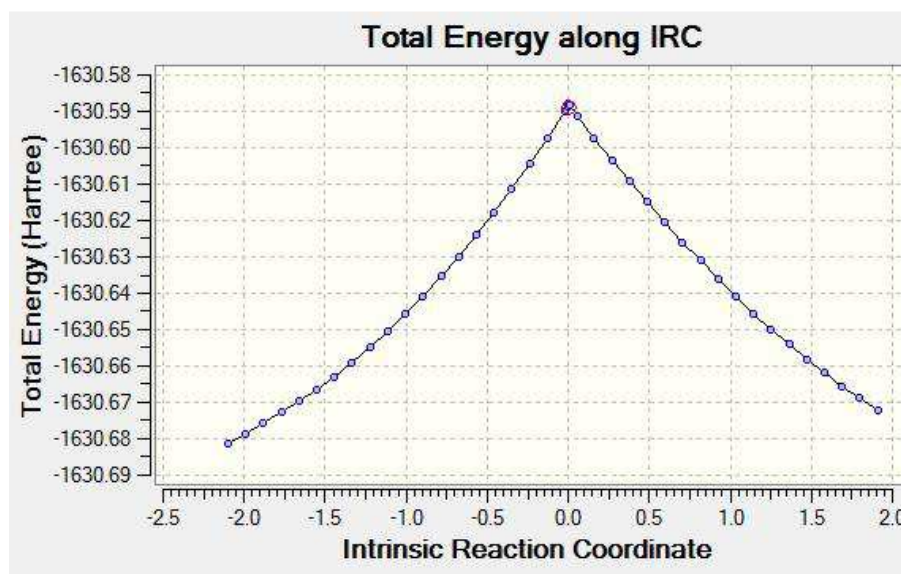


Figura 3.17. IRC del estado de transición para la reacción en medio acuoso

Es necesario mencionar que la L-carnitina al ser una molécula polifuncional que posee grupos amino y alcohol, puede producir reacciones de *O*-acilación y *N*-acilación. Esto es consecuente con la mayor estabilidad termodinámica que exhiben las amidas versus los ésteres, por lo que una acetilación selectiva del hidrocloreto de L-carnitina requiere de una protección de su grupo amino por medio de su conversión a éster o carbamato seguido de su *N*-desprotección^[61].

El grupo amino corresponde a una amina terciaria que a comparación de una primaria o secundaria posee un carácter nucleofílico reducido, debido al impedimento estérico alrededor del nitrógeno (tres grupos metilos) que al combinarse con su inhabilidad de formar especies neutras, impide la formación de un enlace C-N mediante su reacción con un carbono electrofílico, por lo que su adición nucleofílica es inestable ^[62]. Así, es innecesario una protección del grupo amino para evitar la *N*-acetilación.

CAPITULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

- Al completar el estudio sobre la extracción y caracterización de la L-carnitina en aguacate (*Persea Americana*) mediante técnicas instrumentales y computacionales, se concluyó que la L-carnitina es una molécula nucleofílica que participa en reacciones de esterificación en el metabolismo de las grasas del aguacate.
- Los niveles de L-carnitina encontrados en las variedades Booth 8 (84 $\mu\text{g/g}$) y Fuerte (82 $\mu\text{g/g}$) sugieren que el contenido de L-carnitina puede variar ligeramente dependiendo de la variedad de cultivo.
- La reacción de acetilación del hidrocloreuro de L-carnitina con cloruro de acetilo es de orden dos, de uno para cada reactivo, con una constante de velocidad a $298\pm 2\text{K}$ de $4.45 \times 10^{-4} \text{ l/mol}\cdot\text{s}$.
- Se pudo confirmar la existencia de dos conformeros espaciales de la L-carnitina: la plegada y la extendida, siendo la más estable la plegada debido a que su conformación espacial beneficia la atracción coulombica y disminuye el efecto estérico.

- Se calculó las entalpías de acetilación del hidrocloreuro de L-carnitina en fase gaseosa (-8.198 kcal/mol) y acuosa (-4.105 kcal/mol), determinándose que es una reacción exotérmica y que la diferencia existente se da debido a las interacciones y estabilidad que el solvente aporta a la reacción en medio acuoso.
- Se comparó el efecto que tiene el uso de agua como solvente en la reacción de acetilación en la reactividad de sus reactivos, determinándose que la nucleofilia del hidrocloreuro de L-carnitina disminuye en medio acuoso, al igual que la electrofilia del cloruro de acetilo debido a fenómenos de solvatación y la existencia de puentes de hidrógeno.
- Se estableció que el átomo en el hidrocloreuro de L-carnitina con mayor índice de nucleofilia local es el carbono del grupo metilo de la amina terciara con menor longitud de enlace al carbono y, el de mayor electrofilia local, el carbono carbonílico del cloruro de acetilo.
- Se determinó que la energía de activación acetilación del hidrocloreuro de L-carnitina es de 118.510 y 114.753 kcal/mol en fase gaseosa y acuosa, respectivamente, teniendo como estado de transición una estructura tetraédrica.

4.2. RECOMENDACIONES

- Se propone determinar la cantidad de L-carnitina en otras variedades de aguacate para comprobar si sus niveles dependen del tipo de aguacate.

- Se sugiere utilizar otras técnicas como HPLC/UV para la determinación de L-carnitina en otras variedades de aguacate, debido a que pueden proveer de resultados en un menor tiempo y con mayor sensibilidad.
- Se recomienda el consumo de aguacate en personas vegetarianas, veganas, y con mayores requerimientos de L-carnitina debido a su alto contenido, además del gran porcentaje de proteínas y grasas insaturadas que posee, su bajo costo y fácil acceso. Además de una dieta rica en lisina, metionina, hierro, vitamina B₆ y vitamina C, nutrientes esenciales para su biosíntesis.
- Se plantea ampliar el estudio sobre la reactividad, termodinámica y cinética de otras acilcarnitinas importantes para el organismo para analizar el efecto del tamaño y estructura de la cadena de acilo.
- Se propone estudiar si existe una relación entre las cantidades de vitamina B₆, C, hierro, lisina y metionina con el contenido de L-carnitina existente en las frutas y vegetales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fraenkel, G., (1953). Studies of the Distribution of Vitamin B₇, *Bio Bull*, 104, pp 359-371.
2. Panter, R.A., Mudd J.B., (1969). Carnitine Levels in Some Higher Plants, *Febs Letters*, 5(3), 169-170.
3. Friedman, S., (1958). Determination of Carnitine in Biological Materials, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 75, pp 24-30.
4. Demarquoy, J., Georges, B., Rigault, C., Royer, M.C., Clairet, A., Soty, M., Lekounougou, S., Le Borgne, F., (2004). Radioisotopic determination of L-carnitine content in foods commonly eaten in western countries, *Food Chemistry*, 86, pp 137-142.
5. Minkler, P.E., Ingalls, S.T., Hoppel C.L., (2005). Strategy for the Isolation, Derivatization, Chromatography Separation, and Detection of Carnitine and Acylcarnitine, *Analytical Chemistry*, 77(5). Pp 1448-1457.
6. Bergh, B., Ellstrand, N., (1986), Taxonomy of the Avocado, *California Avocado Society*, 70, pp 135-146.
7. Calabrese, F., (1992). *El Aguacate*, Ed. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.

8. Barrientos Priego, A.F., García Villanueva , E., Avitia García, E., (1996). Anatomía del Fruto del Aguacate, ¿Drupa o Baya?, *Revista Chapingo: Serie Horticultura* , 2 (2), pp. 189-198.
9. Wilely, A. W., Schaffer, B., Schaffer, A., Wolstenholme, N., (2002). *The avocado: botany production and uses*, Ed. CABI, Cambridge.
10. Sugar and Beverages Group, Raw Materials, Tropical and Horticultural Products Service, Commodities and Trade Division, Food and Agriculture Organization of the United Nations, (2004). *Market segmentation of major avocado markets*, <http://www.fao.org>, 13 de diciembre de 2010.
11. Redacción Cuenca. “Ecuador: la demanda de aguacate alienta la siembra en los valles”. *El Comercio*, 1, 27 de octubre de 2007, pp 10.
12. Leibovitz, B.E., (1998). *L-Carnitine: The Energy Nutrient*, 2.º edición, Keats Publishing, Los Angeles.
13. Vaz, F. M., Wanders, R.J.A., (2002). Carnitine biosynthesis in mammals, *Biochemistry Journal*, 361, pp 417-429.
14. Carter, H.E., Bhattacharyya, P.K., Weidman, K.R., Fraenkel, G., (1952). Chemical Studies on Vitamin B_T Isolation and Characterization as Carnitine, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 38, pp 405-416.
15. Head, K., (2005). L-carnitine monograph. *Alternative Medicine Review*, 10 (1), pp. 42-50.

16. Rebouche, C.J., (1992). Carnitine functions and requirements during life cycle, *The FASEB Journal*, 6(15), 3379-3386.
17. Delanghe J, De Slypere JP, De Buyzere M, Robbrecht J, Wieme R, Vermeulen A.(1989). Normal reference values for creatine, creatinine, and carnitine are lower in vegetarians. *Clin Chem*, 35(8), pp 1802-3.
18. Lombard KA, Olson AL, Nelson SE, Rebouche CJ. (1989). Carnitine status of lactoovovegetarians and strict vegetarian adults and children. *Am J Clin Nutr*,50(2), pp 301-6.
19. Krajcovicova-Kudlackova M, Simoncic R, Bederova A, Babinska K, Beder I. (2000). Correlation of carnitine levels to methionine and lysine intake, *Physiol Res*, 49(3), pp 399-402.
20. The Myasthenia Gravis Foundation of America (MGFA), (2011). What is Myasthenia Gravis (MG)?, <http://www.myasthenia.org/WhatisMG.aspx>, 20 de enero de 2011.
21. Wood, C., Masterson C., Thomas D.R., (1992). The rol of carnitine in plant cell metabolism, En: *Plant organelles: compartmentation of metabolism in photosynthetic cells*, Tobin A.K., Cambridge University Press, Wiltshire.
22. Panter, R.A., Mudd J.B., (1973). Some Aspects of Carnitine Metabolism in Avocado (*Persea Americana*), *Biochemistry Journal*, 134, pp 655-658.

23. Masterson, C., Wood, C., Thomas, D.R., (1992). β -oxidation enzymes and the carnitine-dependant oxidation of palmitate and palmitoyl in mitochondria from avocado, *Plant, Cell and Environment*, 15, pp 313-320.
24. Robinson, J. W., Skelly Frame, E. M., Frame II, G. M., (2005). *Undergraduate Instrumental Analysis*, Marcel Dekker, 6.º Ed., New York, NY.
25. Rouessac, F., Rouessac, A., (2007). *Chemical Analysis*, John Wiley & Sons Ltd., 2.º Ed., West Sussex.
26. Instituto Gntenatural, “Las transformaciones moleculares provocadas por la estimulación lumínica”, <http://www.gntenatural.com/astrolar/cursosgratis/cromoterapia/cromoterapia-3.html>, 11 de abril de 2011.
27. Atkins, P., De Paula, J., (2006). *Atkins' Physical Chemistry*, Oxford University Press, 8.º Ed., Oxford.
28. Lynch, B., Fast. P., Introduction to Computational Chemistry, <http://static.msi.umn.edu/tutorial/chemistryphysics/IntroCompChem.pdf> , 31 de enero de 2011.
29. Andrés, J., Beltrán, J., (2000). *Química Teórica y Computacional*, Publicaciones de la Universitat Jaume, Castelló de la Plana.

30. Parr, R. G., Yang, W., (1989). *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*, Oxford University Press, New York, New York.
31. García de la Vega, J.M., Miguel, B., Basis Sets for Computational Chemistry, [http://karin.fq.uh.cu/advcompchem/garcia de la vega.pdf](http://karin.fq.uh.cu/advcompchem/garcia_de_la_vega.pdf), 10 de febrero de 2011.
32. The Shodor Education Foundation Inc., *Background Reading for Geometry Optimization*, <http://www.shodor.org/chemviz>, 10 de febrero de 2011.
33. Koopmans, T., (1934).Über die Zuordnung von Wellenfunktionen und Eigenwerten zu den Eizelnen Elektronen Eines Atoms, *Physica* (Elsevier), 1(6), pp 104-133.
34. IUPAC, *Reactivity Index*, <http://old.iupac.org/goldbook/R05185.pdf>, Acceso: 13 de marzo de 2011
35. Parr, R. G., Szentpály, Liu, S., (1999). Electrophilicity Index, *J. Am. Chem. Soc.*, 121 (9), pp 1922-1924.
36. Jaramillo, P., Pérez, P., Contreras, R., Tiznado, W., Fuentealba, P., (2006). Definition of a Nucleophilicity Scale, *Journal of Physical Chemistry A*, 110, pp 8181-8187.
37. Pérez, P., Domingo, L.R., Duque-Noreña, M.R., Chamorro, E., (2008). A condensed-to-atom nucleophilicity index. An application to the director effects on the electrophilic substitutions, *Journal of Molecular Structure:Theochem*, 895, pp 86-91.

38. Domingo, L. R., Aurell, M. J., Pérez, P., Contreras, R., (2002). Quantitative Characterization of the Local Electrophilicity of Organic Molecules. Understanding the Regioselectivity on Diels-Alder Reactions, *J. Phys. Chem. A*, 106, pp 6871-6875.
39. Vedso, S., Rud, C., (1963), Determination of calcium in urine with EDTA by means of a cation exchange resin, *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 16, pp 395-398.
40. Brendel, K., Bressler, R., (1967). The Resolution of (\pm)-Carnitine and the Synthesis of Acylcarnitines, *Biochimica et Biophysica Acta*, 137, pp 98-106.
41. Ziegler, H.J., Bruckernan, P., Binon, D.F., (1967). O-Acylation of *dl*-Carnitine Chloride, *Journal of Organic Chemistry*, 32 (12), pp 3989-3991.
42. M. Frisch, et al, (2004), Revision D.01, Gaussian Inc., Wallingford CT.
43. Mason, R.D., Lind, D.A., Marchal, W.G., (2003). *Estadística para Administración y Economía*, 10.º Ed., Editorial Alfaomega, Bogotá.
44. Columbia University, Statistical Sampling and Regression: t- Distribution. http://ci.columbia.edu/ci/premba_test/c0331/s7/s7_4.html, 5 de abril de 2011.
45. Auerbach, M. (1944). Colorimetric Assay of Quaternary Ammonium Salts, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 16 (12), pp 739.

46. el-Ashry , SM., Aly,. FA, el-Brashy ,AM., (1994). Studies of complex formation between the bromophenol blue and some important aminoquinoline antimalarials, *Archives of Pharmaceutical Research*, 17 (6), pp 415-419.
47. Auerbach, M.(1943). Germicidal Quaternary Ammonium Salts in Dilute Solution A Colorimetric Assay Method, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 15 (8), pp 492–493.
48. Kar, A.,(2007). *Pharmaceutical Drug Analysis*, New Age Publishers, 2.° Ed., Delhi, India.
49. Strack, E., Lorenz, I., (1966). Zur Darstellung von O-Acyl-Derivaten des Carnitins, *Hoppe-Seyler´s Zeitschrift für physiologische Chemie*, 343, pp 341-349.
50. Podstawka, E., Swiatłowska, M., Borowiec, E., Proniewicz, L. M., (2007). Food additives characterization by infrared, Raman, and surface-enhanced Raman spectroscopy, *J. Raman Spectrosc.*, 38, pp 356–363.
51. Gennadiĭ Efremovich Zaikov,G.E., Kozlov, G.V., Makitra, R.G., (2006). *Theoretical and practical guide to organic physical chemistry*, Nova Science Publishers, New York NY.
52. McMichael, M., *Carboxylic Acid Derivatives: a Substitution Reaction Which Starts with Addition*, <http://chemistry2.csudh.edu/rpendarvis/carboxder.html>, 25 de agosto de 2011.
53. Brown, D., Revision Notes PART 10. *Summary of organic reaction mechanisms. A mechanistic introduction to organic chemistry and explanations of different types of*

organic reactions, <http://www.docbrown.info/page06/OrgMechs3.htm#esterification>, 28 de agosto de 2011.

54. Graham Solomons, T.W., Fryhle, C. B., (2008). *Organic Chemistry*, 9.º Ed., John Wiley & Sons, Hoboken NJ.

55. Rıza Altıokka, M., Çıtak, A., (2003). Kinetics study of esterification of acetic acid with isobutanol in the presence of amberlite catalyst, *Applied Catalysis A: General*, 239, pp 141–148.

56. Nádasdi, R., Szilágyi, I., Kovács, G., Dóbbé, S., Bérces, T., Márta, F., (2006). Rate constant for the reaction of OH radicals with $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{Cl}$ determined by direct kinetic method, *Reaction Kinetics and Catalysis Letters*, 89, pp 193-199.

57. Rosas-García, V.M., (1997). *Towards the Design of Carnitine Acyltransferase Inhibitors: Modeling the Conformational Behavior of (R)-Carnitine, (R)-Acetylcarnitine, Morpholinium rings, and 2-Oxo-1,3,6-dioxazaphosphacinium rings*, Disertación de Doctorado en Química, Virginia Polytechnic Institute and State University, Estados Unidos.

58. Moore, J.W., Pearson, R.G.,(1981). *Kinetics and Mechanism*, 3.º Ed., Wiley Interscience, New York NY.

59. Carey, F.A., Sundberg, R. J., (2007). *Advanced Organic Chemistry: Structure and mechanisms*, 5.º Ed, Springer, New York NY.

60. Perez, P., Toro-Labbe, A., & Contreras, R. (2001). Solvent Effects on Electrophilicity. *Journal of the American Chemical Society*, 123(23), pp 5527-5531.
61. Nahmany, M., Melman, A., (2004). Chemoselectivity of in reactions of esterification, *Org. Biomol. Chem.*, 2, pp 1563 – 1572.
62. University of Oxford Computing Services, *Primary, Secondary and Tertiary Amines*, http://users.ox.ac.uk/~mwalter/web_05/year1/organonitrogen/amines.shtml, 31 de agosto de 2011.

ANEXOS

ANEXO I: Certificado de análisis de la L-carnitina



Certificate of Analysis

8.40092.0025 L-Carnitine for synthesis

Batch S5330292

	Batch Values	
Assay (HClO ₄ , calc. on anhydrous substance)	100.1	%
Spec. rotation [α] _D 20 (c=10 in water)	-31.0	°
Water (K. F.)	0.1	%
Identity (IR)	passes test	

Date of examination (DD.MM.YYYY): 26.03.2009

Minimum shelf life (DD.MM.YYYY): 31.03.2014

Dr. Wolfgang Bolkart

responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature

ANEXO 2: Certificado de análisis del hidrocioruro de L-carnitina

3050 Spruce Street, Saint Louis,
MO, 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Product Name: L-CARNITINE HYDROCHLORIDE, SYNTHETIC

Product Number: C0283
Lot Number: 090M1883V
 Brand: SIGMA
 CAS Number: 6645-46-1
 MDL Number: MFCD00066100
 Formula: C7H15NO3 · HCl
 Formula Weight: 197.66 g/mol
 Recommended Retest Date:
 SEP 2012

Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White	White
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Color)	Colorless	Colorless
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear
50 mg/mL, H2O		
Carbon	41.4 - 43.6 %	42.7 %
Nitrogen	6.8 - 7.4 %	7.0 %
Specific Rotation	-25.000 - -21.000 °	-23.706 °
C = 0.86 in H2O at 25 deg C		
Purity (TLC)	98 %	100 %
Recommended Retest Period	-----	-----
2 Years		



Rodney Burbach, Manager
 Analytical Services
 St. Louis, Missouri US

Sigma-A ldrich w arrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-A ldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

ANEXO 3: Certificado de análisis del hidrocloreuro de O-acetil-L-carnitina

Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH

Product Name O-Acetyl-L-carnitine hydrochloride,
≥99% (titration), powder

Product Number A6706

Product Brand SIGMA

CAS Number 5080-50-2

Molecular Formula C₉H₁₇NO₄ · HCl

Molecular Weight 239.70

TEST **SPECIFICATION** **LOT 090M1946V RESULTS**

Appearance (Color)	White to Off-White	White
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Color)	Colorless	Colorless
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear
	100 mg/mL, H ₂ O	
Infrared spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Specific Rotation	-29.0 - -26.0 °	-27.6 °
	C = 1 in H ₂ O at 20 deg C	
Titration by AgNO₃	≥99 %	101 %
	Purity	
Recommended Retest Period	-----	-----

1
Year

Specification Date: SEP 2010

Date of QC Release: SEP 2010

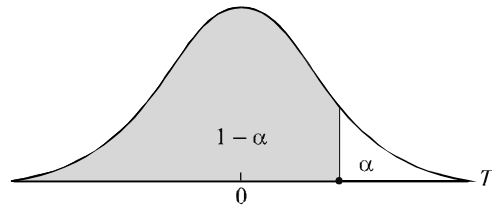
Recommended Retest Date: SEP 2011

Print Date: OCT 01 2010



Rodney Burbach, Manager
Quality Control
St. Louis, Missouri USA

ANEXO 4: Tabla de Distribución t de Student

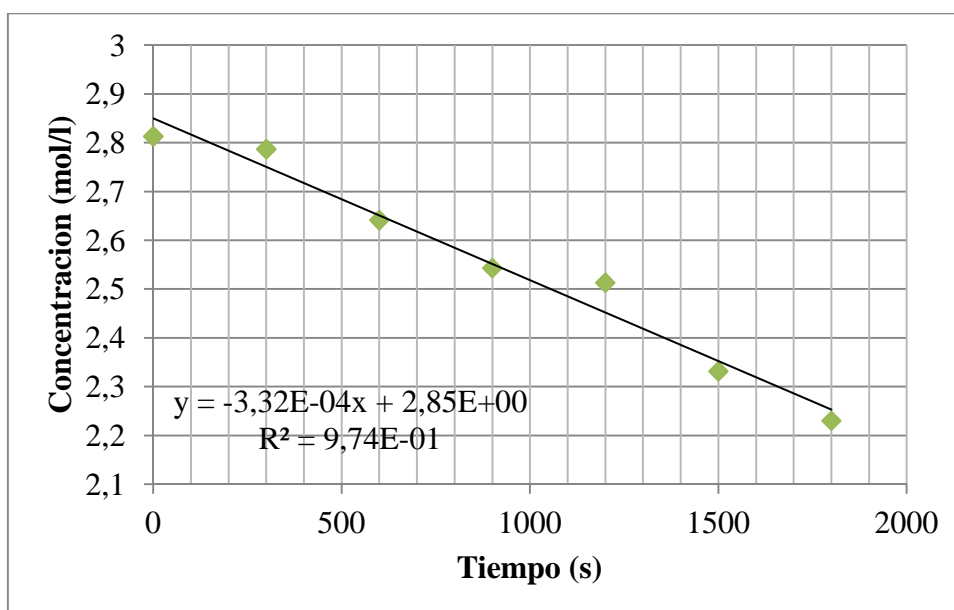


n	0.75	0.80	0.85	0.90	0.95	0.975	0.99	0.995
1	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657
2	0.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925
3	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841
4	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604
5	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032
6	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707
7	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499
8	0.706	0.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355
9	0.703	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250
10	0.700	0.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169
11	0.697	0.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106
12	0.695	0.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055
13	0.694	0.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012
14	0.692	0.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977
15	0.691	0.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947
16	0.690	0.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921
17	0.689	0.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898
18	0.688	0.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878
19	0.688	0.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861
20	0.687	0.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845
21	0.686	0.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831
22	0.686	0.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819
23	0.685	0.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807
24	0.685	0.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797
25	0.684	0.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787
26	0.684	0.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779
27	0.684	0.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771
28	0.683	0.855	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763
29	0.683	0.854	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756
30	0.683	0.854	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750
40	0.681	0.851	1.050	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704
60	0.679	0.848	1.046	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660
120	0.677	0.845	1.041	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617
∞	0.674	0.842	1.036	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576

ANEXO 5: Velocidades iniciales para el cloruro de acetilo

5.1. Concentraciones medidas cada cinco minutos con una concentración inicial de cloruro de acetilo de 2.81 M

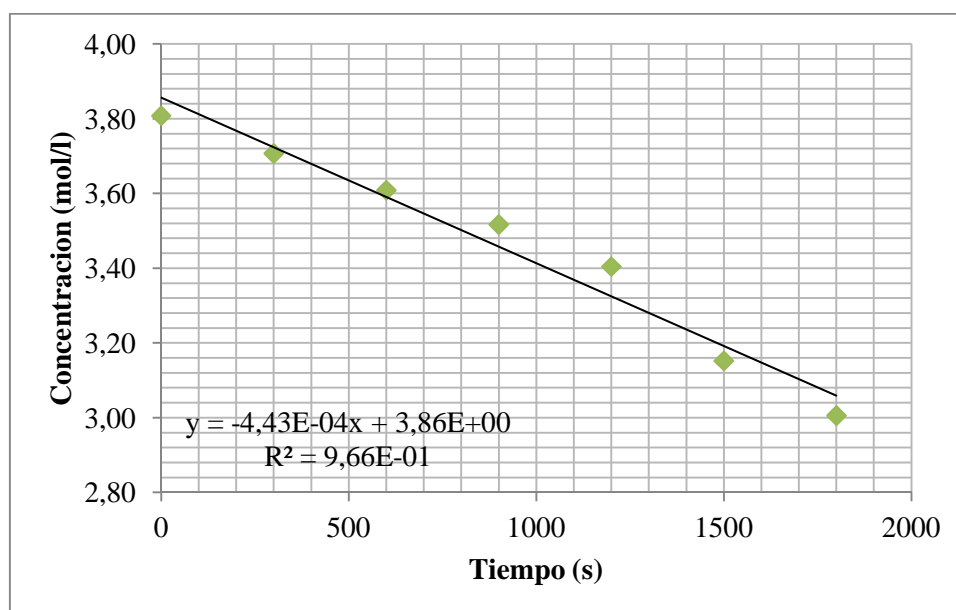
t (s)	Concentración (ml/l)	Concentración (g/l)	Concentración (mol/l)
0	200	221	2.81
300	198	219	2.79
600	188	207	2.64
900	181	200	2.54
1200	179	197	2.51
1500	166	183	2.33
1800	159	175	2.23



5.2. Determinación de la velocidad inicial del cloruro de acetilo con una concentración inicial de 2.81 M

5.3. Concentraciones medidas cada cinco minutos con una concentración inicial de cloruro de acetilo de 3.81 M

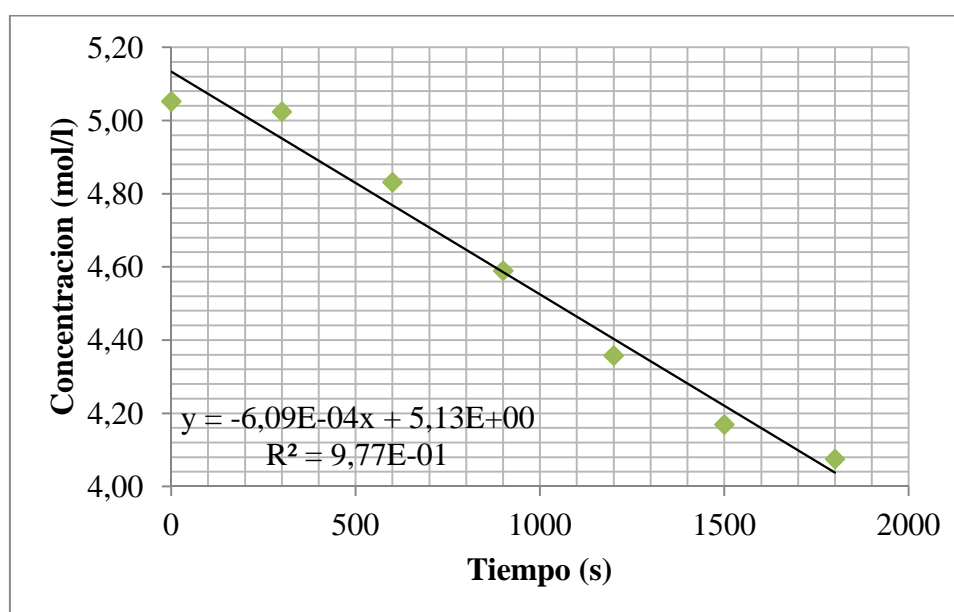
t (s)	Concentración (ml/l)	Concentración (g/l)	Concentración (mol/l)
0	300	299	3.81
300	292	291	3.71
600	284	283	3.61
900	277	276	3.52
1200	268	267	3.40
1500	248	247	3.15
1800	237	236	3.01



5.4. Determinación de la velocidad inicial del cloruro de acetilo con una concentración inicial de 3.81 M

5.5. Concentraciones medidas cada cinco minutos con una concentración inicial de cloruro de acetilo de 5.05 M

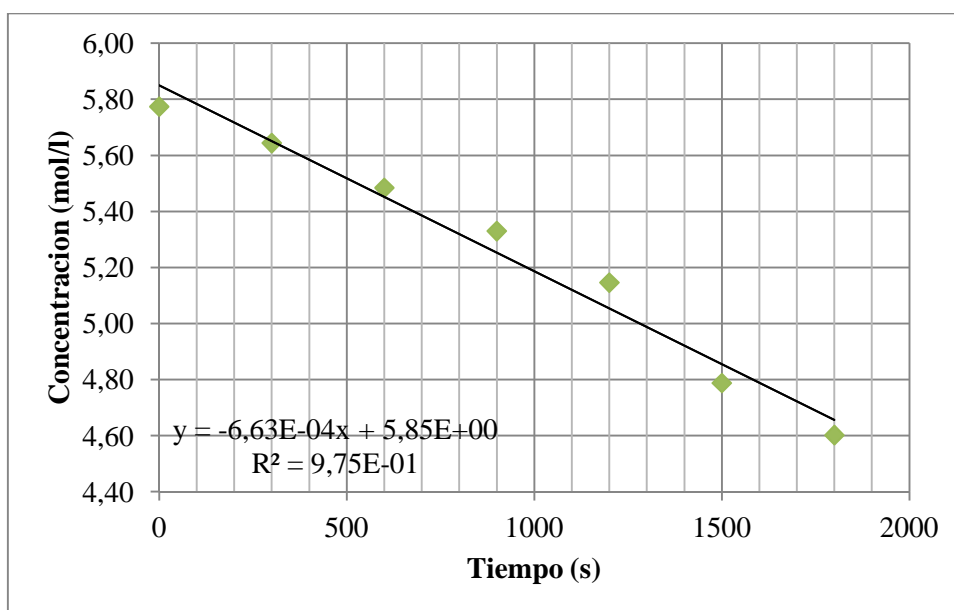
t (s)	Concentración (ml/l)	Concentración (g/l)	Concentración (mol/l)
0	350	386	5.05
300	348	384	5.02
600	335	369	4.83
900	318	351	4.59
1200	302	333	4.36
1500	289	319	4.17
1800	282	312	4.07



5.6. Determinación de la velocidad inicial del cloruro de acetilo con una concentración inicial de 5.05 M

5.7. Concentraciones medidas cada cinco minutos con una concentración inicial de cloruro de acetilo de 5.77 M

t (s)	Concentración (ml/l)	Concentración (g/l)	Concentración (mol/l)
0	400	442	5.77
300	391	432	5.64
600	380	419	5.48
900	369	408	5.33
1200	357	394	5.15
1500	332	366	4.79
1800	319	352	4.60

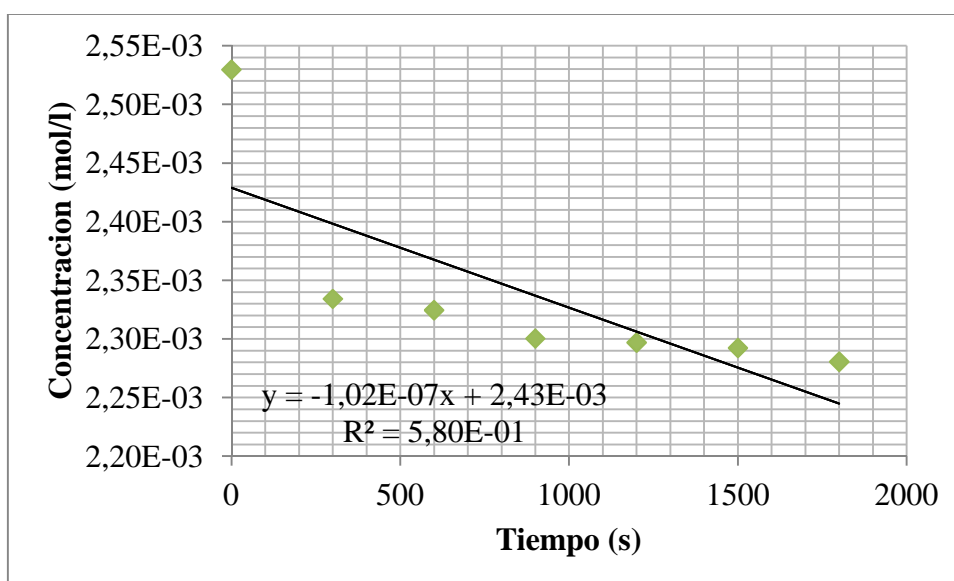


5.8. Determinación de la velocidad inicial del cloruro de acetilo con una concentración inicial de 5.77 M

ANEXO 6: Velocidades iniciales para el hidrocloreuro de L-carnitina

6.1. Concentraciones medidas cada cinco minutos con una concentración inicial de hidrocloreuro de L-carnitina de 2.53E-3 M

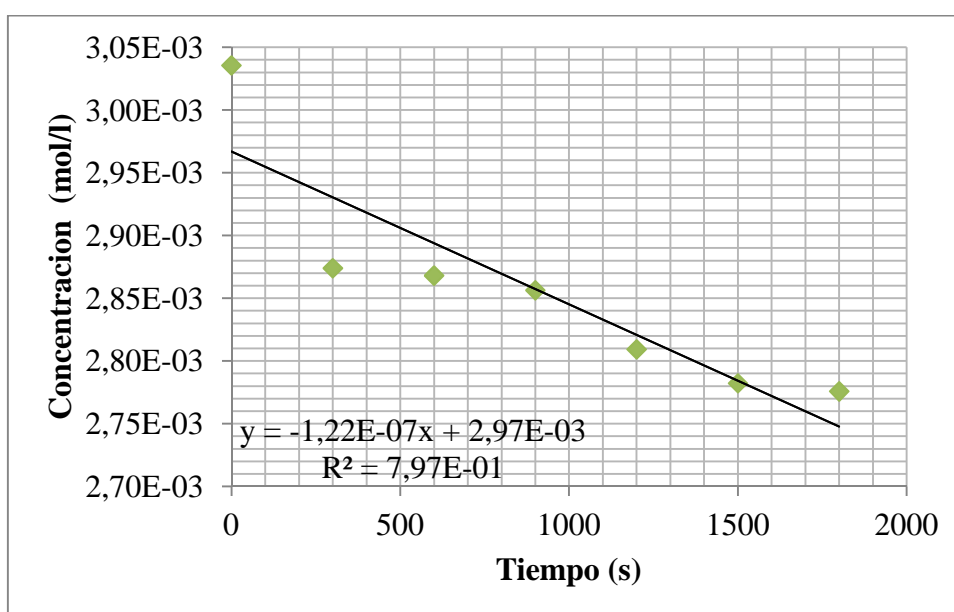
t(s)	Concentración (mg/l)	Concentración (mol/l)
0	5.00E+02	2.53E-03
300	4.61E+02	2.33E-03
600	4.59E+02	2.32E-03
900	4.55E+02	2.30E-03
1200	4.54E+02	2.30E-03
1500	4.53E+02	2.29E-03
1800	4.51E+02	2.28E-03



6.2. Determinación de la velocidad inicial del hidrocloreuro de L-carnitina con una concentración inicial de 2.53E-3 M

7.3. Concentraciones medidas cada cinco minutos con una concentración inicial de hidrocloreuro de L-carnitina de 3.04E-3 M

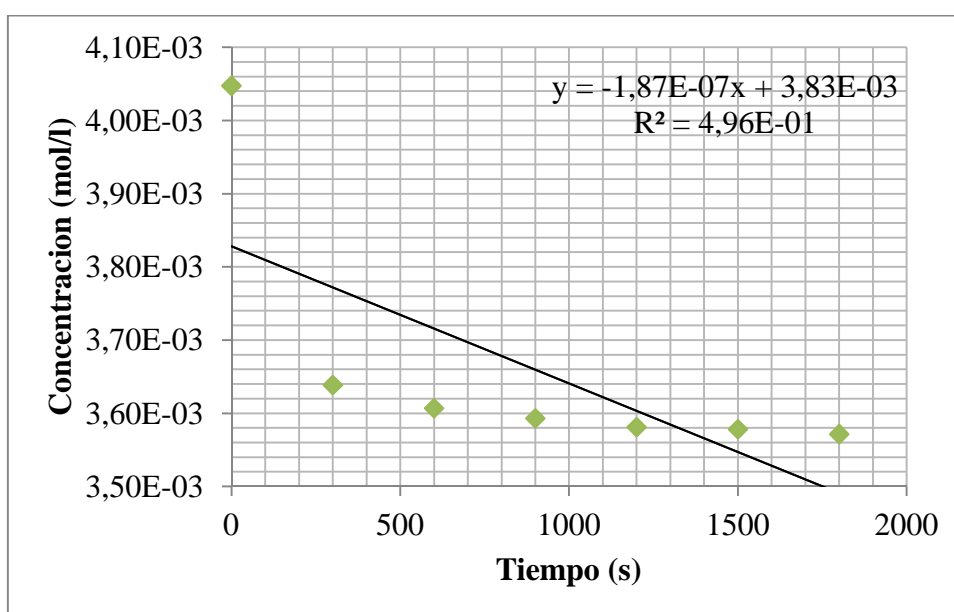
t(s)	Concentración (mg/l)	Concentración (mol/l)
0	600	3.04E-03
300	568	2.87E-03
600	567	2.87E-03
900	565	2.86E-03
1200	555	2.81E-03
1500	550	2.78E-03
1800	549	2.78E-03



7.4. Determinación de la velocidad inicial del hidrocloreuro de L-carnitina con una concentración inicial de 3.04E-3 M

7.3. Concentraciones medidas cada cinco minutos con una concentración inicial de hidrocloreuro de L-carnitina de 4.05E-3 M

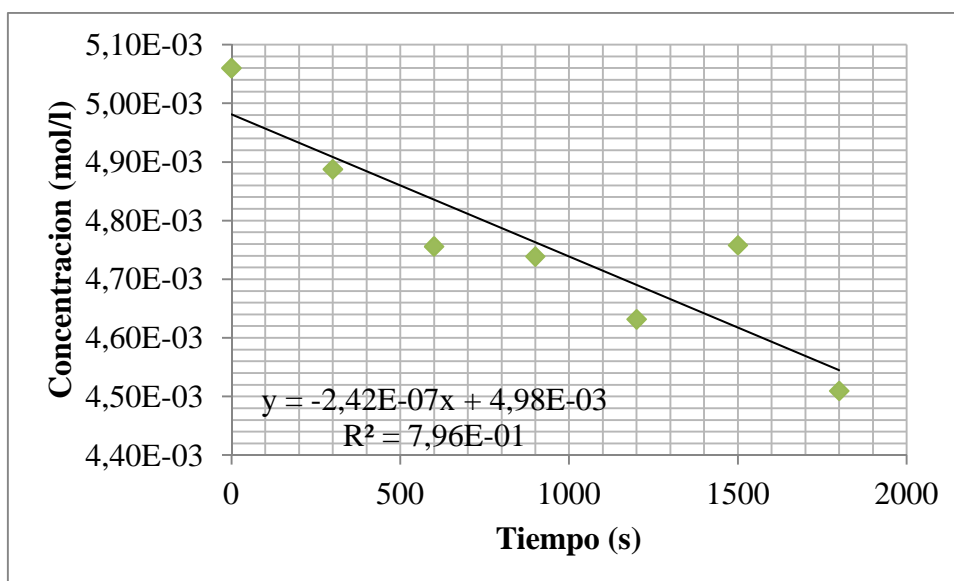
t(s)	Concentración (mg/l)	Concentración (mol/l)
0	800	4.05E-03
300	719	3.64E-03
600	713	3.61E-03
900	710	3.59E-03
1200	708	3.58E-03
1500	707	3.58E-03
1800	706	3.57E-03



7.6. Determinación de la velocidad inicial del hidrocloreuro de L-carnitina con una concentración inicial de 4.05E-3 M

7.7. Concentraciones medidas cada cinco minutos con una concentración inicial de hidrocloreuro de L-carnitina de 5.00E-3 M

t (s)	Concentración (mg/l)	Concentración (mol/l)
0	1000	5.06E-03
300	976	4.89E-03
600	950	4.76E-03
900	947	4.74E-03
1200	925	4.63E-03
1500	950	4.76E-03
1800	901	4.51E-03



7.8. Determinación de la velocidad inicial del hidrocloreuro de L-carnitina con una concentración inicial de 5.00E-3 M

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Pamela Carolina Carrillo Sánchez, C. I. 171481213-6, autora del trabajo de graduación titulado: “Extracción y caracterización de L-carnitina en Aguacate (*Persea americana*) mediante técnicas instrumentales y computacionales” previa la obtención del grado académico de **LICENCIADO/A EN CIENCIAS QUÍMICAS CON MENCIÓN EN QUÍMICA ANALÍTICA** en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENECYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 25 de noviembre de 2011

Srita. Pamela Carolina Carrillo Sánchez

C.I. 171481213-6