



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA – IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA**

Determinación de las constantes de inclusión
de complejos formados en el sistema
Curcumina-2-Hidroxipropil- β -Ciclodextrina
en medio acuoso y mezcla DMSO/Agua

Tesis que presenta
Linda Alzucena Luna Ortega
Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias (Química)

Asesor: Dr. Alberto Rojas Hernández

Jurado Calificador:

Presidente: Dra. María Teresa Ramírez Silva

Secretario: Dra. Gabriela Roa Morales

Vocal: Dra. María del Rosario Moya Hernández

Ciudad de México. Agosto 2017

Dedicatoria

A la luz de mi vida: Ian y Amy que sin saber me han dado parte de su tiempo.

Fernando mi apoyo incondicional y soporte siempre.

A mis padres.

Agradecimientos

La autora agradece a CONACyT por la beca de Maestría número 593165.

Además del financiamiento parcial de este trabajo al Programa de Desarrollo del Profesorado (PRODEP), de la Secretaría de Educación Pública (SEP), mediante la Red Nacional de Investigación en Química Analítica y Electroquímica (RedNIQAE); así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a través del proyecto 237997.

A mi asesor el Dr. Alberto por comprensión y apoyo.

A la Dra. Tere por su apoyo incondicional.

A la Dra. Gaby Roa y Dra. Rosario Moya por sus observaciones para enriquecer este trabajo.

Índice

Capítulo I Introducción

1.1 Curcumina	1
1.2 Ciclodextrinas	3
Propiedades físicas y químicas	4
Solubilidad	5
Determinación de constantes de inclusión.	7
1.3 Modelo teórico de especies monoméricas y diméricas para el ajuste visual en Excel de las constantes globales de formación en medio acuoso	8
Ejemplo de aplicación	9
1.4 Hipótesis	12
1.5 Objetivos	
Objetivo General	13
Objetivos Particulares	13

Capítulo II Experimentación

2.1 Instrumentación	14
2.2 Medio acuoso	14
pH 12	15
pH 10	15
2.3 Mezcla Equimolar DMSO/Agua	17

Capítulo II Resultados Medio Acuoso

3.1 pH=10.1	19
pH=10.1	17
pH= 11.41	21

Capítulo IV Resultados mezcla equimolar DMSO/Agua

4.1 Determinación pK_M	29
--------------------------	----

4.2 Caracterización de CD en la mezcla	30
4.3 Determinación de constantes de acidez de curcumina (UV-vis)	31
4.4 Determinación de constantes de acidez de curcumina (Fluorescencia)	36
4.5 Determinación de las constantes condicionales de acidez condicionales	39
4.6 Estudio de estabilidad seguida por Uv-vis	44
4.7 pH=9.24	45
4.8 pH=11.26	46
Conclusiones	47
Perspectivas	48
Referencias	49
Anexos	52

Resumen

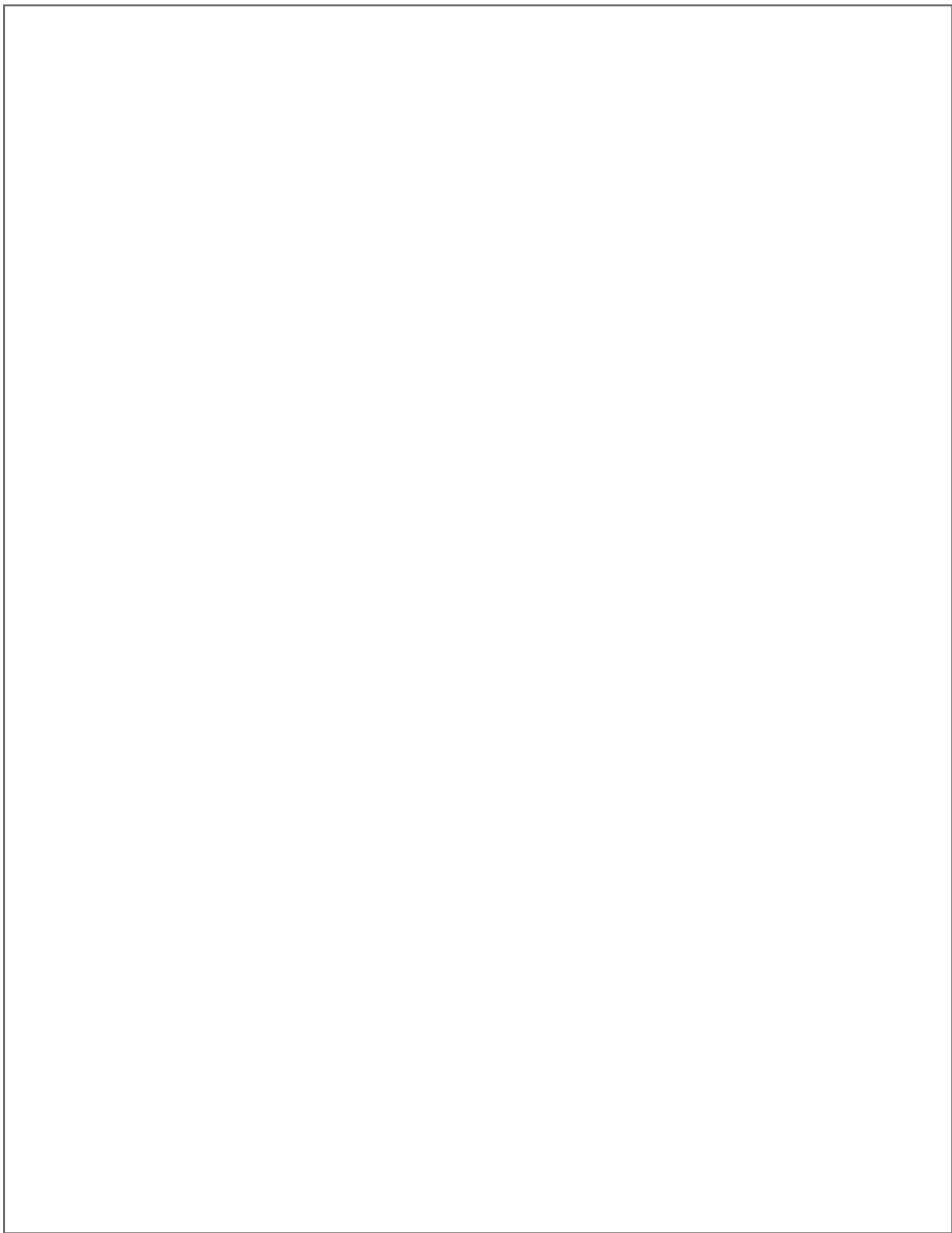
El presente trabajo está enfocado al estudio de la interacción de curcumina con la 2-Hidroxiopropil- β -Ciclodextrina (CD) en medio acuoso y en la mezcla equimolar DMSO-Agua.

Uno de los objetivos era estabilizar a la curcumina, ya que como se ha reportado en medio acuoso, es muy inestable en pH básico e insoluble en pH ácido; en este medio se logró la evidencia de la interacción de curcumina con CD a pH 10.2 y 11.4, siendo la especie predominante a pH 11.4 la que presentó estabilidad por 4 horas formando un complejo de estequiometría 1:2.

Uno de los problemas enfrentados experimentalmente fue mantener constante el pH a 11.4, así que debido a lo reportado para otras CDs con respecto a su propiedad ácido-base, se evidencia que la CD se desprotona, teniendo como primera aproximación un pKa 12.05 obtenido por potenciometría y polarimetría.

En cuanto al estudio de especiación en mezcla DMSO-Agua, se calculan las constantes globales de formación de la curcumina y las constantes condicionales de acidez en presencia de CD, donde se propone un modelo en el que dismuta la especie HCur²⁻.

Posteriormente se realiza una cinética de cada especie de curcumina, para identificar si en esta mezcla son estables, dando como resultado que la especie menos estable es la HCur²⁻.



Capítulo I Introducción

1.1 Curcumina

La *Cúrcuma longa* se ha utilizado tradicionalmente en los países asiáticos como una hierba medicinal para diversas patologías debido a sus propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias [2], antimicrobianas [3,4], y propiedades anti-mutagénicas contra el cáncer [5,6].

Los curcuminoides son un grupo de moléculas que constituyen mayoritariamente el rizoma de la planta *Cúrcuma Longa*, dan una coloración amarilla-naranja por la deslocalización dentro de las moléculas que exhibe absorción entre 420 y 430nm en un solvente orgánico, el grupo de curcuminoides está compuesto por curcumina, demetoxicurcumina y bisdemetoxicurcumina, con nombre IUPAC 1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6-heptadieno-3,5-diona, 4-hidroxicinamoil-(4-hidroxi-3-metoxicinamoil)metano y bis-(4-hidroxicinamoil)metano respectivamente. Las estructuras de estos constituyentes se presentan en la figura 1.1.1.

Este grupo de curcuminoides tienen tres características importantes:

- Un grupo aromático metoxifenólico
- Enlaces α , β -insaturados
- Tautomerismo ceto-enol

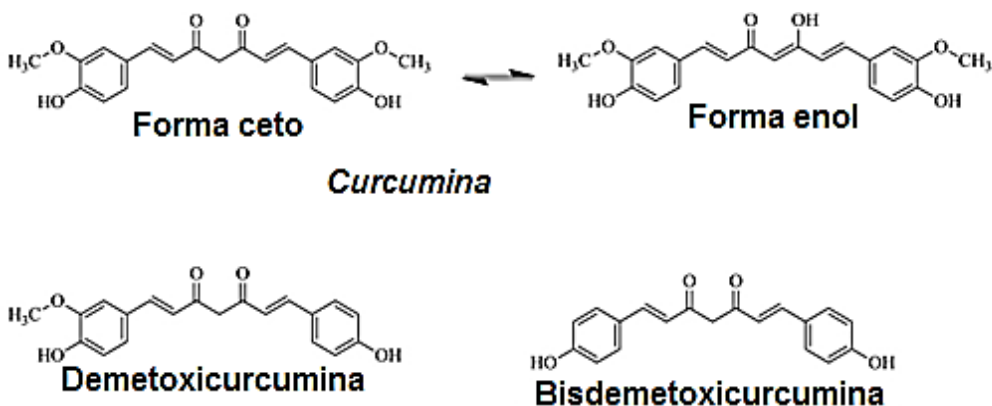


Figura 1.1.1 Estructuras químicas importantes presentes en el rizoma de la planta *Cúrcuma Longa*

La curcumina, también llamada comúnmente diferuloilmetano, es el más abundante del grupo curcuminoides (77% del peso total) [8] y este grupo constituye alrededor del 5% del componente total de la planta *cúrcuma longa*.

En relación con las propiedades de solubilidad, la curcumina es soluble en soluciones alcalinas o en disolventes extremadamente ácidos [7], algunos investigadores han concluido que los grupos metoxi en los anillos de fenilo en la curcumina son importantes para tener efectos positivos sobre la salud [9], por ello es que se cree que la curcumina es la molécula del grupo de curcuminoides que actúa de manera benéfica a distintas patologías.

Sin embargo, uno de los principales problemas para el estudio de las propiedades de esta molécula es su rápida descomposición, desde hace tiempo y recientemente se han propuesto diferentes mecanismos de degradación de la curcumina, en los cuales diferentes autores han discutido algunos factores que influyen en su pronta degradación:

Fácilmente oxidada por el oxígeno presente en el aire

La exposición a la luz cataliza la oxidación

Recientemente Griesser^[10] realiza diferentes técnicas experimentales en las que evidencia que el componente mayoritario de la descomposición de la curcumina no es el *trans*-6-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2,4-dioxo-hexenal que había obtenido por HPLC Ying-Jan^[11] sino que el mecanismo más probable de degradación es por la autooxidación de la curcumina como se muestra en la Figura 1.1.2

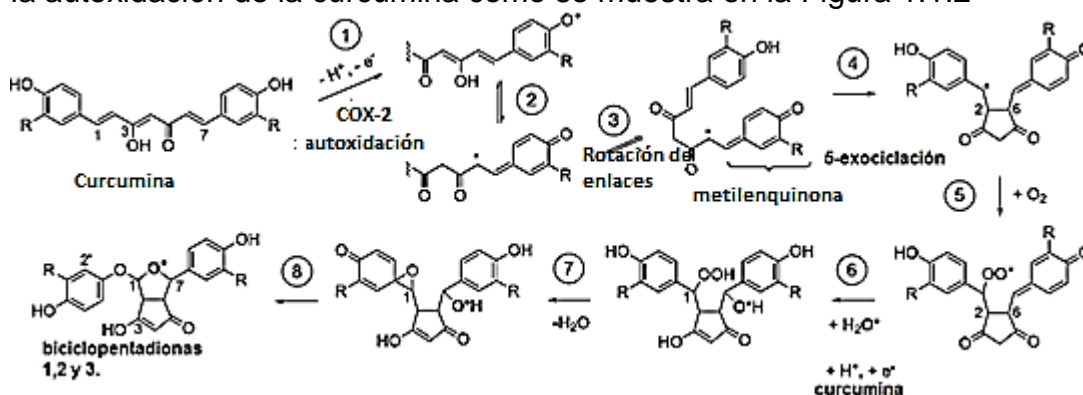


Figura 1.1.2 Mecanismo posible de degradación de la curcumina en buffer de Tris-HCl pH 8 acuoso propuesto por Griesser^[10]

Sin embargo, existe la posibilidad de que el producto intermedio de metilenquinona o el producto de biciclo-pentadionas sean biológicamente activos y responsables de algunas de las actividades de la curcumina.

La metilenquinona derivada de compuestos fenólicos naturales forman fácilmente aductos con glutatión y macromoléculas celulares [12,13], y la actividad antitumoral de muchos fármacos quimioterapéuticos como mitomicina C, está mediada por la formación de un reactivo metilenquinona [14,15]. Con este argumento, se ha observado la formación de aductos de proteínas covalentes por curcumina, por ejemplo, con la tioredoxina reductasa [16] y en la reticulación de los polipéptidos reguladores de conductancia transmembrana de la fibrosis quística [17]. Estos

aductos podrían haberse formado por la metilquinona más que por la propia curcumina.

La posibilidad de activación oxidativa debe considerarse como un mecanismo potencial de la actividad terapéutica de la curcumina.

A pesar de las evidencias reportadas sobre la actividad de una de las moléculas que intervienen en el proceso de degradación, por ahora, se trata de estabilizar a la curcumina con la CD.

1.2 Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas (CDs) pertenecen a la familia de los oligosacáridos cíclicos y están constituidas por n unidades de D-glucopiranosas unidas por enlaces (1-4) α -glucosídicos (Fig 1.2.1) [11].

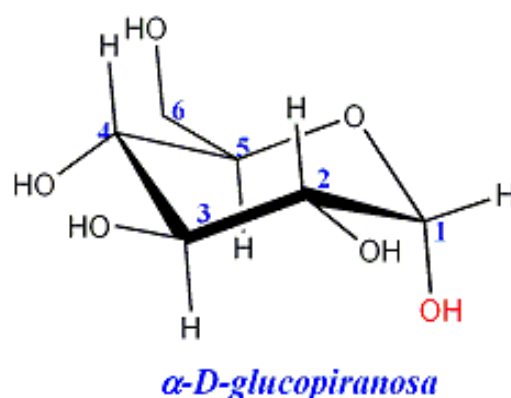


Figura 1.2.1 α -D-Glucopiranososa, unidad fundamental de las n -Ciclodextrinas.

La nomenclatura más aceptada para identificar a las CDs, consiste en proporcionar el nombre de acuerdo al número de unidades de D-glucopiranosas; de seis, siete y ocho unidades de D-glucopiranosas respectivamente (α , β y γ -CDs) como se muestra en la Fig. 1.2.2. Estas CDs también son conocidas como ciclooligoamilosas y se denominan como ciclohexaamilosa (CA6), cicloheptaamilosa (CA7) y ciclooctaamilosa (CA8). La estructura geométrica, de las CDs no es completamente cilíndrica, ya que presentan una forma de cono o canasta [11]

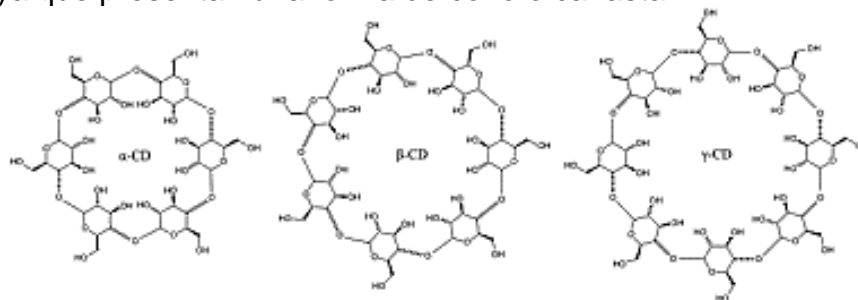


Figura 1.2.2. α -Ciclodextrina, β -Ciclodextrina y γ -Ciclodextrina formada por seis, siete y ocho unidades de α -D-glucopiranosas respectivamente.

La estructura de las unidades sacáridas de las CDs, presenta un mínimo energético en la conformación 4C_1 , en el borde superior se encuentran todos los grupos hidroxilo secundarios de C-2 y C-3; en torno al borde inferior están colocados los primarios de C-6 (Fig. 1.2.1 y 1.2.2) [11-13]. La cavidad está estructurada por un anillo de átomos de hidrógeno (enlazados a C-5), un anillo de átomos de oxígeno del enlace α -D-glucosídico y otro anillo de átomos de hidrógeno (enlazado a C-3), haciendo la cavidad relativamente apolar. Los pares de electrones no enlazados del oxígeno glucosídico están direccionados hacia el interior de la cavidad, produciendo una alta densidad electrónica, proporcionando a éstas algunas características de base de Lewis.

El segundo anillo de hidrógeno está formado por los grupos hidroxilo de C-2-OH de una unidad α -D-glucopiranososa y C-3-OH de la unidad α -D-glucopiranososa adjunta, estabilizando la molécula de CD.

Propiedades físicas y químicas.

Las CDs son compuestos cristalinos, homogéneos, no higroscópicos. Además, debido a que su unidad fundamental es un azúcar tienen actividad óptica ya que son moléculas quirales dextrógiras, debido a los centros asimétricos que se encuentra en el carbono 2 (de su unidad fundamental). Esta propiedad es muy útil para separar o identificar moléculas de inclusión que tengan propiedades ópticas o bien, separar moléculas que se encuentren en una mezcla racémica.

En la figura 1.2.3, se muestran la forma y dimensiones geométricas de las CDs. así como en la tabla 1.2.1, se presentan las propiedades físicas más importante. [11,22]

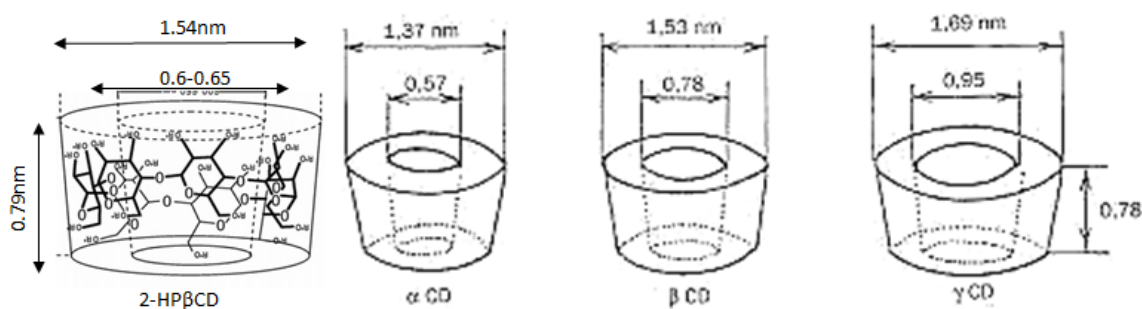


Figura 1.2.3. Forma y dimensión geométrica de la 2-Hidroxipropil- β , α , β y γ -Ciclodextrinas

Las propiedades físicas y químicas que poseen cada una de estas CDs dista principalmente en la solubilidad, en la tabla 1.2.1, se muestra la comparación

Tabla 1.2.1 Propiedades físicas de la 2-HP β CD, α , β y γ Ciclodextrinas

	Kleptose HP β CD 4.5 [22]	α -CD [11]	β -CD [11]	γ -CD [11]
unidades de glucosa	7	6	7	8
peso molecular /gmol ⁻¹	1399	972	1135	1297
solubilidad en agua a temperatura ambiente/ g 100 mL ⁻¹	65	14.5	1.85	23.2
Rotación específica $[\alpha]_D$ 25 °C	No reportada	150 \pm 0.5	162.5 \pm 0.5	177.4 \pm .5
diámetro de la cavidad/ Å	62	4.7–5.3	6.0–6.5	7.5–8.3
diámetro externo/Å	15.4	14.6 \pm 0.4	15.4 \pm 0.4	17.5 \pm 0.4
Altura/ Å	79	78	78	78
volumen aproximado de la cavidad, Å ³	262	174	262	427
pKa (por potenciometría) a 25 °C	No reportada	12.332	12.202	12.081
Punto de fusión (°C)	No reportada	No reportada	290	300
Punto de descomposición (°C)	300	No reportada	300	No reportada

Solubilidad

Una de las propiedades más importantes de las CDs nativas (α , β y γ), está relacionada con la distribución de los grupos hidrofílicos e hidrofóbicos. Los grupos hidroxilo hidrofílicos ocupan ambos extremos del cono, favorecen la solubilidad en agua de las CDs. La parte interna de la cavidad, es hidrofóbica, por estar cubierta de hidrógenos C-3-H, C-5-H y C-6-H₂ y de oxígenos O-4 del enlace glucosídico.

En cuanto a la 2-Hidroxipropil- β -ciclodextrina tiene una mayor solubilidad acuosa (por encima de 60%). Sin embargo, los dos rasgos característicos a tener en cuenta son que tiene una alta solubilidad acuosa y baja toxicidad, éstas características combinadas ofrecen grandes oportunidades para la formulación de fármacos:

- El proceso de formación de complejos con fármacos se facilita mucho comparado con β CD nativa [22]
- La seguridad biológica de este excipiente permite un uso más amplio y vías de administración. [22]
- Una alta solubilidad acuosa: A 25°C, 65% 2-HP β CD es soluble en agua; a 50°C, es 80% soluble. A temperaturas más altas, la viscosidad de la solución disminuye [22], lo que facilita el aumento de la disolución.

El interés por estudiar la solubilidad de las CDs, se debe a que conociendo su estructura en solución acuosa se podrá dilucidar con mayor precisión el tipo de interacciones que participan en la formación de los complejos de inclusión, así como su estequiometría.

En general las CDs son muy solubles en solventes polares apróticos (medio adecuado para la síntesis de CD modificadas, tales como dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), N,N-dimetilacetamida y piridina), mientras que son poco solubles en disolventes como etanol, metanol y glicerol [16].

Determinación de las constantes de inclusión

Las CDs forman un tipo particular de compuestos denominados “complejos de inclusión”, los cuales están formados por una molécula denominada “huésped”, que se aloja en la cavidad de la molécula denominada “anfitrión” como las CDs.

Las interacciones predominantes en los complejos de inclusión son las fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y efectos estéricos, las cuales provocan cambios importantes en las propiedades de las CD, tales como aumentar su solubilidad, reactividad química, conformación estructural y en solución disminuyen la volatilidad del solvente, entre otras. Por estas razones, las CD tienen una gran aplicación en la industria química, por ejemplo, en la industria farmacéutica como sistema de liberación y aumento en la solubilidad de fármacos, en la industria alimentaria como preservativo de olores y sabores, en el área biológica para asemejar sitios activos de enzimas, e imitar de algún modo los mecanismos de reconocimiento molecular que forman parte importante de los procesos bioquímicos.

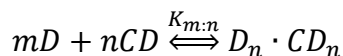
En general cuando una molécula forma un complejo con ciclodextrina, la molécula, en parte o en su totalidad, se incluye en la cavidad de la ciclodextrina que es lipofílica. En otras palabras, un complejo de inclusión del anfitrión y ciclodextrina es frecuentemente de estequiometría 1:1, aunque no es la única estequiometría, también hay reportes de la 1:2 y 2:1, la cual se determina a través de estudios de resonancia magnética nuclear (NMR) [17], pero estos se llevan a cabo típicamente en soluciones diluidas.

El modelado teórico también se puede utilizar para evaluar la interacción estérica de complejación y se han utilizado para predecir la naturaleza de la interacción molécula-ciclodextrina, ya sea en soluciones ideales o en vacío. Aunque estos enfoques teóricos continúan mejorando, en la actualidad tienden a ser descripciones simplificadas e ignoran aspectos importantes de la formación de complejos con ciclodextrina y su estructura, especialmente en soluciones concentradas (es decir, no ideales).

En solución acuosa, las moléculas libres están en equilibrio con moléculas unidas a las moléculas de ciclodextrina. Las dos características más importantes de los complejos son su estequiometría y sus constantes de equilibrio.

Por ello es de importancia poder definir una constante de equilibrio de inclusión:

Sí m moléculas (D) se asocian con n moléculas de ciclodextrina (CD) para formar un complejo (D_m·CD_n), el siguiente equilibrio general se logra:



donde K_{m,n} es la constante de estabilidad del complejo molécula / ciclodextrina.

En general, las propiedades fisicoquímicas de las moléculas libres son diferentes de los unidos a las moléculas de ciclodextrina. Del mismo modo, las propiedades fisicoquímicas de las moléculas de ciclodextrina libres son diferentes a los del complejo.

Para caracterizar la o las especies formadas, cualquier metodología se puede utilizar para observar cambios en las propiedades fisicoquímicas y ser utilizado para determinar la estequiometría de los complejos formados junto con los valores numéricos de sus constantes de estabilidad ^[18] estos incluyen cambios en la solubilidad, cambios en la reactividad química, los cambios en absorbancia UV/VIS, cambios en la fluorescencia, desplazamientos químicos en RMN, cambios en la retención de anfitrión (por ejemplo, en la cromatografía de líquido), cambios en los valores de pKa, mediciones potenciométricas, cambios en el ángulo de rotación específico, etc.

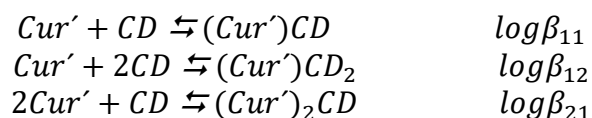
La estequiometría de los complejos de molécula/ ciclodextrina y los valores numéricos de las constantes de estabilidad deben ser independientes de la metodología aplicada, sin embargo, estos su desviación dependerá del método específico utilizado para la determinación, ya que algunos métodos son más sensibles.

Una vez expuestas las propiedades de cada una de las moléculas a estudiar, a continuación se presenta un modelo para ajuste en Excel de sigmoides de respuesta en función de la razón molar y pCD_{total}.

1.3 Modelo teórico de especies monoméricas y diméricas para el ajuste visual en Excel de las constantes globales de formación en medio acuoso y/o mezcla equimolar DMSO/Agua

Para ver la generalización ver **Anexo 1**.

Partimos de los equilibrios globales de formación de estequiometría 1:1, 1:2 y 2:1, donde Cur' es la curcumina en sus diferentes grados de protonación (Cur' ≡ H₃Cur + H₂Cur⁻ + HCur²⁻ + Cur³⁻) y CD es 2-Hidroxipropil β-Ciclodextrina, por simplicidad omitiremos la carga



Definimos la concentración total de curcumina, la cual consideramos constante, y las fracciones de cantidad o componente que contienen curcumina, de la siguiente manera:

$$[Cur]_{total} = [Cur'] + [(Cur')CD] + [(Cur')CD_2] + 2[(Cur')_2CD] = Constante$$

$$f_{Cur} = f_{10} = \frac{[Cur']}{[Cur]_{total}}$$

$$f_{CurCD} = f_{11} = \frac{[(Cur')CD]}{[Cur]_{total}}$$

$$f_{CurCD_2} = f_{12} = \frac{[(Cur')CD_2]}{[Cur]_{total}}$$

$$f_{Cur_2CD} = f_{21} = \frac{2[(Cur')_2CD]}{[Cur]_{total}}$$

Redefiniendo:

$$[Cur]_{total} = [Cur'] + \beta_{11}[Cur'][CD] + \beta_{12}[Cur'][CD]^2 + 2\beta_{21}[Cur']^2[CD]$$

$$f_{10} = \frac{1}{1 + \beta_{11}[CD] + \beta_{12}[CD]^2 + 2f_{10}\beta_{21}[CD][Cur]_{total}}$$

$$f_{11} = f_{10}\beta_{11}[CD]$$

$$f_{12} = f_{10}\beta_{12}[CD]^2$$

$$f_{21} = 2f_{10}\beta_{21}[CD] = 2f_{10}^2\beta_{21}[CD][Cur]_{total}$$

Por la manera en que se define la fracción f_{10} , podemos llegar a la siguiente ecuación cuadrática:

$$2f_{10}^2\beta_{21}[CD][Cur]_{total} + f_{10}(\beta_{12}[CD]^2 + \beta_{11}[CD] + 1) - 1 = 0$$

Con la ecuación anterior obtenemos el diagrama de distribución para especies mono y diméricas.

Ahora para poder modelar un experimento suponemos una respuesta lineal con respecto a la concentración de cada una de las especies y además que todas las especies contribuyen a la respuesta obtenida experimentalmente, definida de la siguiente manera:

$$\rho = \delta_{Cur}[Cur'] + \sum_{j=1}^n \delta_{CurCD_j}[(Cur')CD_j] + \delta_{CD}[CD]$$

Donde δ representa un factor de respuesta.

Ejemplo de aplicación

Los valores de constantes globales de formación y factores de respuesta para la simulación presentada a continuación están dados de manera que puedan predominar las 3 especies en un sistema, es decir son abstractos.

Ahora bien, ya que están definidas las expresiones para el cálculo de las fracciones de un sistema que incluye especies mono y diméricas, se propone el siguiente sistema:

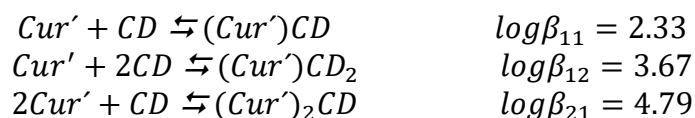


Tabla 1.3.1 Parámetros utilizados para modelar curvas de valoración.

[curcumina] total = 0.012M a un valor de pH impuesto			
δ_{Cur}	8	$\delta_{(Cur')CD_2}$	65
δ_{CD}	0	$\delta_{(Cur')_2CD}$	90
$\delta_{(Cur')CD}$	12		

Los anteriores son propuestos de manera que la especie 2:1 pueda predominar.

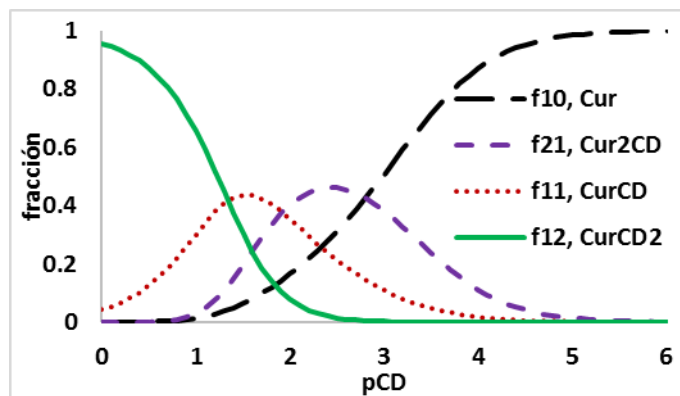


Figura 1.3.1. Diagrama de distribución de especies que contienen curcumina, la intersección de las curvas representa el $\log K_f$ de cada especie.

Podemos observar que se requieren no solo constantes globales de formación “altas” para la formación del dímero, sino que también es necesario considerar soluciones de concentración de curcumina del orden de $10^{-2}M$.

En cuanto a los factores de respuesta, solo son ilustrativos, para observar una sigmoide definida en una gráfica de ρ vs pCD libre o total y ρ vs $r([CD]/[Cur])$, las cuales son clásicas en determinación de constantes de equilibrio, complejación o inclusión.

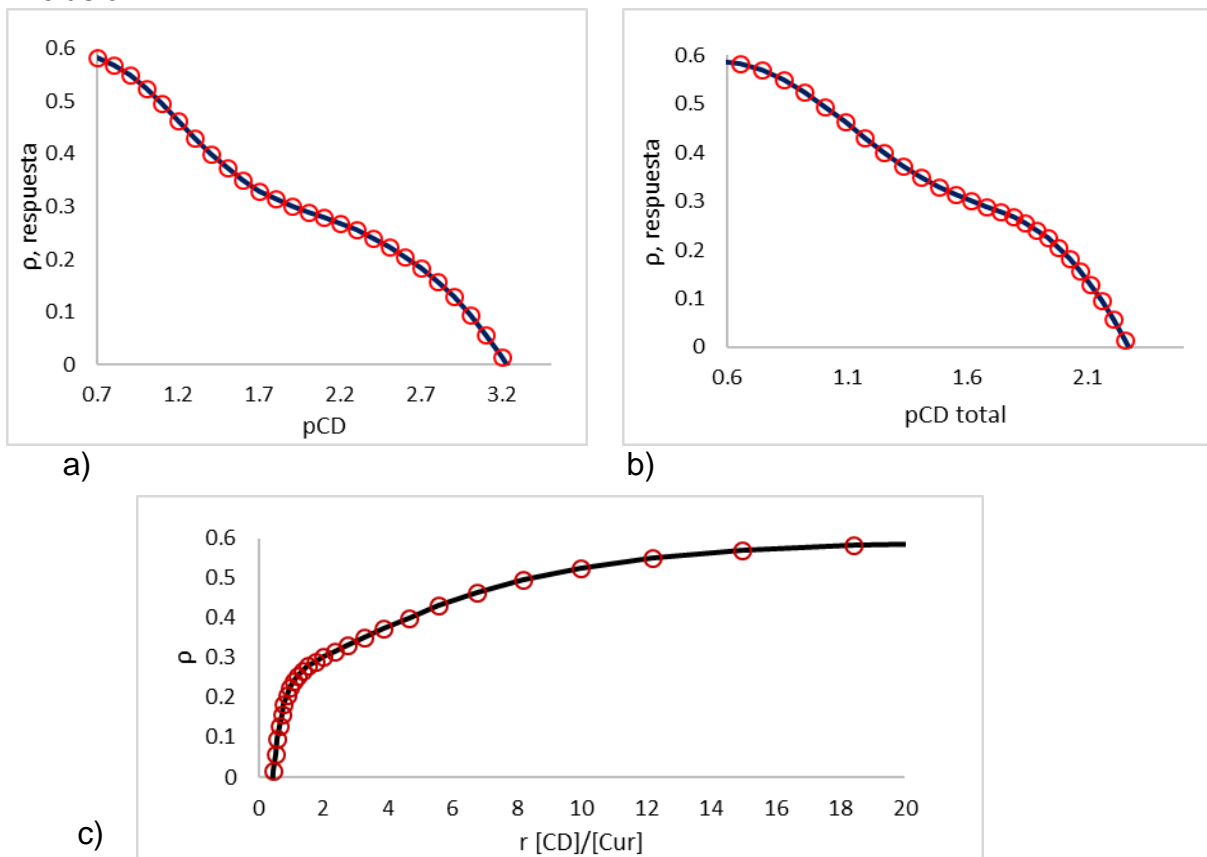


Figura 1.3.2. Curvas modeladas de una valoración de curcumina $1.2 \times 10^{-2} M$ con $6 \times 10^{-4} M < [CD] < 0.24 M$ con los parámetros de la tabla 1.3.1

- a) Respuesta (ρ) en función de pCD libre en el intervalo que se puede trabajar experimentalmente
- b) Respuesta (ρ) en función de pCD total en el intervalo que se puede trabajar experimentalmente
- c) Respuesta (ρ) en función la razón molar en el intervalo que se puede trabajar experimentalmente

Sin embargo, como esta reportado en la literatura las constantes de inclusión son poco cuantitativas, lo que es más evidente en una representación gráfica de la respuesta obtenida en función de la razón molar donde no es de esperar poder obtener la estequiometría por el punto de intersección de dos rectas, ver figura 1.3.2

En la gráfica p vs p_{CD} alcanzan a distinguirse 3 puntos de inflexión al igual que en la gráfica en función de $p_{CDtotal}$, la diferencia dista en que, en la primera, si la reacción fuese cuantitativa los puntos de inflexión nos darían un aproximado a la constante global de formación, pero no es posible medir p_{CD} ($p_{CDlibre}$), así, de la curva en función de $p_{CDtotal}$ no se obtendrá información sobre la constante global de formación, sólo si fuesen evidentes los puntos de inflexión se asocian a el número de especies o de equilibrios presentes.

En cuanto a la curva de p vs razón molar, como se menciona anteriormente, debido a la poca cuantitatividad se observa curvatura a valores de r pequeñas, no se puede determinar la estequiometría de los complejos formados por este método precisamente porque pueden estar involucrados más de un equilibrio en la reacción y el método de razones molares clásico para la obtención de la estequiometría comúnmente en libros a nivel licenciatura solo lo plantean para una reacción cuantitativa mediante la intersección de rectas perfectas en una gráfica de p vs r , sin embargo, si será de utilidad para ajustar visualmente los valores experimentales.

Ahora bien, hasta el momento se ha exhibido una propuesta para la obtención de algunos parámetros fisicoquímicos como son las constantes globales de formación de manera que se tengan unos valores numéricos previos antes de hacer uso del programa computacional SQUAD.

1.4 Hipótesis

Se sabe que la curcumina es una molécula muy inestable en medio acuoso, si se perturba el medio con 2-HPbCD (CD) o el medio de disolución cambia, se espera que la estabilidad mejore.

1.5 Objetivos.

General

- Determinar por espectroscopia UV-visible, fluorescencia o por polarimetría, la estequiometría del o los complejos formados entre Curcumina y CD, en medio acuoso y en una mezcla equimolar DMSO/Agua a diferentes valores de pH, así como las constantes globales de formación.

Particulares

- Obtener los espectros de absorción y en su caso de fluorescencia o ángulo de rotación del sistema Curcumina-CD a un cierto valor de pH
- Ajustar los resultados experimentales en medio acuoso y mezcla equimolar con el modelo robusto para especies monoméricas y diméricas, para relaciones molares, en estequiometría 1:1, 1:2 y 2:1
- Determinar el pK_M de la mezcla equimolar DMSO/Agua mediante una valoración ácido-base seguida por potenciometría
- Determinar el ángulo de rotación molar de la CD en medio acuoso y en la mezcla equimolar DMSO/Agua.
- Refinar con SQUAD las constantes globales de formación de la curcumina en la mezcla equimolar DMSO/Agua con datos de espectrofotometría UV-vis y de fluorescencia
- Refinar con SQUAD las constantes globales de formación de los equilibrios formados en el sistema curcumina-CD, obtenidas con los datos experimentales por Espectroscopia UV-vis en medio acuoso y mezcla equimolar DMSO/Agua
- Determinar el ángulo de rotación molar de la(s) especie (s) formada (s) en medio acuoso y en la mezcla equimolar DMSO/Agua por polarimetría.

Capítulo II Experimentación

2.1 Instrumentación

Espectrofotómetro UV-vis Perkin Elmer lambda 950
Celdas de cuarzo Perkin Elmer de 1cm de longitud de paso óptico
Espectrofotómetro de fluorescencia Perkin Elmer LS 55
Potenciómetro Sesión PH 31 Hach
Polarímetro Anton Paar MCP 300
Electrodo combinado de vidrio Ag/AgCl de gel 5010T
Recirculador LAUDA E300

2.2 Medio acuoso

En principio, basándonos en los valores de pKa reportados por Bernabé-Pineda [21] se plantea evidenciar la interacción de Curcumina con CD con cada una de las especies que predominan a un cierto valor de pH

pKa1 =	10.51
pKa2 =	9.88
pKa3 =	8.38

Así que se hará un estudio a un valor de pH constante en que predomine alguna especie variando la concentración de la CD.

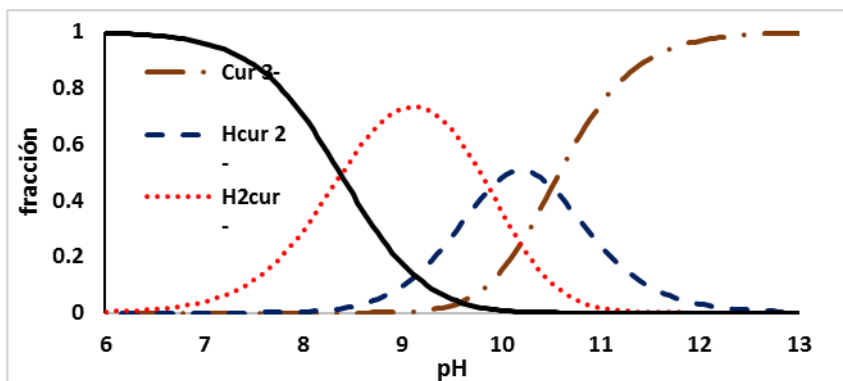


Figura 2.2.1. Diagrama de distribución de especies para Curcumina obtenido a partir de datos reportados. [21]

Sistemas predominio de la especie Cur^{3-}

Se preparan las siguientes soluciones, una vez preparados los sistemas se obtiene el espectro de absorción y el ángulo de rotación a 589nm.

Solución $2.5 \times 10^{-4} \text{M}$ y 2.08×10^{-5} de Curcumina en NaOH 0.01 M valorada J.T Baker, almacenada en un frasco ámbar (pH cercano a 12, predominio de la especie totalmente desprotonada).

Estudio de estabilidad

Se realiza previamente una cinética de la curcumina seguida por espectroscopia UV-Visible, ya que como se menciona anteriormente ésta se descompone a pH alcalino.

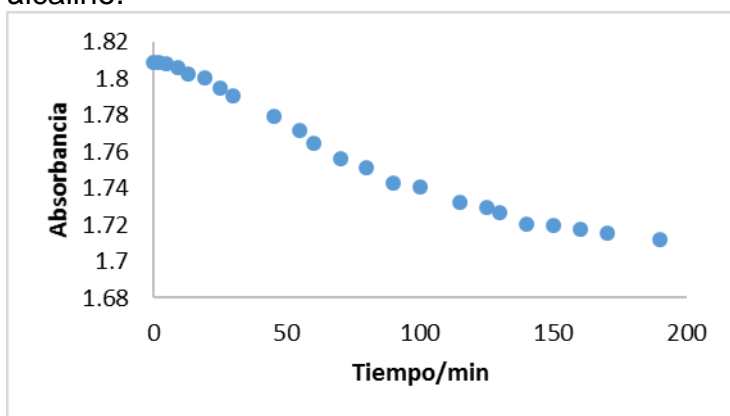


Figura 2.2.2 Gráfica de absorción a 470nm de curcumina $2.08 \times 10^{-5} \text{M}$ en función del tiempo

Al cabo de 200min solo se descompuso el 4.2% por lo tanto podemos hacer una valoración puntual a este pH para evitar tener una cierta fracción de concentración de moléculas de descomposición de curcumina incluida parcial o totalmente en la ciclodextrina.

Se preparan diferentes sistemas manteniendo constante la concentración de curcumina $2.5 \times 10^{-5} \text{M}$ con $0 < [\text{CD}] < 0.09 \text{M}$, en fresco y almacenados en frasco ámbar

El agua de disolución es desionizada en Mili-Q a $18.5 \text{M}\Omega$, fría ($T=18^\circ\text{C}$) y burbujeada en nitrógeno.

Sistemas pH de predominio HCur^{2-}

Se preparan las siguientes soluciones, una vez preparados los sistemas se obtiene el espectro de absorción.

Solución $2.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ de Curcumina en $\text{NaOH } 10^{-5} \text{ M}$ valorada J.T Baker, almacenada en un frasco ámbar (pH aproximadamente 10, predominio de la especie totalmente monoácida).

Estudio de estabilidad

Se realiza previamente una cinética de la curcumina seguida por espectroscopia UV-Visible, para comparar con la cinética a pH 10.

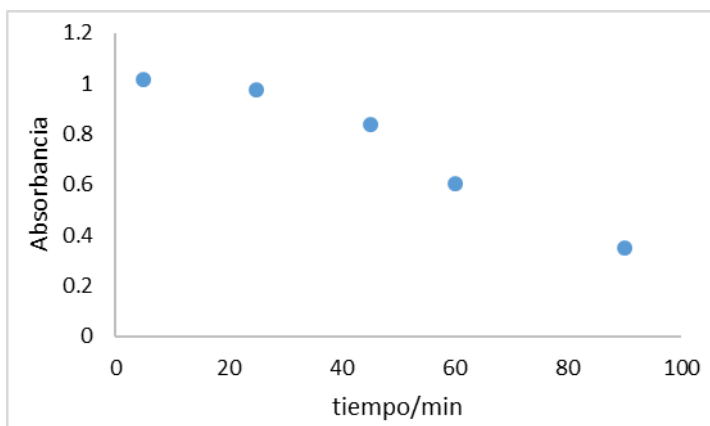


Figura 2.2.3 Gráfica de absorbancia a 460nm de curcumina $2.3 \times 10^{-5} \text{ M}$ en función del tiempo.

Al cabo de 90 min se descompuso el 30%, a este pH se tiene una ventana de trabajo menor a 20 min para evitar la interacción de algún compuesto de degradación de la Curcumina con CD, se espera mejorar la estabilidad, aunque sea en una ventana de tiempo mayor.

Se preparan diferentes sistemas de Curcumina $2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ con $0 < [\text{CD}] < 5 \times 10^{-5} \text{ M}$, en fresco y almacenados en frasco ámbar.

El Agua de disolución es desionizada en Mili-Q a $18.5 \text{ M}\Omega$, fría ($T = 18^\circ\text{C}$) y burbujeada en nitrógeno.

Para ambos estudios experimentales se alimentan los espectros de absorción al programa computacional estadístico Minitab 16 para obtener el número de especies absorbentes o fluorescentes mediante PCA, se realizará un ajuste visual con el modelo de especies mono y diméricas y por último se refinarán las constantes globales de formación con SQUAD.

Hasta ahora, como previamente nos describe Bernabé-Pineda a pH 12 la molécula curcumina es más estable que a otros valores de pH.

Ahora bien, si con la perturbación del sistema con CD la curcumina no se estabiliza, se propone la alternativa de cambiar de disolvente por una mezcla.

2.3 Mezcla equimolar DMSO/Agua

Valoración de 20mL de Mezcla equimolar DMSO/Agua en HClO_4 10^{-4}M con NaOH $5 \times 10^{-4}\text{M}$

Solución de $4.75 \times 10^{-5}\text{M}$ de curcumina disuelta en mezcla equimolar DMSO-Agua para una valoración continua con NaOH 10^{-2}M

Sistemas de 5mL de Curcumina $9.5 \times 10^{-6}\text{M}$ disueltas en mezcla equimolar DMSO-Agua variando el pH de cada uno con NaOH hasta pH 16

Solución $3.17 \times 10^{-5}\text{M}$ de curcumina en presencia de CD 0.03M variando el pH con NaOH 10^{-2}M

Solución $3.9 \times 10^{-5}\text{M}$ Curcumina en mezcla equimolar, se ajusta el pH a 15, 14, 13 y 12 con NaOH 1M valorada J.T Baker.

Solución 0.2M de CD, de reactivo de reactivo Kleptose HPB 4.5 en mezcla equimolar

El agua desionizada utilizada para estos experimentos también es burbujeada en N_2 y también se protege de la luz y la temperatura se impone a 20°C

Capítulo III Resultados Medio acuoso

Para el estudio de interacción de la molécula curcumina con CD se mantiene constante el pH para asegurar la abundancia relativa o predominio de una especie según lo reportado por Bernabé-Pineda [21].

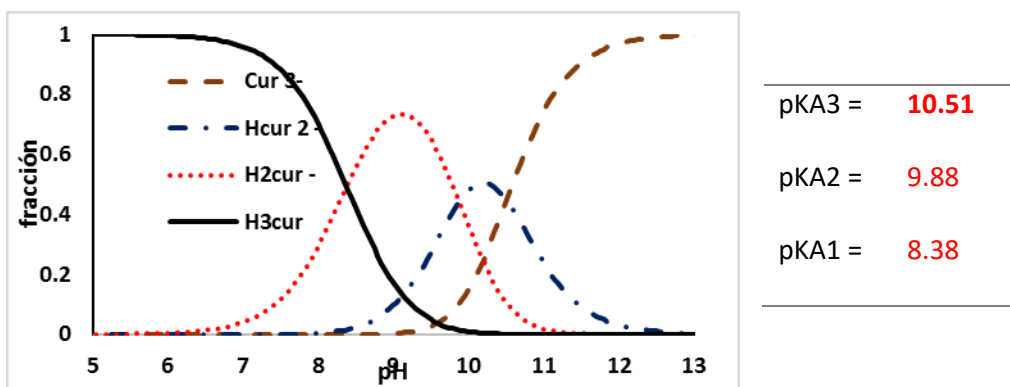


Figura 3 Diagrama de distribución de especies de Curcumina construido con las constantes globales de formación reportadas.

3.1 pH=10.1±0.2, predominio de la especie HCur²⁻

A continuación, presento los espectros de absorción de una valoración puntual de curcumina $2.5 \times 10^{-5} \text{M}$ con $10^{-5} \text{M} < [\text{CD}] < 5.0 \times 10^{-5} \text{M}$ se obtuvieron los espectros de absorción a $t=30 \text{min}$ después de la preparación para tener un estado pseudoestacionario, los cuales se siguieron hasta por 23 horas.

Se obtuvieron los espectros de absorción a $t=30 \text{min}$ (figura 3.1) a 456nm se observa un efecto hipocrómico-batocrómico, los espectros permaneces constantes hasta 40min, a $t=120 \text{min}$, aunque se observa una disminución contante en la absorbancia para cada sistema, esto nos hace pensar que a pesar de la adición de CD la curcumina sigue su procedimiento de degradación.

En cuanto a la gráfica de Absorbancia en función de $p\text{CD}_{\text{total}}$, se decide representar de esta manera los valores por la interpretación que es semejante a las gráficas en función del pH, es decir, los puntos de inflexión representaran un equilibrio.

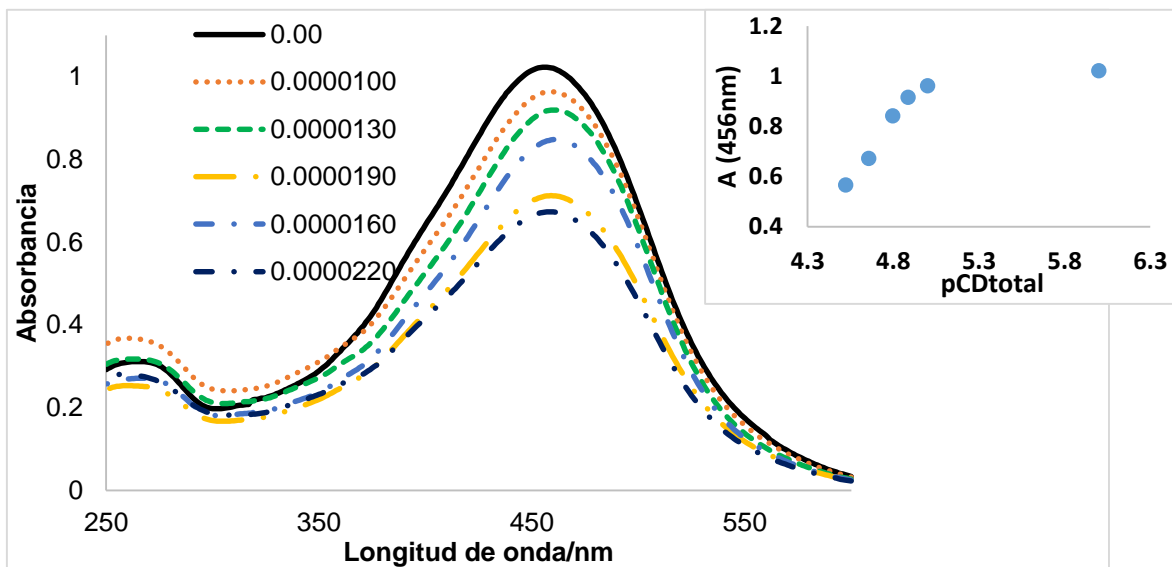


Figura 3.1.1 Espectros de absorción a pH 10.2 de valoración puntual de curcumina $2.5 \times 10^{-5} \text{M}$ con $10^{-5} \text{M} < [\text{CD}] < 5.0 \times 10^{-5} \text{M}$ después de 30min, (inserto) gráfica de absorbancia a 456nm en función de pCDtotal a 20°C.

Como primera aproximación se realiza un ajuste con los parámetros descritos en la tabla 3.1

Tabla 3.1 Parámetros utilizados para la simulación de la valoración de curcumina con CD a pH 10.2

[Cur]total	2.5×10^{-5}
kCur 461nm	40937
kCurCD ₂ 461nm	5000
logβ ₂	10.300

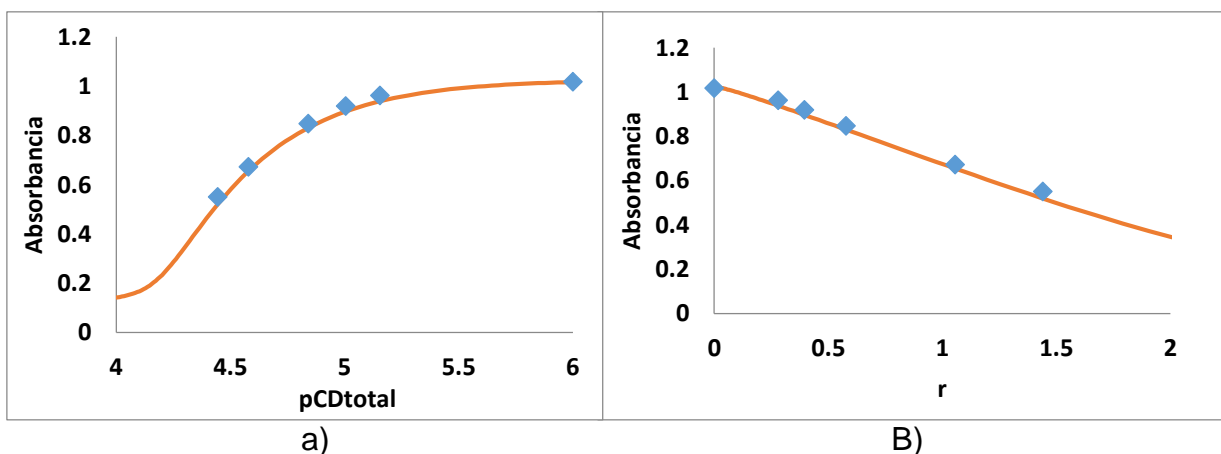


Figura 3.1.2 Ajustes con el modelo de especies mono y diméricas a pH 10.2 de valoración puntual de curcumina $2.5 \times 10^{-5} \text{M}$ con $10^{-5} \text{M} < [\text{CD}] < 5.0 \times 10^{-5} \text{M}$ después de 30min. a) Absorbancia 461nm función de pCDtotal y b) absorbancia 461nm en función de la razón molar.

Se observa un buen ajuste de los datos experimentales, sin embargo, falta corroborar a valores pCD total menores para lograr un mejor ajuste, esto haciendo hincapié en que la constante global de formación es muy alta, lo cual no es intuitivo para la formación de un complejo de inclusión.

Por otro lado, se esperaba que con la adición de CD se estabilizara la curcumina, sin embargo, al cabo de 1.5 horas la banda de 460nm comienza a desaparecer hasta desaparecer como se muestra en la figura 3.1.3.

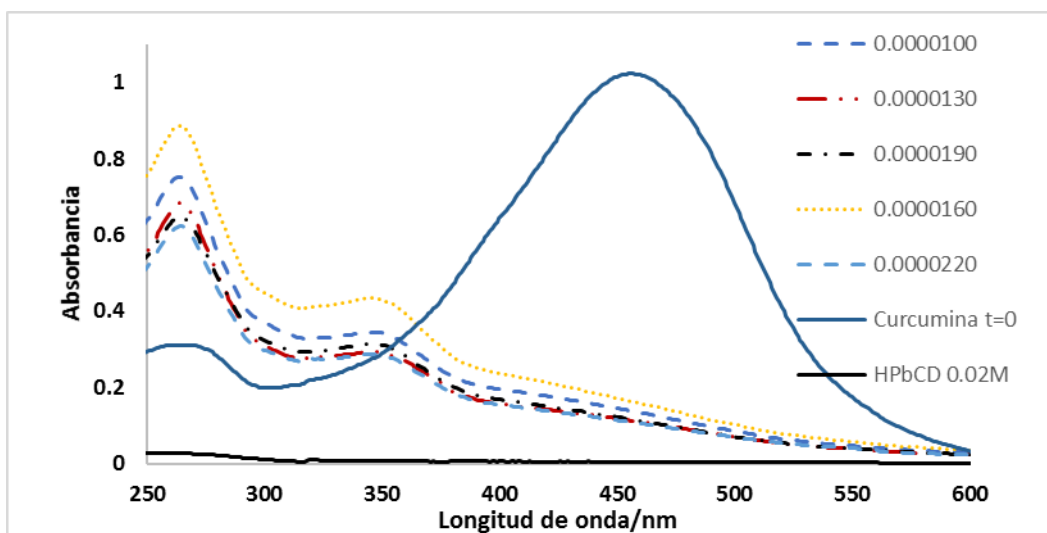


Figura 3.1.3 Espectros de absorción de curcumina al cabo de 20 horas.

Uno de los objetivos de este trabajo es estabilizar a la curcumina, pero como vemos en la gráfica anterior esto no sucede por lapsos prolongados, cabe decir que también se pueden explorar los sistemas con mayor cantidad de CD y así evidenciar la existencia de otras especies que probablemente sean más estables.

Aunque, a pH básico Bernabé-Pineda ^[22] notó una descomposición más rápida a pH más altos, es decir con la especie totalmente desprotonada, por tanto, se prueba con otro pH.

3.2 pH=11.41±0.15, predominio de la especie Cur³⁻

Para los sistemas a pH 11.41±0.15, donde predomina la especie totalmente desprotonada: Otra forma de resolver el problema de la descomposición es que a pH de 12 es estable hasta por 3 Horas según reporta Bernabé Pineda [21] los espectros de absorción de curcumina con [CD] de 0 a 0.089 los vemos en la figura 3.2.1

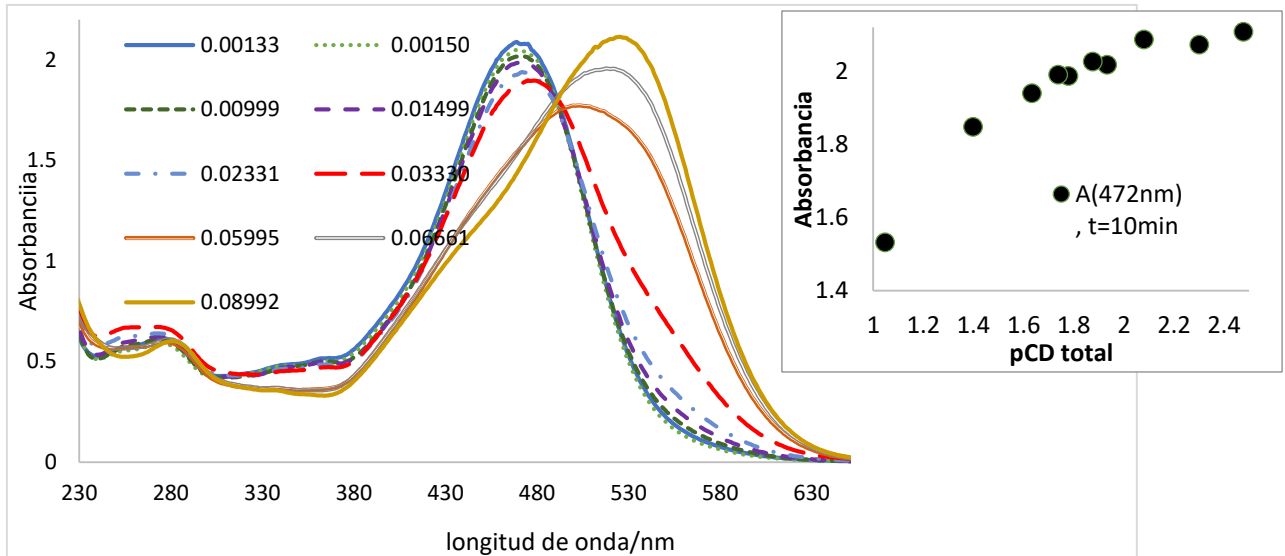


Figura 3.2 Espectros de absorción de valoración puntual de curcumina 3.02×10^{-5} M con $0 < [CD] < 8.9 \times 10^{-2}$ M y absorbancia en función de pCD total a $t=10$ min a $T=20^\circ\text{C}$.

Vemos a 460nm un efecto hipocrómico a concentraciones $0.03 > [CD]$, después una banda más ancha con efecto hiperocrómico a concentración 0.06M de CD y por último una banda con un efecto hipocrómico a 0.089M de CD.

Además ponemos notar un cambio en la banda de 280nm conforme la [CD] aumenta ésta se desplaza, lo cual concuerda con lo reportado^[23], que la interacción entre Curcumina y CD es por los anillos aromáticos.

El comportamiento de cada sistema se siguió en el tiempo para observar cambios en los espectros de absorción y pasadas entre 3 y 4 horas los espectros de absorción permanecieron constantes como se observa en el espectro con CD 0.0667M

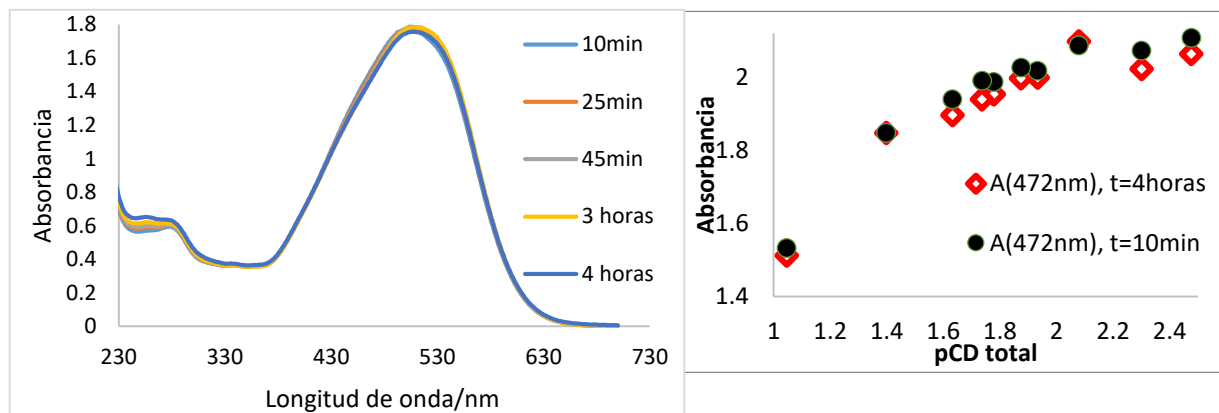


Figura 3.2.2 Espectros de absorción de curcumina 3.02×10^{-5} M con CD 6.67×10^{-2} M a diferentes intervalos de tiempo. Y comparación de absorbancia a 472nm a t=10minutos y 4horas en función de pCD total.

Con esta información suponemos un estado estacionario entre 3 y 4 horas. Se realizó PCA en Minitab 16 para calcular el número de componentes principales, en este caso, se interpretan como el número de especies absorbentes; a continuación, vemos la gráfica de coeficientes en función de la longitud de onda.

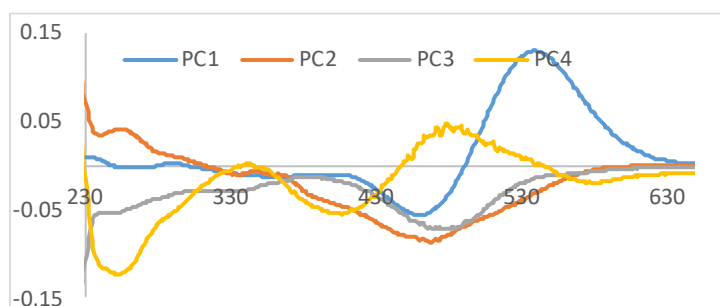


Figura 3.2.3 PCA de espectros de absorción de valoración puntual de curcumina 3.02×10^{-5} M con CD de 0 a 8.9×10^{-2} M.

La varianza acumulada del 100% según reporta Minitab es para 3 componentes, sin embargo, el redondeo que hace Minitab es en la centésima.

Después de realizar ajustes con 1 y 2 equilibrios, se consideran 2 equilibrios para el mejor ajuste visual de absorbancia a 471 y 525nm en función de pCDtotal, las gráficas teóricas en función de pCD total y [CD]/[Cur] se construyen con la información siguiente:

[Curcumina]total=	3.02×10^{-5}	λ	471	525
log Beta1 =	0.206	kCur	69594	20000
log Beta2 =	2.010	KML	15090	10000
		kML2	20800	180000

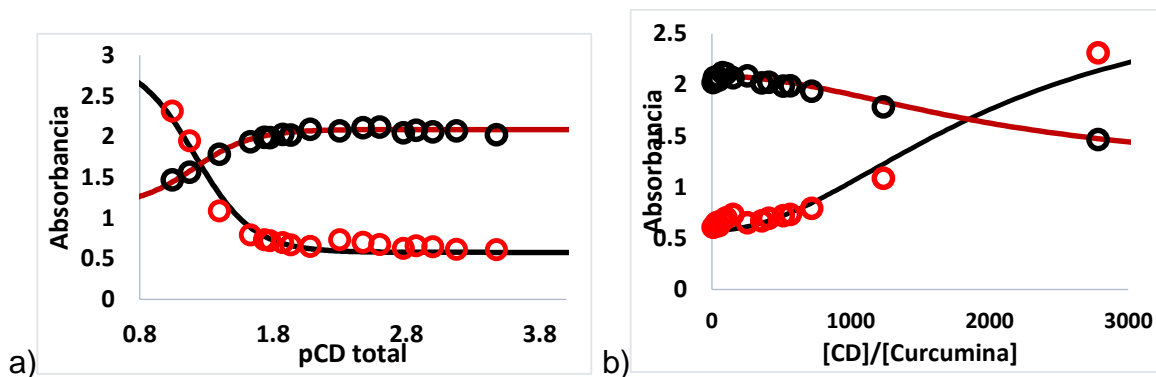


Figura 3.2.4 Ajuste de datos experimentales con el modelo de especies monoméricas

a) Líneas continuas (teóricas): Roja A (471nm) y Negra (525nm) en función de pCDtotal y los marcadores en círculo son los valores experimentales.

b) Líneas continuas (teóricas): Roja A (471nm) y Negra A (525nm) en función de [CD]/[Cur] y los marcadores en círculo son los valores experimentales.

El ajuste a los factores de respuesta y las constantes globales de formación es bueno únicamente si el anfolito CurCD dismuta, con esa información construimos el diagrama de distribución de especies en función de pCD libre.

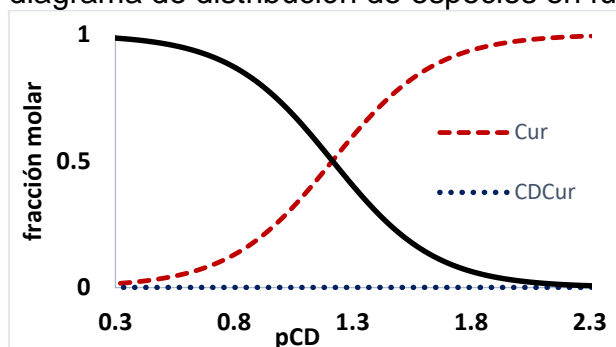
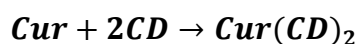


Figura 3.2.5 Diagrama de distribución de especies, la intersección de las curvas representa el $\log K_f$ de cada especie.

Debido a que es poco probable, en el sentido de no ser intuitivo, que el anfolito de estequiometría 1:1 no predomine, a partir de estos equilibrios se alimentan los espectros de absorción al programa computacional SQUAD para verificar el valor de la constante global de formación además de obtener los coeficientes de absorptividad.

Equilibrio considerado para el refinamiento de la constante global de formación (por simplicidad se omite la carga):



A continuación, se presenta una tabla con los parámetros estadísticos del refinamiento:

Equilibrio	Log β	σ
$Cur + 2CD \rightarrow Cur(CD)_2$	2.4169 ± 0.0122	$3.0943e-02$

Ahora bien, como la desviación estándar del ajuste es relativamente alta, otra propiedad que calcula SQUAD son los coeficientes de absorptividad molar presentados en la figura 3.2.6

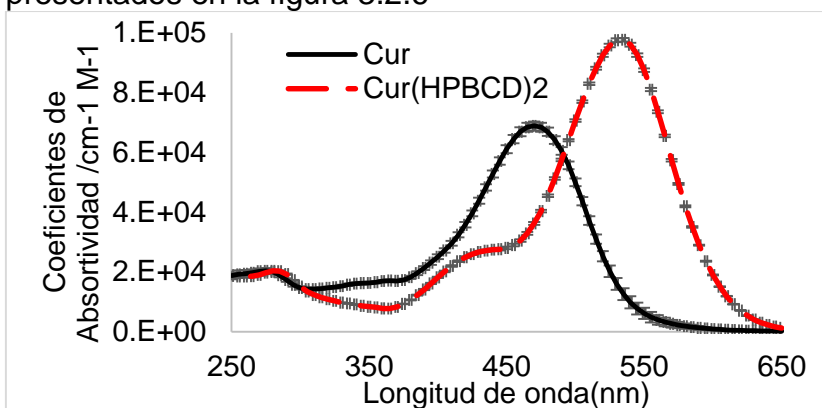


Figura 3.2.6. Coeficientes de absorptividad molar con barras de error, calculados por SQUAD para el modelo de un equilibrio, de las especies Cur y Cur(CD)₂ en función de la longitud de onda.

Con los coeficientes de absorptividad molar se obtienen los espectros de absorción ajustados para compararlos con los espectros experimentales, se muestran algunos en la figura 3.2.7

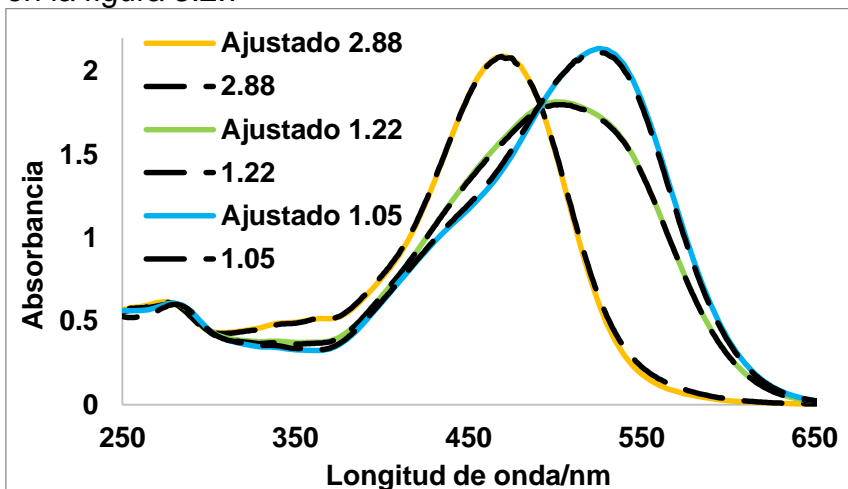


Figura 3.2.7 Comparación de espectros de absorción calculados a partir de los coeficientes de absorptividad molar obtenidos por SQUAD y espectros de absorción experimentales a 3 valores de pCD_{total}.

Como podemos verificar existe un buen ajuste en diferentes sistemas, así que se corrobora que, en efecto, el anfolito no puede predominar en las condiciones experimentales trabajadas.

Estudio de Polarimetría

También se obtuvo el ángulo de rotación de cada sistema medido a 589nm tomando en cuenta el ángulo de rotación molar (pendiente de la recta), observando que es diferente en ausencia de curcumina; aunque la diferencia no sea aparentemente muy significativa, es de interés porque estamos evidenciando que los centros asimétricos, es decir, los C2 de las unidades fundamentales no están siendo muy afectados por la interacción con la curcumina.

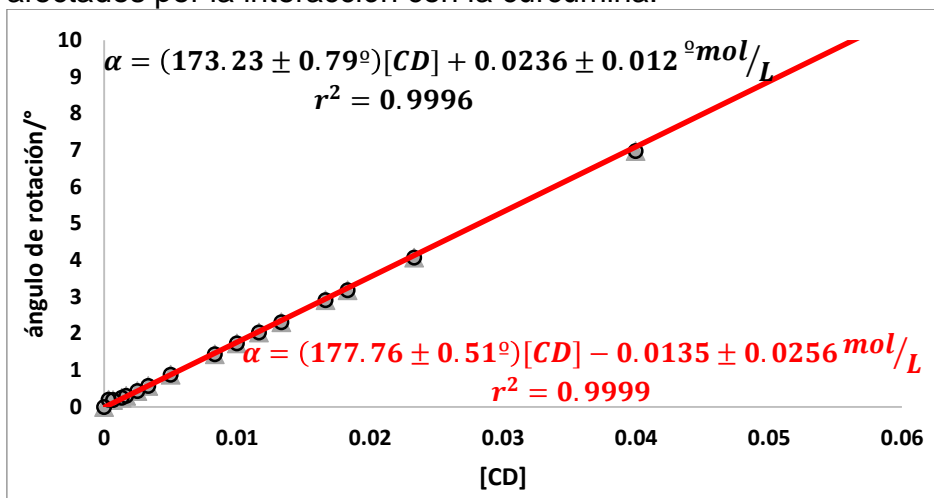


Figura 3.2.8 Ángulo de rotación en función de la concentración de CD a T=25°C y λ 589nm, con curcumina (marcador negro) sin curcumina (línea roja).

Por último, para evidenciar que el exceso de ciclodextrina sí estabiliza a la curcumina, se obtienen los espectros de absorción seguidos por 4 horas y por 4 días presentados en la figura 3.2.9

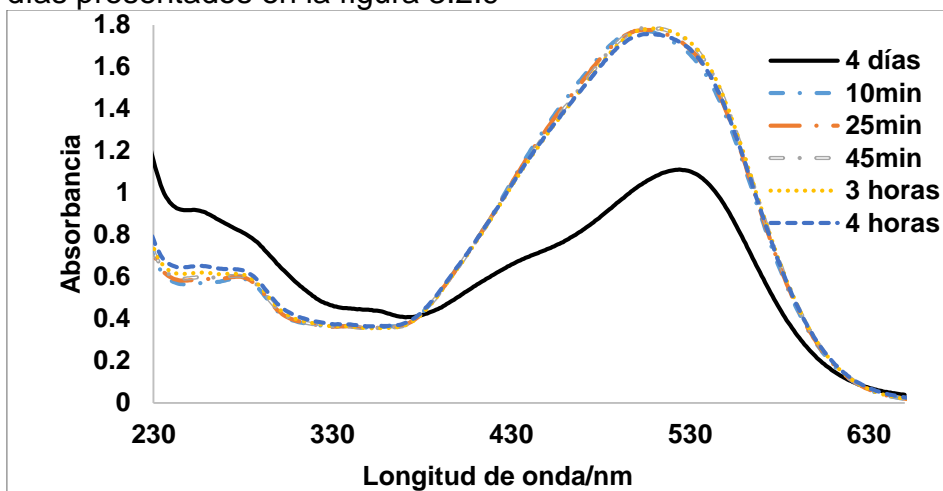


Figura 3.2.9 Espectros de absorción de 3.02×10^{-5} M con [CD] 6.7×10^{-2} M en diferentes intervalos de tiempo.

A pesar de los cuidados tenidos, frascos ámbar (totalmente cerrados), el pH no pudo mantenerse constante a 11.15, al cabo de 24 horas, variaba en cada sistema de 11.756 hasta 10.302, sin seguir algún patrón, en principio se pensó que debido al

NaOH para ajustar el pH inicial, éste podría estarse carbonatando haciendo así el pH más ácido, sin embargo aún quedaba la interrogante del porque había aumentado el pH de algunos sistemas, así que se planteó que debido a los grupos OH- que tiene la ciclodextrina pudiera tener al menos un pKa, que no está reportado para la 2-Hidoxipropil β - ciclodextrina, pero se espera sea cercano al de la β -ciclodextrina que es 12.2 ^[22]

Determinación del pKa de la 2-Hidoxipropil β - ciclodextrina (CD)

Se planteó realizar una valoración potenciométrica, para comparar con una valoración clásica de un ácido con base ambos fuertes y con la de CD en base fuerte; en la figura 3.2.10 se muestran las gráficas teóricas.

La construcción de las curvas teóricas se ajustó a los experimentales cambiando el grado de carbonatación y el log β del equilibrio asociado a la desprotonación de la CD, los parámetros usados para el ajuste se muestran a continuación:

Tabla 3.2.1. Parámetros usados para el ajuste de los datos experimentales obtenidos de la valoración de ácido-base en ausencia y presencia de CD.

C real ácido =	0.0556	M	carbonatos	
C real de NaOH =	0.00196	M	logBeta1 =	10.33
C*carbonato=	0.00002	M	logBeta2 =	17.13
Co NaOH nominal	0.002		pKw =	13.9
Porcentaje	1	%	CD	
C real CD	0.1		logB1	12.05

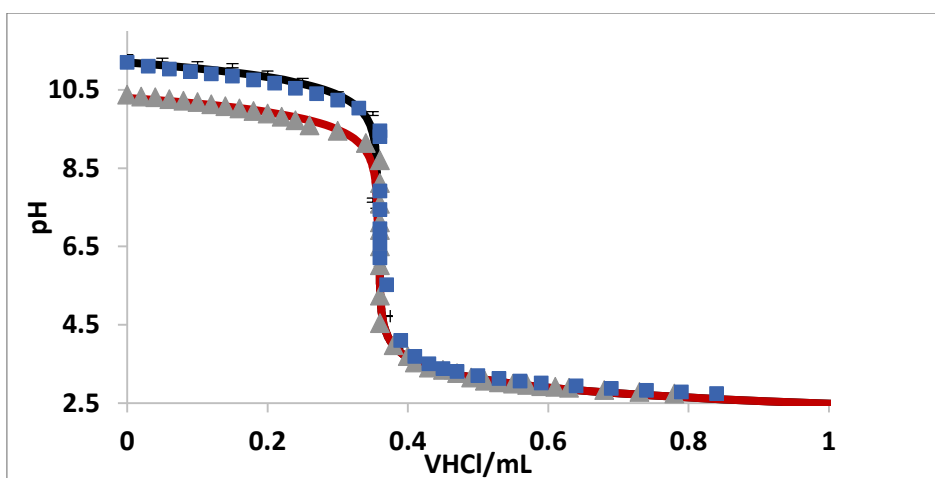


Figura 3.2.10 Curvas teóricas de valoración de 10mL de solución 2×10^{-3} M de NaOH con HClO_4 5.56×10^{-2} M (Líneas negra) y de 10mL de CD 0.1M en NaOH 2×10^{-3} M con HClO_4 5.56×10^{-2} M (línea roja) considerando un 1% de carbonatación. Los marcadores son los datos experimentales a $T=21^\circ\text{C}$

Una alternativa para evidenciar si la CD tiene al menos un pKa fue la polarimetría, a continuación, se presenta la gráfica teórica y la obtenida en la valoración puntual.

$[\alpha]_{\text{esp CD}} 177.76 \text{ } ^\circ\text{Lmol}^{-1}\text{dm}^{-1}$	$[\alpha]_{\text{esp CD}^-} 173.5 \text{ } ^\circ\text{Lmol}^{-1}\text{dm}^{-1}$	$\text{pK}_{\text{A1}} = 12.05$
---	--	---------------------------------

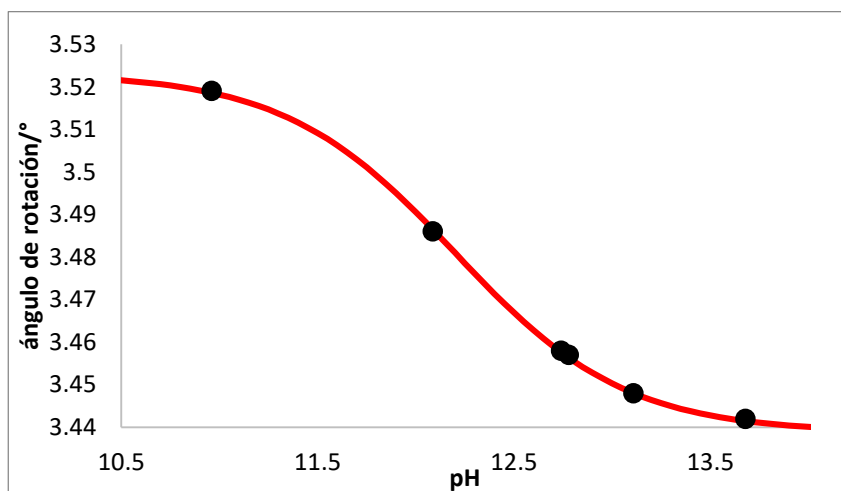


Figura 3.2.9 Curva teórica de valoración puntual seguida por polarimetría a $\lambda=589\text{nm}$ y $T=25^\circ\text{C}$ de 3mL CD 0.02M (Línea continua) y experimental ajustando con NaOH (Marcadores).

Como se puede apreciar, el ángulo de rotación cambia casi 0.1° , ajustado los parámetros de $\log\beta$ asociado a la desprotonación de CD y ángulo de rotación molar de cada una de las especies.

Tomando en cuenta que se ha tratado evidenciar que existe interacción de Curcumina con CD, en las condiciones experimentales trabajadas no se pudo hasta ahora, controlar el pH de la especie totalmente desprotonada en medio acuoso y en cuanto a la especie totalmente protonada no hubo cambio alguno en su espectro de absorción, se prueba cambiar de disolvente, no solo para probar si la curcumina es estable a diferentes pH sino también para evidenciar si se forma el complejo 1:1 o bien, cuál es el complejo más estable.

Capítulo IV Resultados Mezcla Equimolar DMSO/Agua

4.1 Determinación de pK_M

Para poder realizar un buen estudio de alguna propiedad luminiscente en función del pH se valoró HClO_4 $2 \times 10^{-5} \text{M}$ en la mezcla equimolar con NaOH $5 \times 10^{-4} \text{M}$.

Se realizó un ajuste a una curva calculada con la ecuación de electroneutralidad ajustando el valor de pK_M , el cual como es de esperarse es mayor al de agua, por la polaridad del DMSO y porque además es aprótico.

Creal de NaOH =	0.00046M	Carbonatos	
Ccarbonato=	0.000215M	logBeta1 =	10.33
CNaOH nominal	0.0005M	logBeta2 =	16.69
Porcentaje	4.3%	pK_M =	17.5

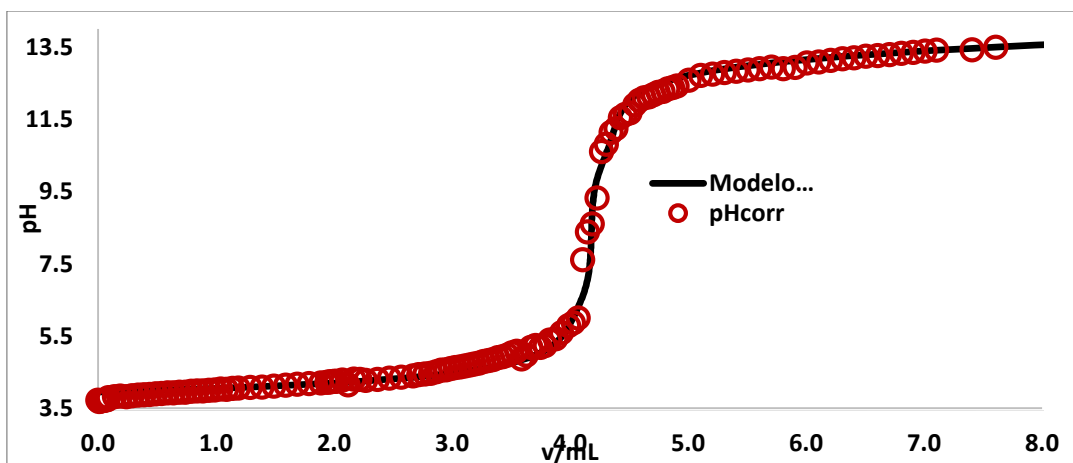


Figura 4.1.1 Curva de valoración de HClO_4 10^{-4}M con NaOH $5 \times 10^{-4} \text{M}$ teórica (línea continua) y experimental (marcadores) en mezcla equimolar DMSO/Agua a $T=21^\circ \text{C}$

En la gráfica del ajuste de datos experimentales de la valoración de ácido con base fuertes en mezcla equimolar DMSO-Agua observamos que el ajuste se logra solo incluyendo un 4.3% de carbonatación de la sosa, que es evidente por la ligera inclinación en el punto de equivalencia y un pK_M de 17.5.

Además del ajuste visual también se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$pH = pK_M - pOH$$

Definimos pOH

$$pOH = -\log \left(\frac{V_{Base} C_{NaOH} - V_{ácido} C_{ácido}}{V_{total}} \right)$$

Ahora el pH es el valor en el cuál la curva permanece constante, este es 13.42

Despejando pK_M

$$pK_M = 13.42 + pOH = 13.42 - \log\left(\frac{7.4\text{mL} * 0.000457\text{M} - 20\text{mL} * 0.001\text{M}}{27.4\text{mL}}\right)$$

$$pK_M = 17.718$$

Ahora bien, la variación es de 0.2 unidades, aunque para la autora resultaría más correcto el valor obtenido por el ajuste con el modelo a partir de la ecuación de electroneutralidad, ya que por el segundo método sería mejor estimado el valor del pK_M sí se tuvieran más puntos experimentales para obtener una recta totalmente horizontal.

4.2 Caracterización de CD en mezcla DMSO-Agua

Una vez que se determina a cuál valor de pH podemos medir en base a la determinación del pK_M , se procedió a caracterizar polarimétrica y espectrofotométricamente a la CD, para determinar cualquier diferencia con respecto al medio acuoso.

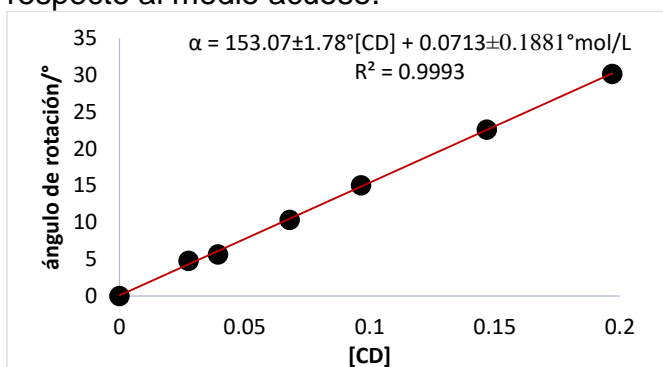


Figura 4.2.1 Curva de calibración de CD a pH 9 T=25°C y $\lambda=589\text{nm}$ en mezcla equimolar DMSO/Agua

En la gráfica anterior mostramos que sí hay un efecto en el ángulo de rotación molar, es decir, los centros asimétricos C2 de la unidad fundamental están siendo afectados también por el cambio de disolvente siendo éste, menor que en solución acuosa.

Con respecto al espectro de absorción, tenemos casi el mismo comportamiento que en medio acuoso

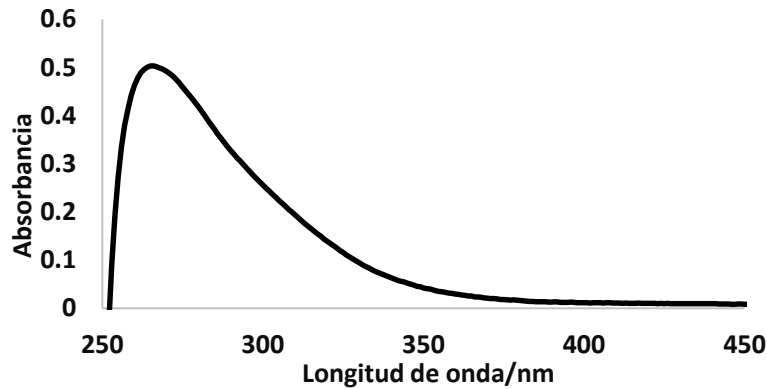


Figura 4.2.2 Espectro de absorción de una solución de [CD] 0.24M en mezcla equimolar DMSO-Agua.

Observamos que en comparación con el espectro de absorción en medio acuoso, el máximo a 265nm aumenta casi al doble, sin embargo, no interferirá en el estudio de la interacción con la curcumina.

4.3 Determinación de constantes de acidez de curcumina (UV-vis)

Ahora bien, para discernir que especie predomina a un cierto pH, se realizó una valoración continua y puntual de Curcumina en la mezcla equimolar DMSO/Agua. Vemos cambios notables en los espectros de absorción una vez que cambiamos el pH de la solución

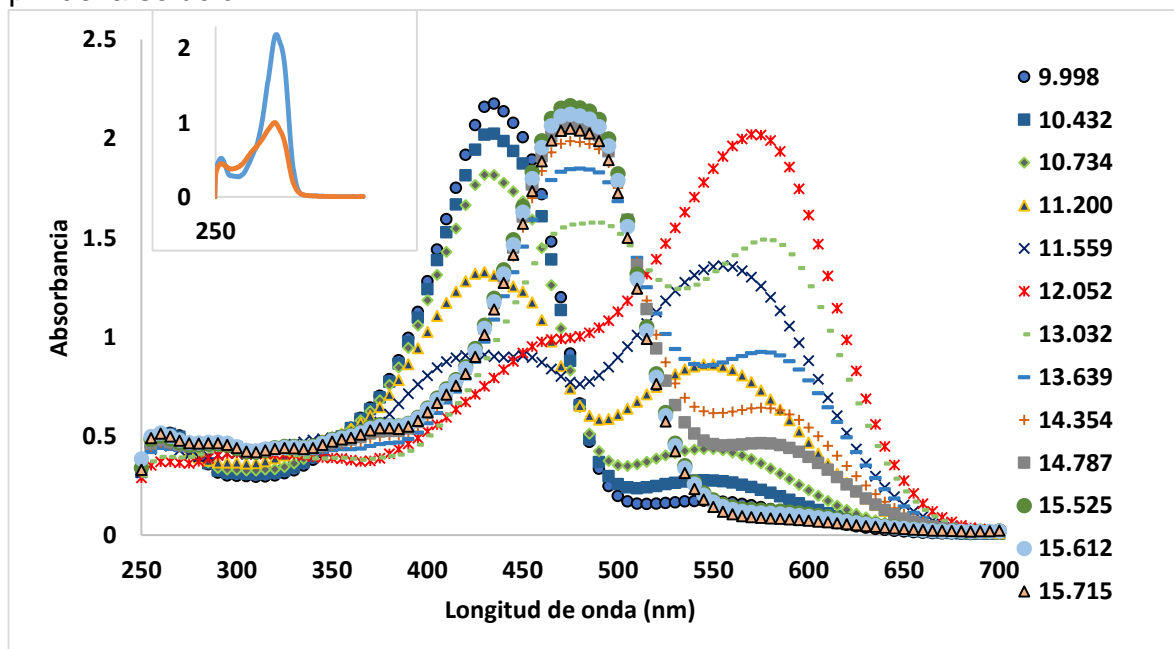


Figura 4.3.1 Espectros de Absorción de la valoración continua de curcumina $4.73 \times 10^{-5} \text{M}$ con NaOH 0.01M y en el inserto espectro inicial y final corregido por efecto de dilución en mezcla equimolar DMSO-Agua a $T=20^\circ\text{C}$

Sin embargo, al agregar ácido concentrado para volver al espectro original, solo afectado por el efecto de dilución, hubo gran cambio tanto en la magnitud de la absorbancia como en la forma del espectro, así que se procedió a valorar puntualmente para descartar cualquier tipo de descomposición en este medio.

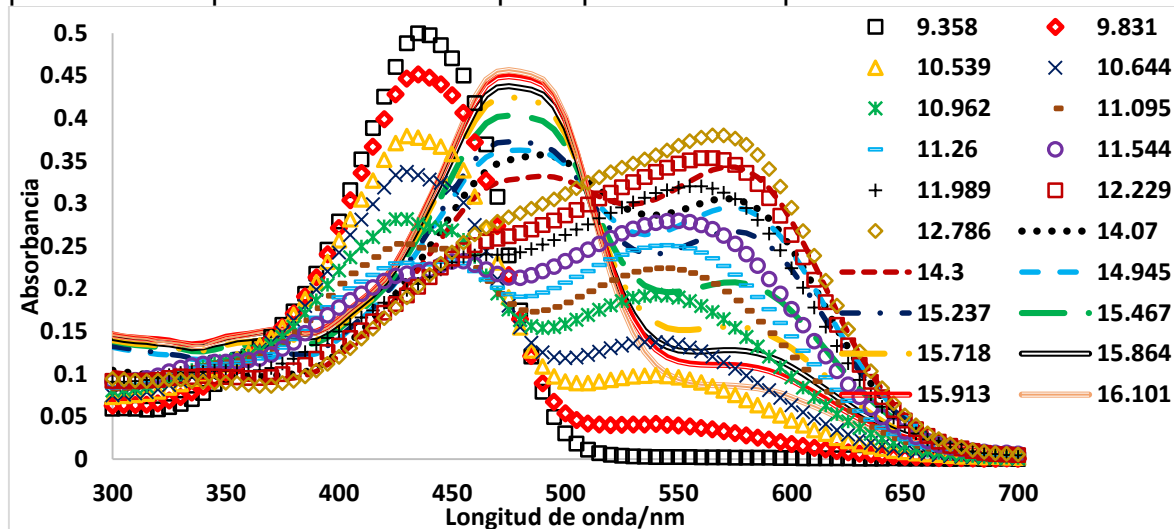


Figura 4.3.2 Espectros de Absorción de la valoración puntual de curcumina $9.505 \times 10^{-6} \text{M}$ ajustando valores de pH con NaOH 0.1M en mezcla equimolar DMSO-Agua a $T=20^\circ\text{C}$

Aparentemente la serie de espectros sigue la misma tendencia, pero, lo más notable es el cambio en los valores de pH

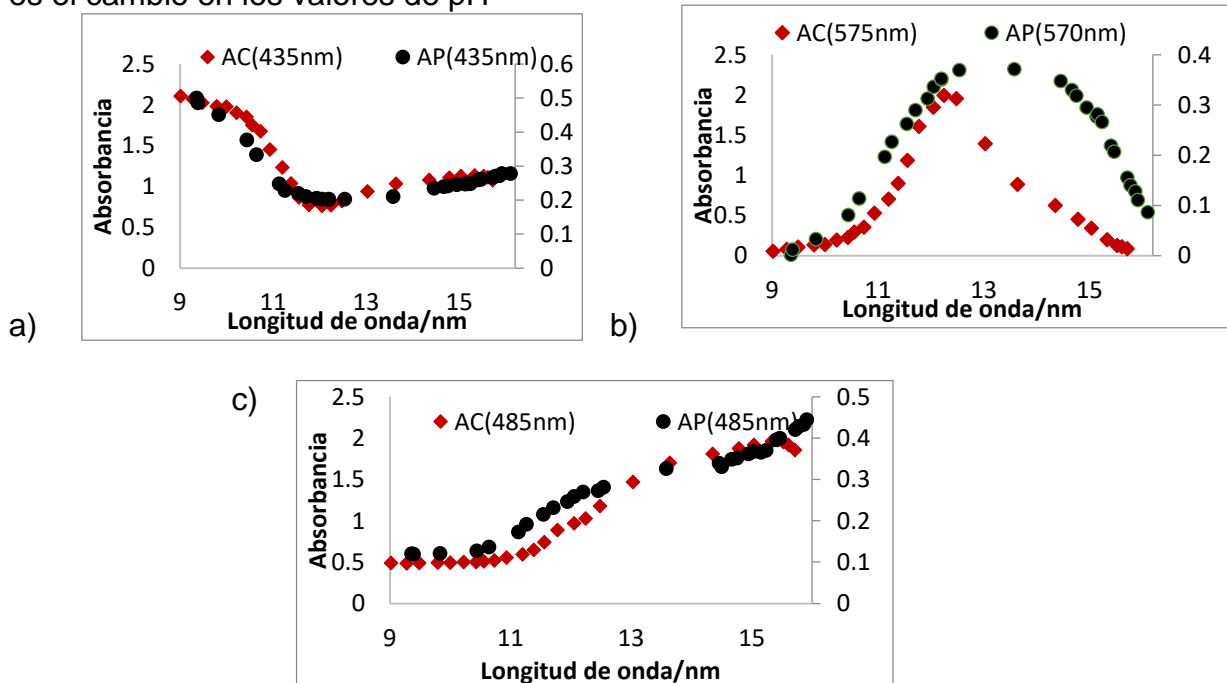


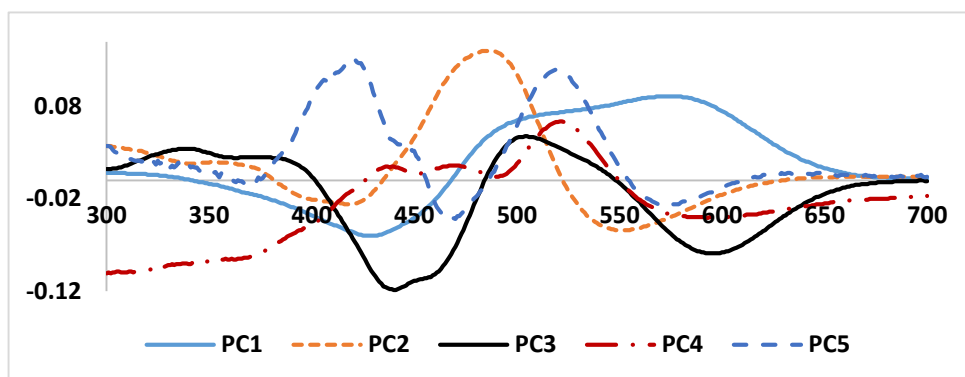
Figura 4.3.4 Comparación de las gráficas de la valoración continua y puntual, en mezcla equimolar DMSO-Agua, de la absorbancia a una cierta longitud de onda vs pH

a) 435nm, b) 575nm, c) 485nm

En base a las figuras anteriores tomando en cuenta la valoración puntual, que es más confiable, podemos observar 2 puntos de inflexión bien definidos a pH aproximadamente 10.9, 11.5 y el último estaría cercano a 14.8, sin embargo, no está bien definido.

El tratamiento de datos obtenidos experimentalmente en adelante ya solo se expone para la valoración puntual, ya que se ha obtenido mayor y mejor información que de la valoración continua.

Se corrió PCA para calcular los componentes principales, lo que interpretaremos como las especies que absorben de manera diferente, es decir, que tengan coeficientes de absorción distintos en nuestro sistema.

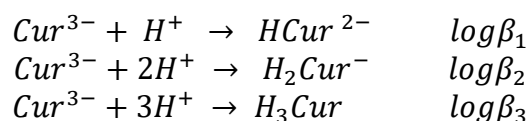


fracción de varianza	0.754	0.212	0.031	0.003	0
Varianza acumulada	0.754	0.966	0.997	0.999	1

Figura 4.3.5 Gráfica de componentes principales de espectros de absorción de valoración puntual de curcumina 9.505×10^{-6} M en mezcla equimolar DMSO-Agua y tabla de varianza proporcionada por PCA.

Ahora según PCA tenemos 5 especies que absorben diferente en el sistema, sin embargo, basándonos en la proporción de varianza con la que contribuye el componente principal 5 es casi despreciable además de que al ser graficado éste ya presenta ruido, así que se toman solo 4 especies.

Posteriormente se plantean 3 equilibrios independientes que se alimentan al programa SQUAD para el refinamiento de las constantes acidez.



El refinamiento proporcionado por SQUAD se muestra a continuación

Modelo	pKa±σ	Logβ ±σ	σ ajuste	(U/n)
$Cur^{3-} + H^+ \rightarrow HCur^{2-}$	15.340±0.008	15.340±0.008		
$Cur^{3-} + 2H^+ \rightarrow H_2Cur^-$	11.753±0.019	27.101±0.011	5.331x10 ⁻³	1.970x10 ⁻³
$Cur^{3-} + 3H^+ \rightarrow H_3Cur$	10.719±0.027	37.812±0.016		

Además del refinamiento de las constantes globales de formación, SQUAD también nos provee de los coeficientes de absorptividad molar de cada especie, éstos se muestran en la figura 4.3.6.

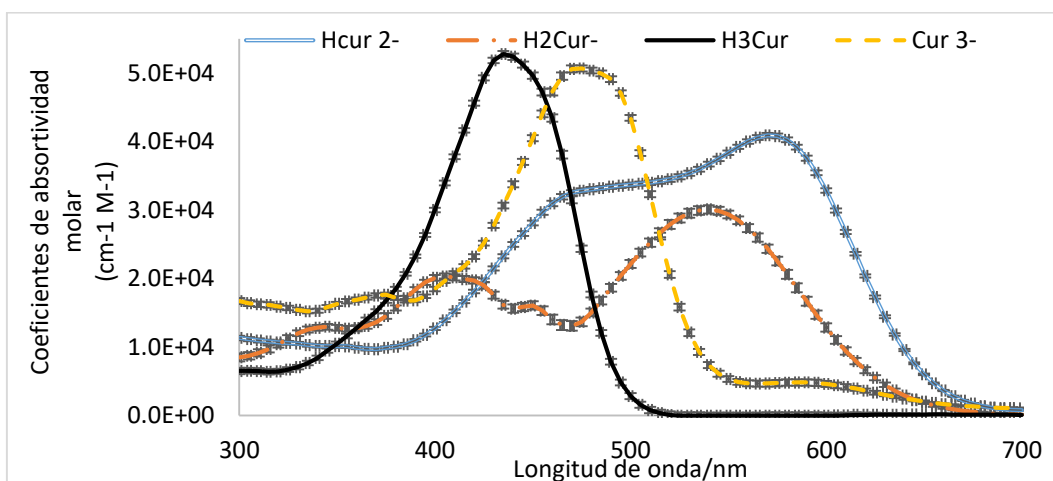
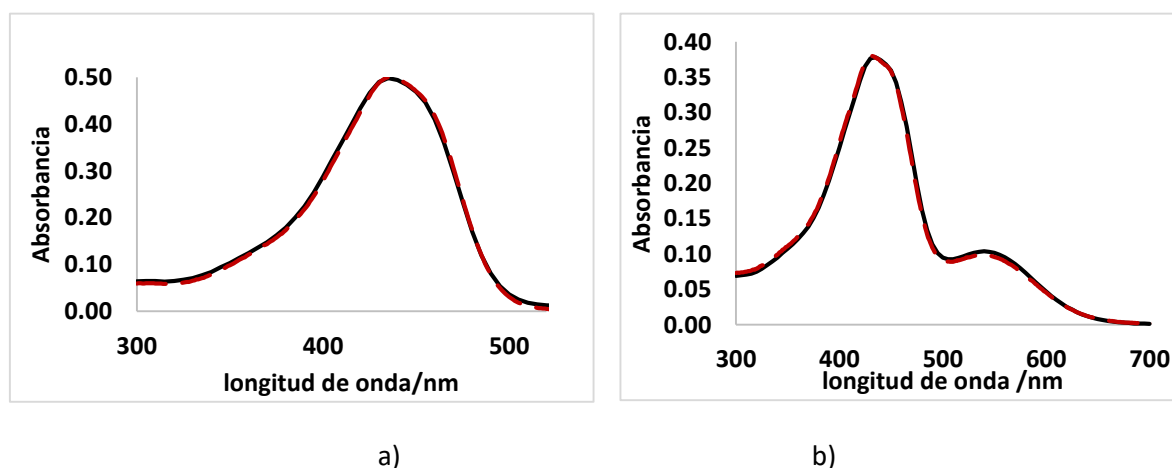
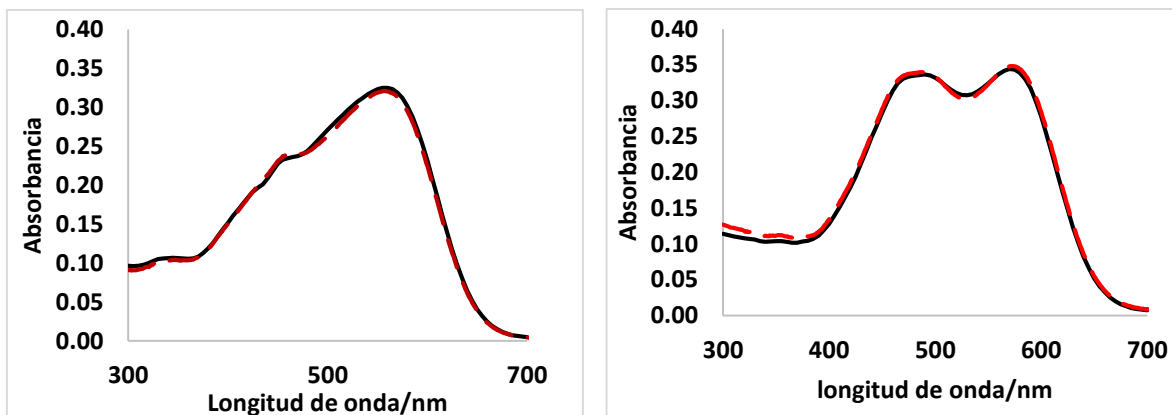


Figura 4.3.6 Gráfica de coeficientes de absorptividad molar del sistema Cur-H en mezcla DMSO-Agua refinados por SQUAD.

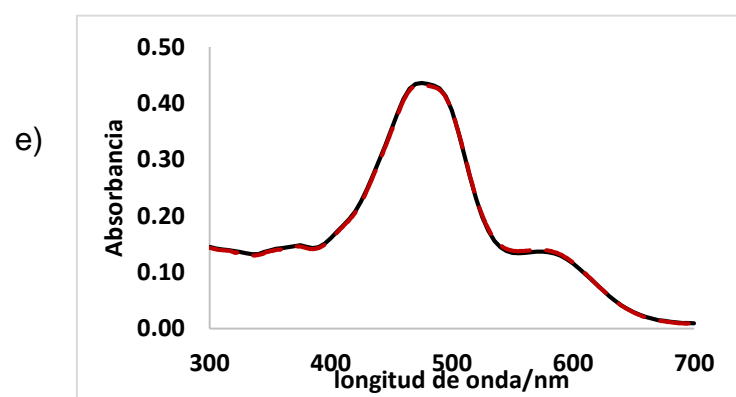
Haciendo uso de las constantes globales de formación y coeficientes de absorptividad molar refinados por SQUAD construimos los espectros, que de ahora en adelante serán espectros ajustados, con los espectros experimentales (figura 4.3.2) y sigmoides de absorbancia en función del pH (figura 4.3.7).





c)

d)



e)

f)

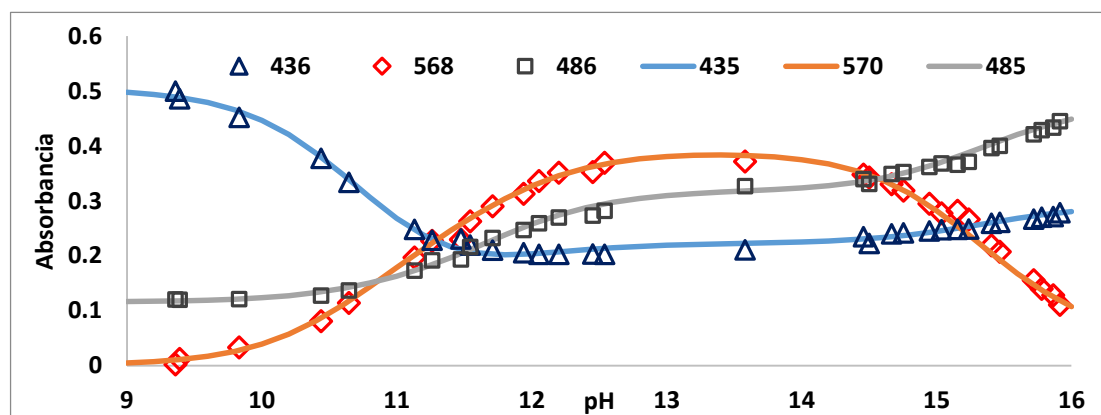


Figura 4.3.7 Comparación de resultados experimentales a diferentes valores de pH.

- a) pH 9.358
- b) pH 10.539
- c) pH 11.989
- d) pH 14.3
- e) pH 15.778
- f) Graficas sigmoides de absorbancia a diferente longitud de onda en función de pH. Líneas continuas ajustadas con datos de SQUAD y marcadores datos experimentales

Aparentemente los espectros ajustados y las curvas sigmoides representan apropiadamente lo observado experimentalmente, pero para corroborar se apoyó de otro método espectroscópico, la fluorescencia.

4.4 Determinación de constantes de acidez de curcumina (Fluorescencia)

Ahora bien, otra manera de evidenciar el número de especies que están presentes en nuestro sistema recurrimos a la técnica espectroscópica de fluorescencia.

A continuación, se muestran los espectros de excitación y los de emisión.

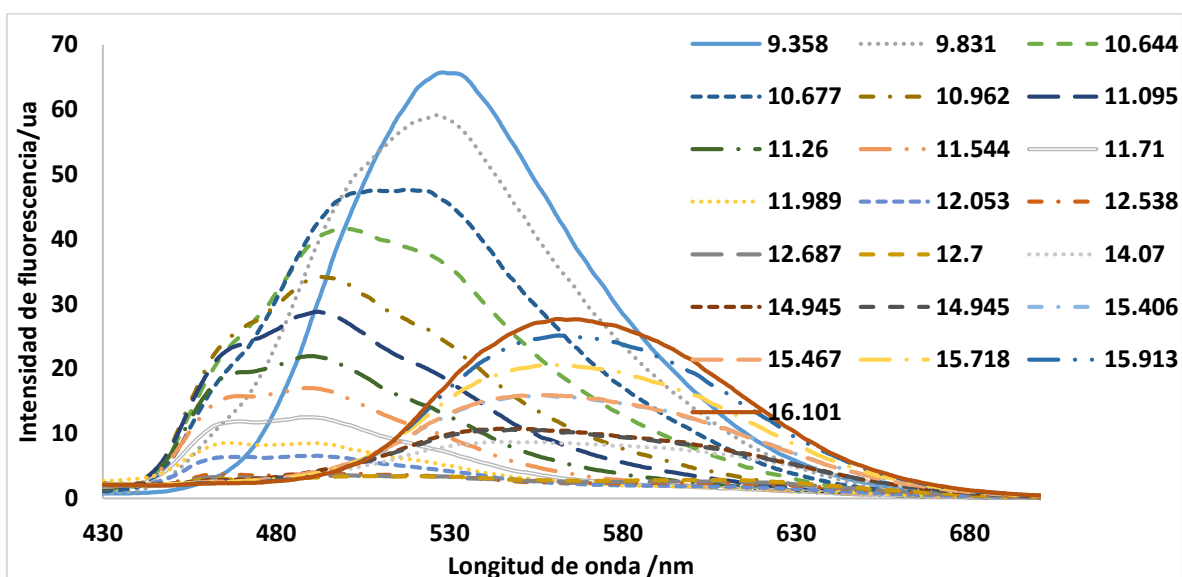
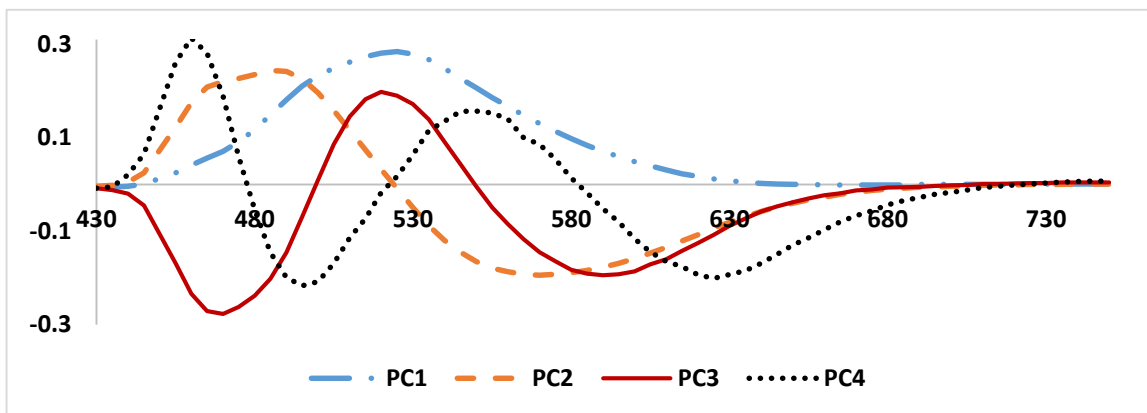


Figura 4.4.1 Espectros de Emisión (longitud de onda de excitación, 405nm), de la valoración puntual de curcumina $9.505 \times 10^{-6} \text{M}$ ajustando valores de pH con NaOH 0.1M en mezcla equimolar DMSO-Agua.

La fluorescencia en este medio se ve favorecida en comparación con el medio acuoso, aunque al parecer el comportamiento es el mismo al menos para la especie totalmente protonada, la cual presenta mayor fluorescencia, con forme aumentamos el pH la fluorescencia va disminuyendo hasta un pH cercano a 13 posterior a este valor se observa cómo se va favoreciendo nuevamente el fenómeno luminiscente.

La herramienta estadística PCA nuevamente nos será de utilidad para proponer el número de especies involucradas en nuestro sistema.



Fracción de varianza	0.784	0.193	0.023	0.001
Varianza acumulada	0.784	0.976	0.999	1

Figura 4.4.2 Gráfica de componentes principales de espectros emisión de valoración puntual de curcumina 9.505×10^{-6} M en mezcla equimolar DMSO-Agua y tabla de varianza proporcionada por PCA.

En este caso PCA nos calcula 4 especies que tienen un fenómeno luminiscente diferente.

Con esta información, que hasta ahora concuerda con lo obtenido por UV-vis, planteamos los mismos equilibrios y SQUAD nos proporciona la siguiente información:

Modelo	pKa $\pm\sigma$	Log $\beta \pm\sigma$	σ ajuste	(U/n)
$Cur^{3-} + H^+ \rightarrow HCur^{2-}$	15.624 \pm 0.016	15.624 \pm 0.016		
$Cur^{3-} + 2H^+ \rightarrow H_2Cur^-$	11.471 \pm 0.027	27.095 \pm 0.011	2.51 $\times 10^{-3}$	2.96 $\times 10^{-4}$
$Cur^{3-} + 3H^+ \rightarrow H_3Cur$	10.668 \pm 0.019	37.763 \pm 0.008		

El tratamiento de datos previo al análisis con SQUAD fue dividir la intensidad de fluorescencia entre 1000.

Además del refinamiento de las constantes globales de formación, SQUAD también nos provee de los factores de respuesta de cada especie, éstos se muestran en la figura 4.4.3.

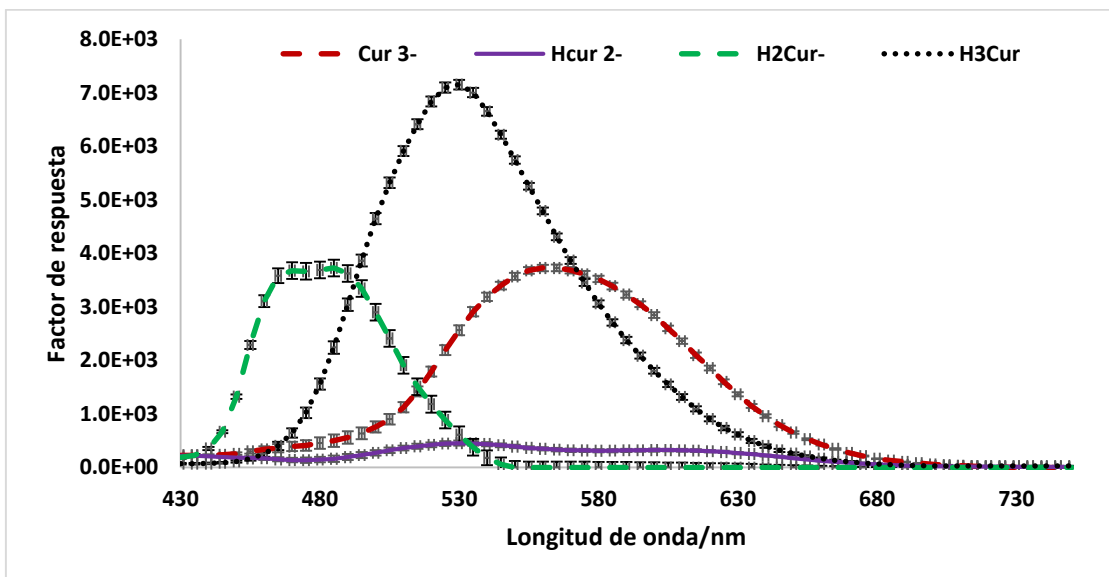


Figura 4.4.3 Gráfica de factores de respuesta del sistema Cur-H en mezcla DMSO-Agua refinados por SQUAD.

Haciendo uso de las constantes globales de formación y factores de respuesta refinados por SQUAD construimos las curvas sigmoides de intensidad de fluorescencia en función del pH (figura 4.4.4).

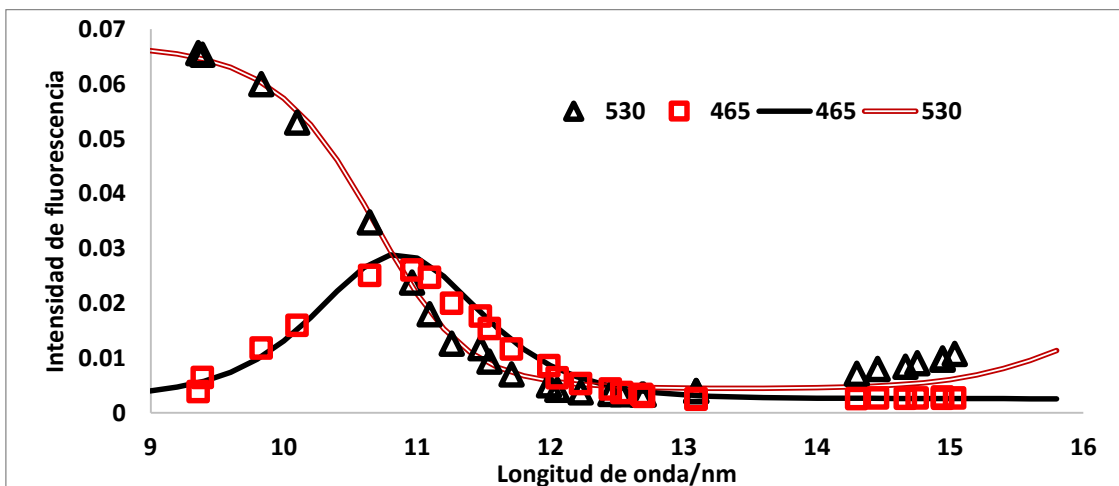


Figura 4.4.4 Gráficas sigmoides de intensidad de fluorescencia a diferente longitud de onda en función de pH. Líneas continuas ajustadas con datos de SQUAD y marcadores datos experimentales

El ajuste proporcionado por SQUAD para los espectros de emisión también represento perfectamente lo observado de manera experimental, comparando con lo obtenido por UV-Vis, las constantes globales de formación coinciden dentro de la incertidumbre para cada método excepto el primero.

Espectroscopia de fluorescencia		Espectroscopia UV-Vis	
Modelo	pKa ±σ	Modelo	pKa ±σ
$Cur^{3-} + H^+ \rightarrow HCur^{2-}$	15.624±0.016	$Cur^{3-} + H^+ \rightarrow HCur^{2-}$	15.340±0.008
$Cur^{3-} + 2H^+ \rightarrow H_2Cur^-$	11.471±0.027	$Cur^{3-} + 2H^+ \rightarrow H_2Cur^-$	11.753±0.019
$Cur^{3-} + 3H^+ \rightarrow H_3Cur$	10.668±0.019	$Cur^{3-} + 3H^+ \rightarrow H_3Cur$	10.719±0.027

Se muestra el diagrama de distribución de especies para cada método.

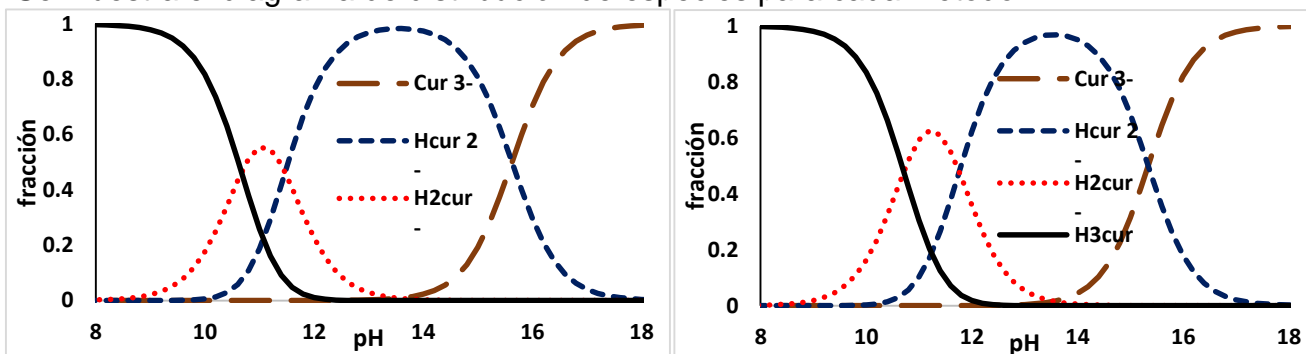


Figura 4.4.5 Diagrama de distribución de especies de Curcumina construido con las constantes globales de formación refinadas con SQUAD, (izquierda) por Fluorescencia, (derecha) por UV-Vis.

El cambio en la última constante global de formación entre un método y otro cambia significativamente el predominio sobre todo de la especie H₂Cur⁻.

4.5 Determinación de constantes de acidez condicionales

Debido a que no existe algo reportado en cuanto al comportamiento de la curcumina en la mezcla DMSO-Agua, tampoco existían estudios previos de la interacción de Curcumina-CD en mezcla DMSO-agua, por lo tanto, se realiza el estudio del efecto que tiene la adición de CD al medio, es decir, que tanto se perturba el medio en presencia de exceso de CD.

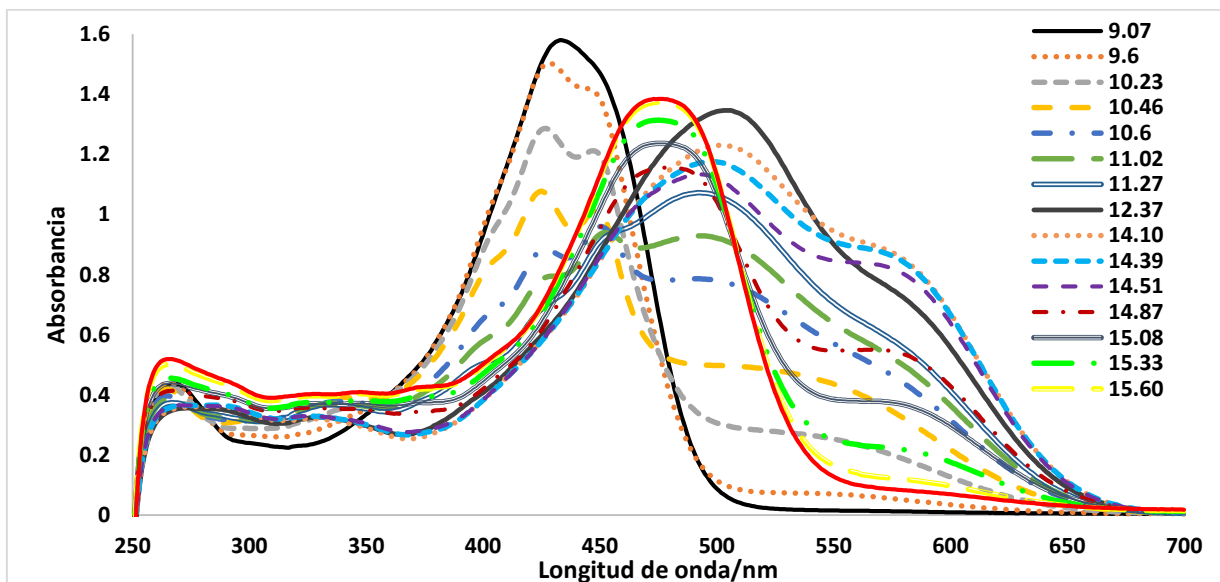


Figura 4.5.1. Espectros de absorción de valoración de curcumina $3.17 \times 10^{-5} M$ en presencia de CD $0.3 M$ con NaOH $0.01 M$ en mezcla equimolar DMSO-Agua.

Se aprecia un cambio sobre todo en los espectros correspondientes al intervalo de pH al que predominan los anfolitos, sin embargo, las otras especies no están exentas de presentar algún cambio, es por ello que las constantes de acidez condicionales son de importancia.

En la banda de $435 nm$ observamos un efecto hipocrómico y un desdoblamiento de la señal, conforme el pH aumenta, se aprecia una banda a $550 nm$ que presenta un efecto hiperocrómico-batocrómico y a la par se observa una banda a $507 nm$, por último, a pH muy altos la banda a $480 nm$ aparentemente sin cambio.

Como primera evidencia se muestra la comparación de las curvas sigmoideas del experimento sin y con CD.

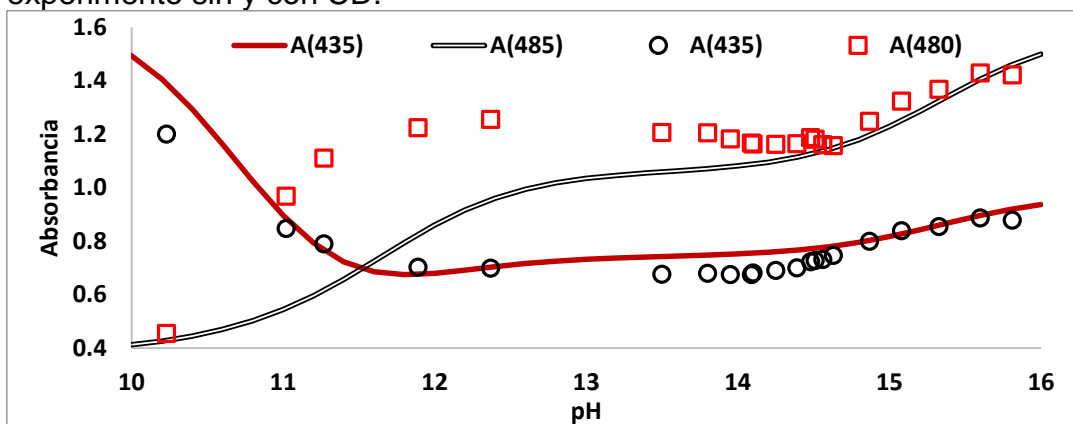
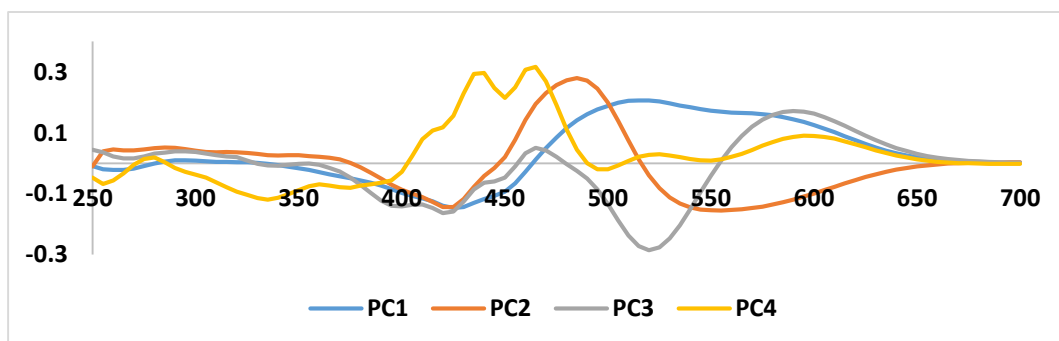


Figura 4.5.2. Curvas de absorción en función de pH, (líneas continuas) valoración puntual de curcumina $3.17 \times 10^{-5} M$ y (marcadores) en presencia de CD $0.3 M$ con NaOH $0.01 M$ en mezcla equimolar DMSO-Agua.

Se observa un cambio drástico en la tendencia presentada a 485nm, es más ilustrativo observar los espectros de absorción, que en comparación con la figura 4.5.1, los anfolitos están siendo mayormente perturbados que las especies neutra y totalmente desprotonada.

Una vez analizados los espectros por PCA, obtenemos 4 especies de distinto coeficiente de absorptividad molar.



Fracción de varianza	0.831	0.141	0.014	0.013
varianza acumulada	0.831	0.972	0.986	0.999

Figura 4.5.3 Gráfica de componentes principales de espectros de absorción de valoración puntual de curcumina $3.17 \times 10^{-5} \text{M}$ en presencia de CD 0.03M en mezcla equimolar DMSO-Agua y tabla de varianza proporcionada por PCA.

Ahora bien, planteamos distintos modelos a SQUAD para el refinamiento de constantes globales de formación y coeficientes de absorptividad, siendo el estadísticamente mejor cuando el anfolito $HCur^{2-}$ dismuta:

Modelo	$pK_a \pm \sigma$	$\text{Log} \beta \pm \sigma$	σ ajuste	U/n
$Cur^{3-} + H^+ \rightarrow HCur^{2-}$	14.068 ± 0.036	14.068 ± 0.036		
$Cur^{3-} + 2H^+ \rightarrow H_2Cur^-$	15.254 ± 0.049	29.322 ± 0.013	1.649×10^{-2}	1.95×10^{-2}
$Cur^{3-} + 3H^+ \rightarrow H_3Cur$	10.748 ± 0.029	40.068 ± 0.016		

Los coeficientes de absorptividad molar están bien calculados excepto el del anfolito $HCur^{2-}$, se ahí que la desviación del ajuste no sea baja.

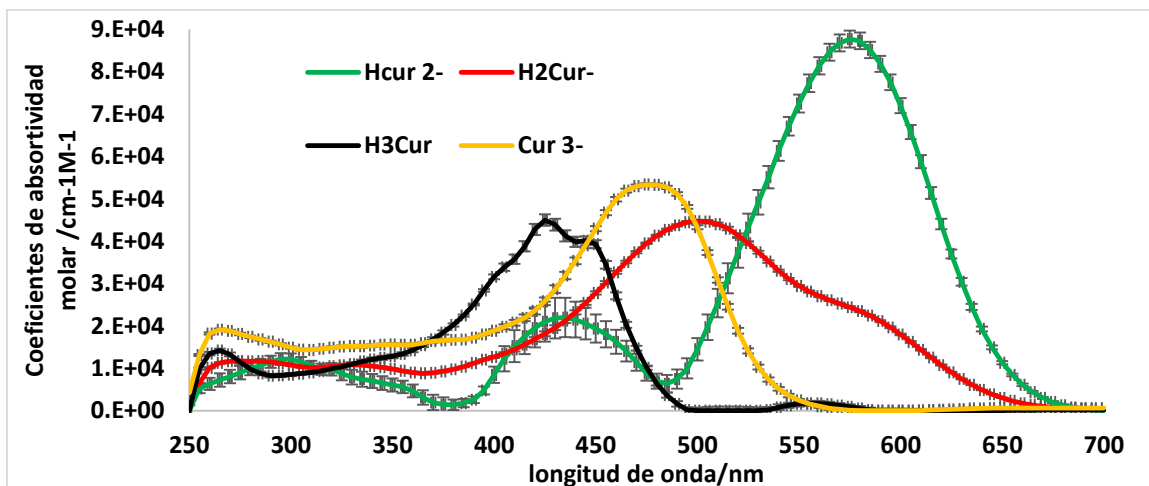
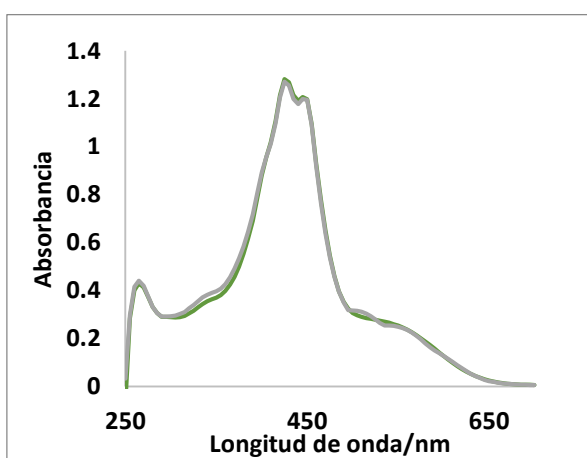
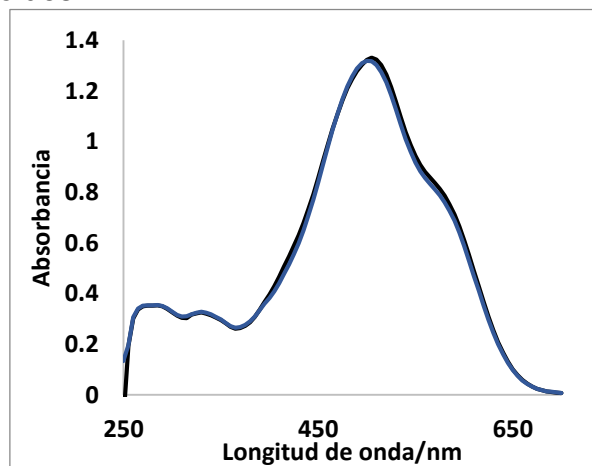


Figura 4.5.4 Gráfica de coeficientes de absorptividad molar del sistema Cur-H-CD en mezcla DMSO-Agua refinados por SQUAD.

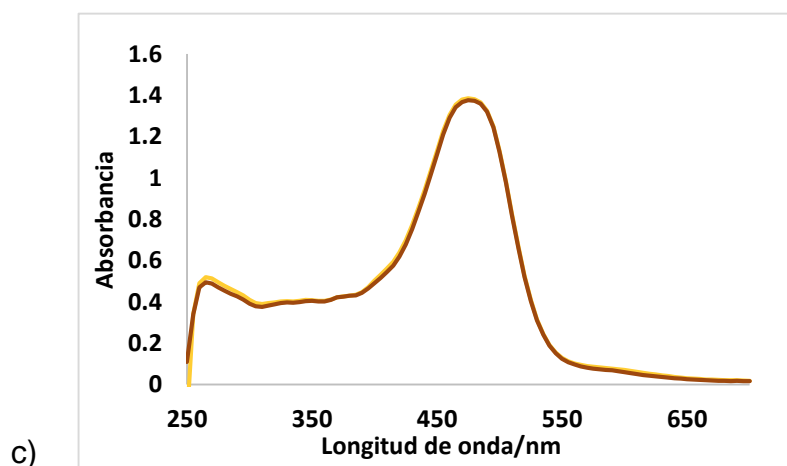
A pesar de que la desviación estándar del ajuste es relativamente alta se logra un buen ajuste en los espectros y curvas sigmoideas:



a)



b)



c)

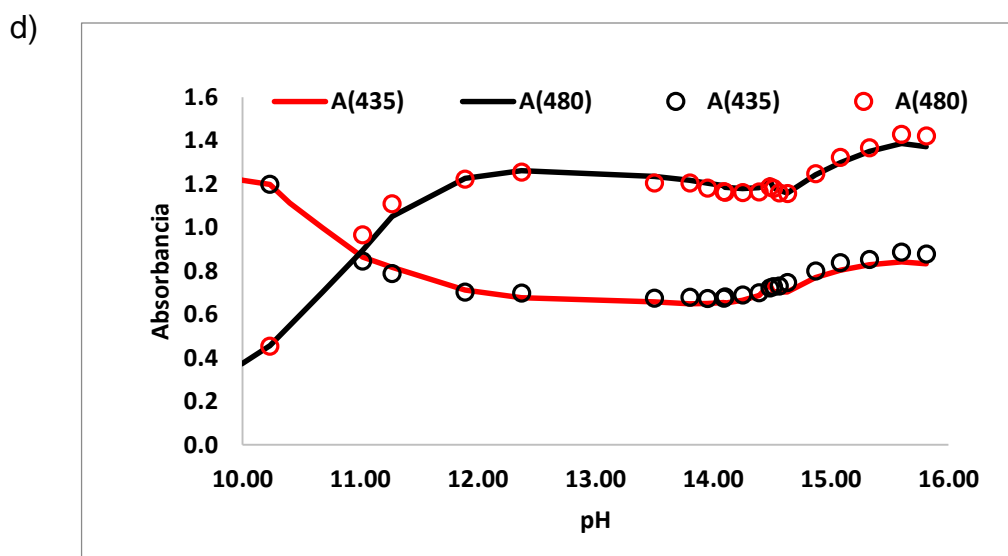


Figura 4.5.5 Comparación de resultados experimentales a diferentes valores de pH.

- a) pH 10.193
- b) pH 13.800
- c) pH 15.603
- d) Gráficas sigmoides de absorbancia a diferente longitud de onda en función de pH. Líneas continuas ajustadas con datos de SQUAD y marcadores datos experimental.

Una vez realizado el ajuste a lo observado experimentalmente, corroboramos, que en efecto el anfolito HCur^{2-} dismuta en presencia de CD.

A continuación, se presenta el diagrama de distribución de especies:

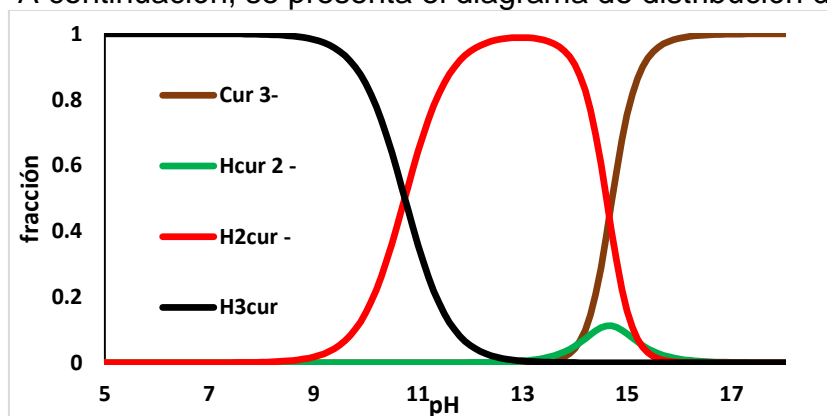


Figura 4.5.6 Diagrama de distribución de especies de Curcumina en presencia de CD construido con las constantes globales de formación refinadas con SQUAD.

A pesar de que el anfolito dismuta, el equilibrio asociado es representativo, ya que sin él la estadística en SQUAD empeora

4.6 Estudio de estabilidad de cada especie seguido por espectroscopia UV-Vis

El hecho de cambiar de disolvente, también podría influir en la estabilidad de la curcumina y también en las interacciones entre la curcumina y la CD, así que se realizó una cinética para verificar la estabilidad de la Curcumina, por ejemplo, 9, 11 y 16, para formar los complejos de inclusión y verificar su estabilidad

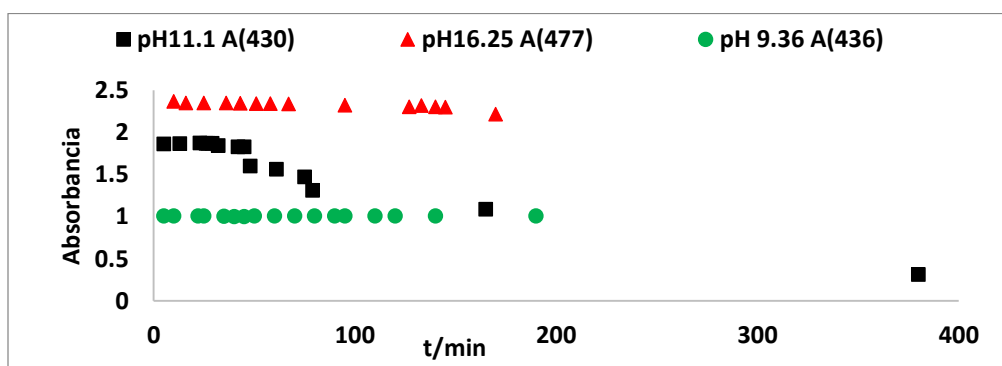
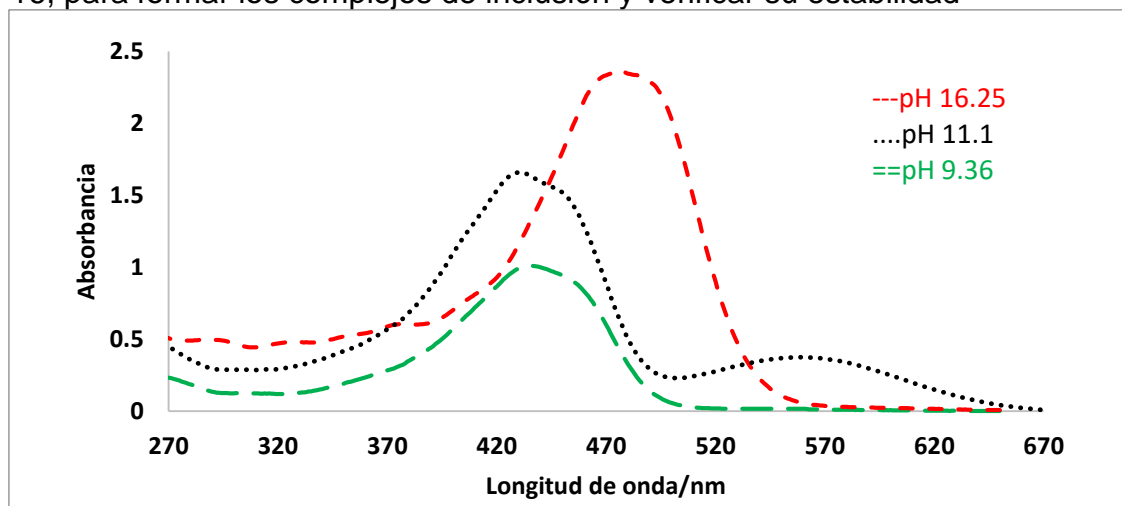


Figura 4.6.1 Espectros de absorción de curcumina a diferentes pH y gráfica de absorbancia a longitud de onda máxima en función del tiempo a $T=20^{\circ}\text{C}$

Como puede apreciarse en la figura anterior, a pH de 11.1, ocurre un cambio drástico en la absorbancia a $t=45\text{min}$, así que se tratará de formar complejos de inclusión a diferentes pH haciendo hincapié en la especie menos estable.

4.7 Estudio de interacción de Curcumina pH 9.239 (especie totalmente protonada)

Según pruebas seguidas por RMN del equipo de trabajo en el laboratorio de química analítica de la UAM-I la curcumina en esta mezcla, es estable (a pH de la mezcla) hasta por más de un mes, así que se hace una valoración puntual con ciclodextrina.

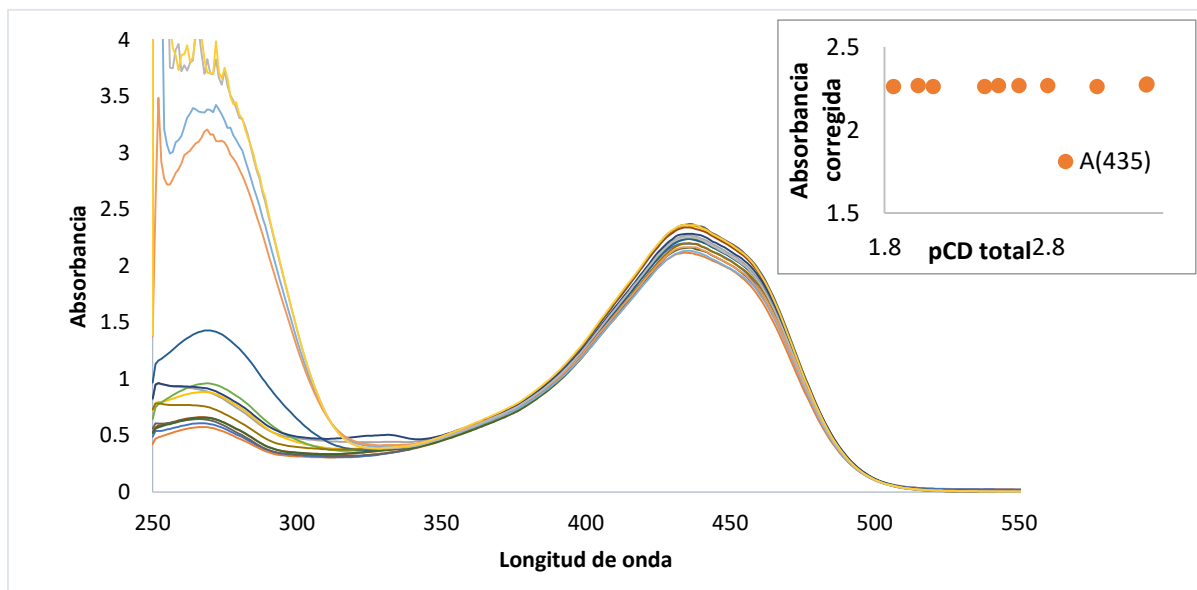


Figura 4.7.1 Espectros de absorción de la valoración continua de curcumina $4.07 \times 10^{-5} \text{M}$ con $0 < [\text{CD}] < 10^{-3} \text{M}$ (inserto) absorbancia corregida por efecto de dilución a 435nm en función de pCD total en mezcla equimolar DMSO-Agua a $T=20^\circ\text{C}$

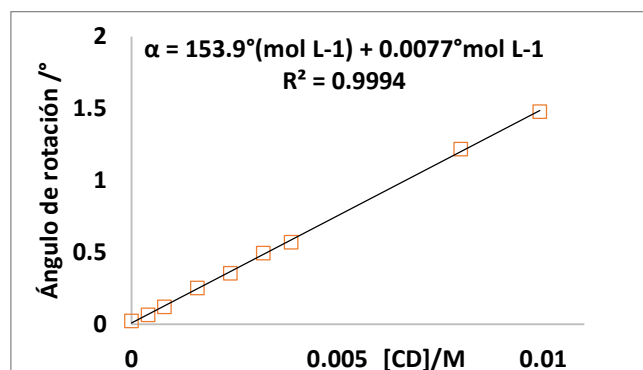


Figura 4.7.2 Gráfica de ángulo de rotación en función de la concentración de CD de la valoración continua de curcumina $4.07 \times 10^{-5} \text{M}$ con $0 < [\text{CD}] < 10^{-3} \text{M}$ en mezcla equimolar DMSO-Agua

Se observa un efecto hiperocrómico en la banda de 270nm, sin embargo, no estaría asociada a alguna interacción, sino, a la contribución de la CD y de la Curcumina.

Considerando la gráfica de Absorbancia en función de pCD vemos que el efecto hipocrómico en la banda de 430nm es únicamente debida al efecto de dilución en el sistema. Y en la gráfica de polarimetría, el ángulo de rotación molar no tiene efecto significativo en la presencia de curcumina.

4.8 Estudio de interacción de Curcumina pH 11.26 (especie H₂Cur⁻)

Se analiza este caso, por la evidencia de la descomposición poco antes de una hora, se trata de evidenciar la interacción entre Curcumina-CD y además si puede inhibirse la descomposición

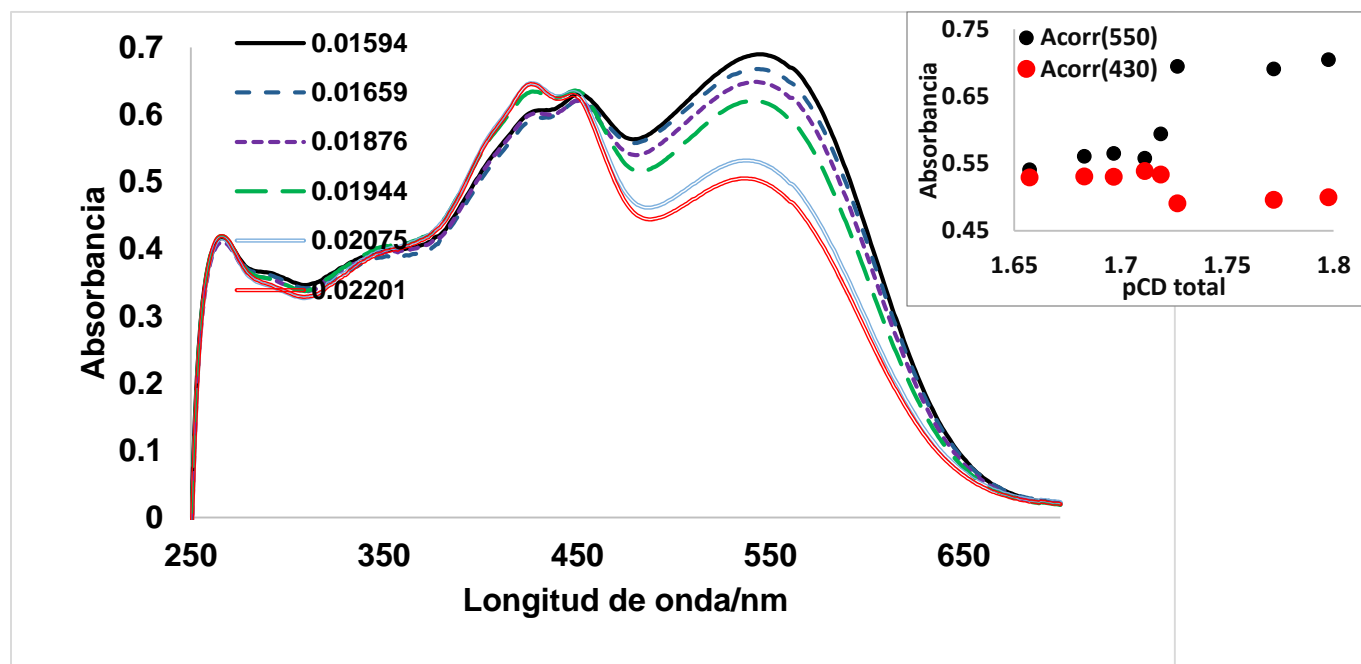


Figura 4.8.1 Espectros de absorción de la valoración continua de curcumina $3.89 \times 10^{-4} \text{M}$ con $1.53 \times 10^{-2} < [\text{CD}] < 2.2 \times 10^{-2} \text{M}$ a pH 11.26. (inserto) Absorbancia a dos longitudes de onda función de pCD total.

Se observa un efecto hipocrómico en la banda de 432nm y en la banda de 544nm un efecto hipercrómico-hipsocrómico, en cuanto a la gráfica en función de pCDtotal se ve un punto de inflexión, debido a que el pH es constante estos efectos solo se pueden atribuir a la formación de otras especies.

Se calculan el número de especies que absorben por medio de PCA en Minitab 16 obteniéndose de 2 a 3 componentes, por lo tanto, se puede decir que existen 1 equilibrio.

Es probable que, debido a la poca información recabada en esta actividad experimental por la ventana de pH en la cual se puede realizar, no se pudo lograr un buen ajuste con el modelo de especies mono y diméricas ni con el programa computacional SQUAD

Conclusiones

Se han evidenciado diferentes interacciones tanto en medio ácido como en medio básico en medio acuoso y en mezcla equimolar.

En medio acuoso se obtuvieron $\log\beta$ preliminares por ajuste visual entre un modelo teórico y los datos obtenidos experimentalmente que posteriormente fueron corroborados por SQUAD.

En cuanto al comportamiento de CD en medio acuoso, se evidenció el pKa aproximado de 12.05 por potenciometría y polarimetría.

Debido a que en medio acuoso difícilmente se pudo mantener estable el complejo de inclusión formado con el exceso de CD a pesar de los cuidados como lo es el burbujeo con N₂, almacenamiento en frasco ámbar y preparación de sistemas en fresco se decidió cambiar de solvente por una mezcla equimolar DMSO/Agua.

Se determinó el valor de pK_M de la mezcla el cual es aproximadamente 17.5, lo cual es de gran ayuda para poder modelar valoraciones potenciométricas, además se caracterizaron por polarimetría o UV-Vis tanto la CD como la curcumina en la mezcla.

Se han comparado los efectos que existen tanto en curcumina, CD y en su interacción en medio acuoso en contraste con la mezcla equimolar.

Se determinaron las constantes de acidez por fluorescencia y absorción y las constantes de acidez condicionales en la mezcla DMSO-Agua únicamente por absorción.

Se puso en evidencia la inestabilidad a pH 11 de curcumina en la mezcla DMSO-Agua, además de realizar un estudio de interacción Cur-CD-H en la mezcla DMSO-Agua

Perspectivas

Plantear un método para determinar la escala de pH en la Mezcla Equimolar DMSO-Agua

Evidenciar si la CD se desprotona en una mezcla equimolar.

Experimentación e interpretación de espectros de fluorescencia y Curcumina-ciclodextrina en medio acuoso y mezcla DMSO-Agua.

Experimentación con CD y Curcumina a pH de predominio de las especies faltantes en medio acuoso y mezcla DMSO-Agua

Referencias

1. Aggarwal, B.B.; Kumar, A.; Bharti, A.C. Anticancer potential of curcumin: Preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* **2003**, 23, 363.
2. Lestari, M.L.; Indrayanto, G. Curcumin. *Profiles Drug Subst. Excip. Relat. Methodol.* **2014**, 39, 113.
3. Mahady, G.B.; Pendland, S.L.; Yun, G.; Lu, Z.Z. Turmeric (*Curcuma longa*) and curcumin inhibit the growth of *Helicobacter pylori*, a group 1 carcinogen. *Anticancer Res.* **2002**, 22.
4. Reddy, R.C.; Vatsala, P.G.; Keshamouni, V.G.; Padmanaban, G.; Rangarajan, P.N. Curcumin for malaria therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 326, 472.
5. Vera-Ramirez, L.; Perez-Lopez, P.; Varela-Lopez, A.; Ramirez-Tortosa, M.; Battino, M.; Quiles, J.L. Curcumin and liver disease. *Biofactors* **2013**, 39, 88.
6. Wright, L.E.; Frye, J.B.; Gorti, B.; Timmermann, B.N.; Funk, J.L. Bioactivity of turmeric-derived curcuminoids and related metabolites in breast cancer. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, 19, 6218.
7. Rao, E.V.; Sudheer, P. Revisiting curcumin chemistry part I: A new strategy for the synthesis of curcuminoids. *Indian J. Pharm. Sci.* **2011**, 73, 262.
8. Naksuriya, O.; Okonogi, S.; Schiffelers, R.M.; Hennink, W.E. Curcumin nanoformulations: A review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. *Biomaterials* **2014**, 35, 3365.
9. Sandur, S.K.; Pandey, M.K.; Sung, B.; Ahn, K.S.; Murakami, A.; Sethi, G.; Limtrakul, P.; Badmaev, V.; Aggarwal, B.B. Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. *Carcinogenesis* **2007**, 28, 1765.
10. Griesser Markus, Pistis Valentina, Suzuki Takashi, Tejera Noemi, Pratt Derek A., Schneider Claus. Autoxidative and Cyclooxygenase-2 Catalyzed Transformation of the Dietary Chemopreventive Agent Curcumin. *J. BIOL CHEM.* **2011**, 286, 1114.
11. Ying-Jan Wang, Min-Hsiung Pan, Ann-Lii Cheng, Liang-In Lin, Yuan-Soon Ho, Chang-Yao Hsieh and Jen-Kun Lin. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* **1997**, 15, 1867.

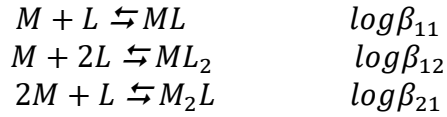
12. J. Bodell, Qiuping Ye, N. Pathak and Pongracz. Oxidation of eugenol to form DNA adducts and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: Role of quinone methide derivative in DNA adduct formation. *Carcinogenesis*. **1998**, 19, 437.
13. Van der Woude, Alink, Van Rossum, Walle, Van Steeg, Walle and M. Rietjens. Formation of Transient Covalent Protein and DNA Adducts by Quercetin in Cells with and without Oxidative Enzyme Activity. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, 18, 1907.
14. Haim, Nemecek, Roman and K. Sinha. Peroxidase-catalyzed Metabolism of Etoposide (VP-16-213) and Covalent Binding of Reactive Intermediates to Cellular Macromolecules. *CANCER RESEARCH*. **1987**, 47, 5835.
15. Taatjes, Gaudiano, Resing, and Tad H. Koch. Alkylation of DNA by the Anthracycline, Antitumor Drugs Adriamycin and Daunomycin. *J. Med. Chem.* 1996, 39, 4135.
16. Bernard, Wang, Narlawar, Schmidt, and L. Kirk. Curcumin Cross-links Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Polypeptides and Potentiates CFTR Channel Activity by Distinct Mechanisms. *The journal of biological chemistry*. 2009, 284, 30754.
17. Slobodan V. Jovanovic, Steen Steenken, Charles W. Boone, and Michael G. Simic. H-Atom Transfer Is A Preferred Antioxidant Mechanism of Curcumin. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 9677.
18. J. Szejtli. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1743.
19. T. R. Morrison., R.N. Boyd. "Química Orgánica". Edit. Iberoamericana 5a ed. Estados Unidos. **1987**.
20. W. Saenger. Structures of the Common Cyclodextrins and Their Larger Analogues. *Beyond the Doughnut Chem. Rev.* **1998**, 98, 1787.
21. D. French, M.L. Levine, J.H. Pazul y E. Norberg. Studies on the Schardinger Dextrins. The Preparation and Solubility Characteristics of Alpha, Beta and Gamma Dextrins *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 76, 353.
22. M. Opallo, N. Kabayashi y O. Tetsuo. The Complexation of 2,3-Anthracenedicarboxylate by β - and γ -Cyclodextrins in Mixed Solvent Systems as Studied by Induced Circular Dichroism. The Role of Cosolvent Hydrophobicity *J. Inclusion Phenom.* **1989**, 6, 413.
23. B. Siegel, A. Pinter, R. Breslow, Synthesis of Cycloheptaamylose 2-, 3-, and 6-Phosphoric Acids, and a Comparative Study of Their Effectiveness as General Acid or General Base Catalysts with Bound Substrates. *J. Am. Chem.* **1977**, 99, 2309.

24. Adele Mucci, Luisa Schenetti, Maria A. Vandelli, Barbara Ruozi and Flavio Forni. Evidence of the Existence of 2:1 Guest[^]Host Complexes between Diclofenac and Cyclodextrins in D₂O Solutions. A ¹H and ¹³CNMR Study on Diclofenac/ β -Cyclodextrin and Diclofenac/2-Hydroxypropyl- β cyclodextrin Systems. J. Chem. Research (S), **1999**, 414.
25. Sideris EE, Valsami GN, Koupparis MA, Macheras PE.. Determination of association constants in cyclodextrin/drug complexation using the Scatchard plot: Application to β -cyclodextrin/anilinonaphthalenesulfonates. Pharm Res. **1992**, 9,1568.
26. T. Takagi, et al., "A Provisional Biopharmaceutical Classification of the Top 200 Oral Drug Products in the United States, Great Britain, Spain and Japan," Molecular Pharmaceutics. **2006**, 6, 631.
27. C.H. Dubin, "Formulation Strategies for Poorly Soluble Drugs," Drug Delivery Technology. **2006**, 6, 34.
28. Margarita Bernabé-Pineda, Ma. Teresa Ramírez-Silva, Mario Romero-Romo, Enrique González Vergara, Alberto Rojas-Hernández. "Determination of acidity constants of curcumin in aqueous solution and apparent rate constant of its decomposition". Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, **2004**, 60, 1091.
29. Roquette. Kleptose® β -cyclodextrins and hydroxypropil β -cyclodextrins documents.

Anexo 1

Generalización del método para especies mono y diméricas

Supongamos un sistema de componente M, que puede presentar el equilibrio de dimerización y además puede formar las especies ML y ML₂



Definimos la concentración total de M, la cual consideramos constante, y las fracciones de cantidad que contienen M, de la siguiente manera:

$$[M]_{total} = [M] + [ML] + [ML_2] + 2[M_2L] = Constante$$

$$f_M = f_{10} = \frac{[M]}{[M]_{total}}$$

$$f_{ML} = f_{11} = \frac{[ML]}{[M]_{total}}$$

$$f_{ML_2} = f_{12} = \frac{[ML_2]}{[M]_{total}}$$

$$f_{M_2L} = f_{21} = \frac{2[M_2L]}{[M]_{total}}$$

Redefiniendo:

$$[M]_{total} = [M] + \beta_{11}[M][L] + \beta_{12}[M][L]^2 + 2\beta_{21}[M]^2[L]$$

$$f_{10} = \frac{1}{1 + \beta_{11}[L] + \beta_{12}[L]^2 + 2f_{10}\beta_{21}[L][M]_{total}}$$

Tenemos en ambos lados de la igualdad a la fracción f_{10} , reacomodamos la ecuación anterior para obtener una ecuación cuadrática.

$$f_{10}(1 + \beta_{11}[L] + \beta_{12}[L]^2 + 2f_{10}\beta_{21}[L][M]_{total}) = 1$$

$$-1 + f_{10} + f_{10}(\beta_{11}[L] + \beta_{12}[L]^2) + 2f_{10}^2 \beta_{21}[L][M]_{total} = 0$$

Resolviendo se obtienen las raíces, una de ellas sin significado

$$f_{10} = -(\beta_{11}[L] + \beta_{12}[L]^2) + \sqrt{\frac{(\beta_{11}[L] + \beta_{12}[L]^2)^2 - 4(2\beta_{21}[L][M]_{total})(-1)}{2(2\beta_{21}[L][M]_{total})}}$$

$$f_{11} = f_{10}\beta_{11}[L]$$

$$f_{12} = f_{10}\beta_{12}[L]^2$$

$$f_{21} = 2f_{10}\beta_{21}[M][L] = 2f_{10}^2\beta_{21}[L][M]_{total}$$

Con la ecuación anterior obtenemos el diagrama de distribución para especies mono y diméricas.

Ahora bien, la respuesta ρ está definida por la contribución de cada especie

$$\rho = \delta_M[M] + \sum_{j=1}^n \delta_{ML_j}[(M)L_j] + \delta_L[L]$$

Anexo 2

Análisis de componentes principales (PCA, principal components analyst)

El análisis de componentes principales es un procedimiento para identificar un número de variables no correlacionadas, denominadas "componentes principales", es decir, consiste en explicar la máxima cantidad de varianza en un conjunto de datos grande.

El análisis de componentes principales se utiliza frecuentemente como un solo paso en una serie de análisis. Puede utilizar el análisis de componentes principales para reducir el número de variables y evitar la multicolinealidad, o cuando tenga demasiados predictores en relación con el número de observaciones.

En este trabajo se utiliza para obtener los componentes principales que se relacionan con las especies que absorben en una serie de espectros de absorbancia o fluorescencia.

Algoritmo

Se considera una serie de variables (x_1, x_2, \dots, x_p) sobre un grupo de datos de interés y se trata de calcular, a partir de ellas, un nuevo conjunto de variables (y_1, y_2, \dots, y_p) no correlacionadas entre sí cuyas varianzas vayan decreciendo progresivamente.

Cada y_j (donde $j = 1, \dots, p$) es una combinación lineal de las x_1, x_2, \dots, x_p originales, es decir:

$$y_j = e_{j1}x_1 + e_{j2}x_2 + \dots + e_{jp}x_p = e_j^\circ x$$

Siendo $e_j^\circ = (e_{1j}, e_{2j}, \dots, e_{pj})$ un vector constante y

$$x = \begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \vdots \\ x_p \end{pmatrix}$$

Si queremos maximizar la varianza simplemente podríamos aumentar los coeficientes e_{ij} . Para ello, para mantener la ortogonalidad de la transformación se impone la siguiente restricción:

$$e_j^\circ e_j = \sum_{k=1}^p e_{kj}^2 = 1$$

El primer componente se calcula eligiendo a e_1 de modo que y_1 tenga la mayor varianza posible sujeta a la restricción de $e_1^\circ e_1 = 1$. El segundo componente se calcula obteniendo e_2 de modo que la variable obtenida y_2 , no este correlacionada con y_1 ; del mismo modo se calculan y_1, y_2, \dots, y_p , no correlacionadas entre sí, de manera que las variables aleatorias obtenidas vayan teniendo cada vez menor varianza.

Proceso de extracción de factores:

Queremos elegir e_1 de modo que maximice la varianza de y_1 sujeta a la restricción de que $e_1^\circ e_1 = 1$

$$Var(y_1) = Var(e_1^\circ x) = e_1^\circ \Sigma e_1$$

Donde Σ es la matriz de covarianzas de orden p .

El método habitual para maximizar una función de varias variables sujeta a restricciones es el método de los multiplicadores de Lagrange.

La incógnita es el vector e_1 que nos dé una combinación lineal óptima, para ello construimos una función lineal Q maximizada.

$$Q(e_1) = e_1^\circ \Sigma e_1 - \lambda(e_1^\circ e_1 - 1)$$

$$\frac{\partial Q}{\partial e_1} = 2\Sigma e_1 - 2\lambda e_1 = 0 \rightarrow (\Sigma - \lambda I)e_1 = 0$$

Por lo tanto, vemos que se trata de un sistema de ecuaciones lineal, para que tenga solución diferente se cero, la matriz $\Sigma - \lambda I$ debe de ser singular, es decir, determinante igual a cero $|\Sigma - \lambda I| = 0$, por lo tanto, λ es un valor propio de Σ , así que Σ tendrá p valores propios distintos $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_p$ tales que, $\lambda_1 > \lambda_2 > \dots > \lambda_p$

Desarrollando la expresión anterior tenemos que:

$$(\Sigma - \lambda I)e_1 = 0 \rightarrow \Sigma e_1 = \lambda e_1$$

Expresando en términos de varianza:

$$\text{Var}(y_1) = e_1^T \Sigma e_1 = e_1^T \lambda I e_1 = e_1^T \lambda e_1 = \lambda \cdot 1 = \lambda$$

Entonces todos los componentes y_i (en total p) se pueden expresar como el producto de una matriz formada por los vectores propios, multiplicada por el vector x que contiene las variables originales x_1, x_2, \dots, x_p

$$y = e \cdot x$$

Donde

$$y = \begin{bmatrix} y_{11} \\ \vdots \\ y_{n1} \end{bmatrix} e = \begin{pmatrix} e_{11} & e_{12} & \dots & e_{1p} \\ e_{21} & e_{22} & \dots & e_{2p} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ e_{n1} & e_{n2} & \dots & e_{np} \end{pmatrix} x = \begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \vdots \\ x_p \end{pmatrix}$$

Con

$$\begin{aligned} \text{Var}(y_1) &= \lambda_1 \\ \text{Var}(y_2) &= \lambda_2 \\ &\dots \\ \text{Var}(y_p) &= \lambda_p \end{aligned}$$

Por lo tanto, para la aplicación en este trabajo tendremos como variables aleatorias Absorbancia o Intensidad de Fluorescencia a una longitud de onda (para cada longitud de onda en un intervalo de energía) en espectroscopia UV y de Fluorescencia.

La interpretación de los componentes principales que representen el 100% de la varianza acumulada será relacionada a las especies absorbentes para plantear el número de equilibrios posibles.

Anexo 3

Programa computacional para el cálculo de datos termodinámicos. SQUAD

Debido a la importancia de conocer las constantes de formación de diferentes especies ya que con éstas se pueden encontrar con mayor facilidad las condiciones de trabajo óptimas para casi cualquier experimentación.

La determinación de constantes de acidez o inclusión se pueden determinar a partir de diferentes métodos analíticos, de los cuales el más empleado es la espectrofotometría UV/Vis, debido a su sensibilidad y bajo costo relativo, ya que por lo regular se emplean soluciones diluidas.

Se han desarrollado paquetes computacionales por ejemplo SQUAD, que permiten refinar distintos parámetros termodinámicos como son las constantes de formación global o también llamadas constantes de formación sucesivas.

SQUAD (Stability Quotients from Absorbance Data) escrito por Leggett [1] y fue programado en lenguaje Fortran y está diseñado para refinar los valores para las constantes de estabilidad para un modelo propuesto, esto lo realiza por minimización de la suma de residuales al cuadrado de los valores de las absorbancias o fluorescencia.

El modelo químico propuesto puede ser dependiente o independiente del pH y puede tener especies del tipo:

M_p, L_q, H_j donde $p, q, \geq 0$ y j es positiva para protones, negativa para iones hidroxilo o cero.

La constante de estabilidad global puede ser expresada por la forma general:

$$\beta_{pqj} = \frac{[M_p L_q H_j]}{[M]^p [L]^q [H]^r}$$

Para un número i de soluciones medidas y un número k de longitudes de onda, la absorbancia A_{ik} se define por:

$$A_{ik} = l \sum_j^{nc} \epsilon_{kj} C_j$$

donde ϵ_{kj} es el coeficiente de absortividad molar de cada una de las especies $M_p L_q H_j$ a cada longitud de onda k , l es la longitud del paso óptico, y C_j es la concentración de cada especie.

El refinamiento de las constantes se realiza por medio de una minimización de la suma de los residuos de absorbancia o intensidad de fluorescencia, cuadráticos por mínimos cuadrados no lineales, empleando el algoritmo de Gauss-Newton.

$$U = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^{NW} (R_{i,k}^C - R_{i,k}^E)^2$$

I = todas las soluciones.

NW = todas las longitudes de onda.

$R_{i,k}^C$ = Respuesta (absorbancia o fluorescencia) calculada por SQUAD en la i-ésima solución a la k-ésima longitud de onda.

$R_{i,k}^E$ = Respuesta (absorbancia o fluorescencia) experimental en la i-ésima solución a la k-ésima longitud de onda.

La resolución de la minimización requiere el cálculo de las respuestas a la k-ésima longitud de onda en la i-ésima solución.

En cuanto espectrofotometría UV-Vis, para conocer los valores de absorbancia se necesita resolver la ecuación de Beer; SQUAD propone los coeficientes de absorptividad molar por especie, y determina la concentración de cada una empleando el algoritmo de Newton-Raphson.

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

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

- Parámetro de correlación (matriz)
- La desviación estándar sobre los datos de absorbancia (σ_{datos}), y de las constantes ($\sigma_{\text{ctes.}}$).
- La desviación estándar por espectro (σ_{espectro}).
- La desviación estándar sobre los coeficientes de absorptividad molar ($\sigma_{\text{coef.}}$)

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

[1] Leggett, D., *Computational Methods for the Determination of Formation Constants*. First ed. Plenum Press. New York, 1985.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 0070

México 21/08/2018

Determinación de las constantes de inclusión de los complejos formados en el sistema curcumina- β -Hidroxi-propil- β -ciclodextrina en medio acuoso y mezcla DMSO/agua

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 28 del mes de agosto del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MARIA TERESA RAMIREZ SILVA
DRA. MARIA DEL ROSARIO MOYA HERNANDEZ
DRA. GABRIELA ROA MORALES

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS (QUÍMICA)
DE: LINDA ALZUCENA LUNA ORTEGA

y de acuerdo con el artículo 70 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



LINDA ALZUCENA LUNA ORTEGA
ALUMNA

REVISÓ



LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVSIÓN DE CBI



DR. JOSÉ GILBERTO CORDOBA HERRERA

PRESIDENTA



DRA. MARIA TERESA RAMIREZ SILVA

VOCAL



DRA. MARIA DEL ROSARIO MOYA HERNANDEZ

SECRETARIA



DRA. GABRIELA ROA MORALES