

**CÁLCULO DE LA ENERGÍA DE ASOCIACIÓN ENTRE
POLI(DIMETILSILOXANO) Y MONOTERPENOS,
SESQUITERPENOS Y TERPENOS OXIGENADOS, UTILIZANDO
MÉTODOS COMPUTACIONALES**

Ciro Eduardo Rozo Correa

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
LABORATORIO DE CROMATOGRFÍA
CIBIMOL
BUCARAMANGA
2005**

**CÁLCULO DE LA ENERGÍA DE ASOCIACIÓN ENTRE
POLI(DIMETILSILOXANO) Y MONOTERPENOS,
SESQUITERPENOS Y TERPENOS OXIGENADOS, UTILIZANDO
MÉTODOS COMPUTACIONALES**

Ciro Eduardo Rozo Correa

Trabajo de Grado presentado como
requisito parcial para optar al título de
Químico

**Director: Jairo René Martínez,
Químico, Ph.D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
LABORATORIO DE CROMATOGRAFÍA
CIBIMOL
BUCARAMANGA
2005**

Por supuesto a mis padres Ciro y Magdalena

AGRADECIMIENTOS

Al Profe Jairo René Martínez por su perseverancia, dedicación, y grandes aportes para la realización de este proyecto.

A la Doctora Elena Stashenko por la oportunidad de desarrollar este trabajo en el laboratorio de cromatografía.

Al Profesor Alirio Palma por permitirme trabajar en los computadores del laboratorio de síntesis orgánica fina.

A los calificadores, los profesores Cristian Blanco y Martha Daza por el tiempo dedicado a la evaluación de este proyecto.

A mis amigos y compañeros de trabajo.

TÍTULO

CÁLCULO DE LA ENERGÍA DE ASOCIACIÓN ENTRE POLI(DIMETILSILOXANO) Y MONOTERPENOS, SESQUITERPENOS Y TERPENOS OXIGENADOS, UTILIZANDO MÉTODOS COMPUTACIONALES*

AUTOR

Ciro Eduardo Rozo Correa**

PALABRAS CLAVES:

Energía de asociación, Hipersuperficies de Múltiples Mínimos, Poli(dimetilsiloxano), Enlaces y fuerzas de interacción, Micro-Extracción en Fase Sólida, Cromatografía de gases.

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió la energía de asociación entre el polidimetilsiloxano, PDMS y limoneno, α -pineno, α -terpineno, cariofileno, geraniol, linalol, terpinen-4-ol, neral, geranial y eucaliptol. Este tipo de investigación puede utilizarse para el estudio de la técnica de micro-extracción en fase sólida (SPME), ya que en este caso se utiliza el PDMS como recubrimiento de la fibra.

Para calcular los valores de la energía de asociación, se emplearon tres metodologías. La primera, la aproximación de la Hipersuperficie de Múltiples Mínimos (MMH) una molécula de terpeno es solvatada por un número de unidades repetitivas de PDMS, la segunda y tercera aproximación se enfoca en el cálculo de la energía de arreglos de una molécula de terpeno con un segmento de PDMS de 10 monómeros de dimetilsiloxano y tres de estos segmentos de PDMS. Estos cálculos se utilizaron las aproximaciones de mecánica molecular, dinámica molecular, método mecano cuántico semi-empírico PM3 y reconocimiento molecular (*DOCKING*) y los paquetes de programas de Montero (GRANADA, MOPAC 6.0 y Q3), Hyperchem 7.5, y Hex 4.2. y para el método de análisis de componentes principales (PCA), el programa STATISTICA 6.0.

Las energías de asociación entre los terpenos y el PDMS fueron calculadas con las metodologías descritas, sugieren ordenes de asociación terpeno-PDMS diferentes a los logrados con base en los perfiles de extracción de SPME obtenidos por HRGC-FID. Los grupos de terpenos resultantes del PCA para cada una de las metodologías tanto computacional como experimental fueron similares. El grupo de monoterpenos limoneno, α -pineno y α -terpineno, se encontró rodeado del sesquiterpeno cariofileno y del grupo de terpenos oxigenados geraniol, linalol, terpinen-4-ol, neral, geranial y eucaliptol.

*Tesis

**Facultad de ciencias, Escuela de química, Jairo René Martínez

TITLE

CALCULATION OF THE ENERGY OF ASSOCIATION BETWEEN POLI(DIMETILSILOXANO) AND MONOTERPENOIDS, SESQUITERPENOIDS AND TERPENOIDS OXYGENATED, USING METHODS COMPUTACIONALES

AUTHOR

Ciro Eduardo Rozo Correa**

KEY WORDS

Association Energy, Multiple Minima Hypersurfaces, Poly(dimethylsiloxane), Bonds and interaction forces, Solid Phase Micro-extraction, gas Chromatography.

ABSTRACT

In the present work the association energy between polydimethylsiloxane, PDMS and limonene, α -pinene, α -terpinene, caryophyllene, geraniol, linalool, terpin-4-ol, neral, geranial and eucalyptol was calculated. This type of investigation can be used for the study of the of solid phase microextraction (SPME) technique, since in this case PDMS is used for fiber coating.

In order to calculate the values of the association energy, three methodologies were employed. In the first one, the Multiple Minima Hypersurfaces (MMH) approach, one terpene molecules is solvated by a number of PDMS repeat units; the second and third approaches focus on the calculation of the energy of an arrangement of one terpene molecule with either a ten-monomer PDMS segment, or three of these PDMS segments. The calculations were performed by means of molecular dynamics, molecular mechanics, semi-empirical quantum mechanical methods (PM3) and molecular recognition (DOCKING), with the program packages of Montero (GRANADA, 6,0 MOPAC and Q3), Hyperchem 7,5, and Hex 4.2. and for the method of main components analysis (PCA), the STATISTICA 6.0 program.

The association energies between the terpenoids and the PDMS calculated with the methodologies described, suggest an association order of terpenoid-PDMS different from that obtained from the SPME extraction profiles obtained by HRGC-FID. The groups of terpenoids observed with PCA for each one of the computational methodologies were similar to those calculated from experiment. The monoterpene group formed by limonene, α -pinene and α -terpinene, was surrounded by the caryophyllene sesquiterpenoid and by the group of oxygenated terpenoids geraniol, linalool, terpin-4-ol, neral, geranial and eucalyptol.

*Tesis

**Facultad de ciencias, Escuela de química, Jairo René Martínez

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ESTADO DEL ARTE	5
2.1. Energía de Asociación	5
2.2. Enlaces y fuerzas de interacción	6
2.3. Mecánica molecular	8
2.4. Método PM3 (método Paramétrico 3)	9
2.5. Dinámica molecular	10
2.6. Molecular <i>docking</i>	10
2.7. Modelación de los efectos de solvente	11
2.7.1. La aproximación de la Hipersuperficie de Múltiples Mínimos.	12
2.7.2. GRANADA - Distribución aleatoria de moléculas alrededor de un sistema poliatómico central	12
2.7.3. Termodinámica estadística	13
2.7.4. Q3 - Evaluación estadística de la distribución de moléculas alrededor de un sistema poliatómico central en las hipersuperficies de múltiples mínimos	14
2.8. Cromatografía de gases	15
2.8.1. Sistemas de detección.	15
2.8.1.1. Detector de ionización en llama	16
2.8.2. Ley de Henry	16
2.8.3. K_D en cromatografía	17
2.9. Micro-Extracción en Fase Sólida	17
2.10. Poli(dimetilsiloxano)	22
2.11. Aceites Esenciales	23
2.11.1. Terpenoides	23
2.12. Análisis de componentes principales	24
2.12.1. Gráficas de PCA	27
2.13. Histogramas	29
3. METODOLOGÍA	31
3.1. PARTE TEÓRICA	31
3.1.1. Optimización de la geometría de las moléculas individuales	32
3.1.2. Primera metodología – MMH	33
3.1.3. Segunda metodología – Hebra	34
3.1.4. Tercera metodología – Ovillo	35
3.2. PARTE EXPERIMENTAL	36
3.2.1. Micro-Extracción en Fase Sólida en el modo <i>headspace</i>	36
3.2.1.1. Recubrimiento empleado	36
3.2.1.2. Selección de terpenoides	36
3.2.1.3. Preparación de las soluciones de patrones	37
3.2.1.4. HRGC/FID	37
3.3. PARTE ESTADÍSTICA	38
3.3.1. Análisis PCA de los datos obtenidos teórica y experimentalmente	38

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS	39
4.1. PARTE TEÓRICA	39
4.1.1. Optimización de la geometría de las moléculas individuales	39
4.1.1. Primera metodología –MMH	40
4.1.1.1. Cálculo de la cantidad de moléculas necesarias para el efecto de solvatación de los terpenos	40
4.1.1.2. Obtención de la distribución de la energía de los agregados obtenidos por GRANADA	42
4.1.1.3. Cálculo de la energía de asociación de los terpenos	43
4.1.2. Segunda metodología – Hebra	44
4.1.2.1. Obtención de la distribución de la energía de los agregados obtenidos por <i>DOCKING</i>	44
4.1.2.3. Cálculo de la energía de asociación de los terpenos	48
4.1.3. Tercera metodología - Ovillo	50
4.1.3.1. Obtención de la distribución de la energía de los agregados obtenidos por <i>DOKING</i>	50
4.1.3.2. Cálculo de la energía de asociación de los terpenos	51
4.2. PARTE EXPERIMENTAL	52
4.2.1. Perfiles de saturación por HS-SPME	52
4.3. Parte Estadística	56
4.3.1. Análisis PCA de los datos obtenidos por la primera metodología – MMH	56
4.3.2. Análisis PCA de los datos obtenidos por la segunda metodología – Hebra	58
4.3.3. Análisis PCA de los datos obtenidos por la tercera metodología - Ovillos	59
4.3.4. Análisis PCA de los datos obtenidos experimentalmente	61
4.4. Comparación de las metodologías	
5. CONCLUSIONES	66
6. RECOMENDACIONES	67
7. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	68
ANEXO 1	74
ANEXO 2	78
ANEXO 3	80
ANEXO 4	83
ANEXO 5	86
ANEXO 6	92

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Perfil teórico de extracción por SPME.	2
Figura 2	Estructuras de los diez patrones de terpenos empleados en el presente trabajo. A. α -Pineno; B. α -Terpineno; C. Limoneno; D. 1,8-Cineol (eucaliptol); E. Linalol; F. Terpinen-4-ol; G. Neral; H. Geraniol; I. Geranial y J. <i>trans</i> - β -Cariofileno.	4
Figura 3	A. Estructura tridimensional de la triosafosfato isomerasa usada como blanco en <i>docking</i> B. Estructura tridimensional obtenida al permitir la difusión de hexano a través de cristales de la triosafosfato isomerasa. La posición de las moléculas de hexano se muestra en color negro.	11
Figura 4	Gráfica montaje de Micro-Extracción en Fase Sólida.	18
Figura 5	Comparación del mecanismo de extracción absorción y adsorción.	20
Figura 6	Gráfica de PCA en 2D, de los factor 1 y factor 2.	28
Figura 7	Dimetildimetoxisilano (DDS), fórmula $C_4H_{12}O_2Si$, peso molecular 120,22, CAS 1112-39-6.	31
Figura 8	Hebra, un oligómero de PDMS.	32
Figura 9	Ovillo, tres fragmentos de PDMS.	32
Figura 10	Histograma de la distribución de los energía de los agregados (kJ/mol) obtenidos por GRANADA para el cariofileno con el DDS, para la primera metodología - MMH.	43
Figura 11	Histograma de la distribución de las energías de los agregados (kJ/mol) obtenidos por <i>Docking</i> para el neral con la hebra, para la segunda metodología - Hebra.	48
Figura 12	Histograma de la distribución de los energía de los agregados (kJ/mol) obtenidos por <i>Docking</i> para el geranial con el ovillo, para la tercera metodología - Ovillo.	51
Figura 13	Perfiles de extracción de SPME por absorción con PDMS, A. de los 10 terpenos, B. de los 3 monoterpenos (α -pineno, α -terpineno, limoneno) y del sesquiterpeno (β -cariofileno), C. terpenos oxigenados (linalol, eucaliptol y terpinen-4-ol), D. terpenos oxigenados (geraniol, neral y geranial).	53
Figura 14	Gráfica de PCA en 2D, de los factor 1 y factor 2, con una varianza del 90.57%, para los datos de la primera metodología - MMH.	57
Figura 15	Gráfica de PCA en 2D, de los factor 1 y factor 2, con una varianza del 91.73%, para los datos de la segunda metodología - Hebra.	59
Figura 16	Gráfica de PCA en 2D, de los factor 1 y factor 2, con una varianza del 88.63%, para los datos de la tercera metodología - Ovillo.	61
Figura 17	Gráfico de PCA en 2D, de los factor 1 y factor 2, con una varianza del 93.35%, para los datos experimentales.	63

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Pureza de patrones certificados de monoterpenos, sequiterpenos y terpenos oxigenados.	37
Tabla 2	Energías electrónicas de los terpenos de los terpenos estudiados, obtenidos mediante, MM y PM3.	39
Tabla 3	Energía de referencia de los terpenos para el cálculo de la energía de asociación.	40
Tabla 4	Energías de asociación para el limoneno y el linalol a diferentes valores de n.	41
Tabla 5	Cálculo de la máxima cantidad de moléculas de dimetildimetoxisilano, con las que se puede calcular en MOPAC.	42
Tabla 6	Resultados de termodinámica estadística calculados por Q3 para la primera metodología - MMH, energía de asociación (E _{ass}), entropía (S), Función de partición absoluta, Función de partición relativa y energía libre de Helmholtz (F).	44
Tabla 7	Número de agregados obtenidos para cada terpeno por <i>Docking</i> para la segunda metodología - Hebra.	47
Tabla 8	Resultados de termodinámica estadística calculados por Q3 para la segunda metodología - Hebra.	49
Tabla 9	Número de agregados obtenidos para cada terpeno por <i>Docking</i> .	50
Tabla 10	Resultados de termodinámica estadística calculados por Q3 para la tercera metodología - Ovillo	52
Tabla 11	Resultados obtenidos experimentalmente, áreas cromatográficas (cuentas) para los terpenos.	61
Tabla 12	Valores de los componentes de peso realizados por análisis de componentes principales, para la primera metodología - MMH.	57
Tabla 13	Valores de los componentes de peso realizados por análisis de componentes principales, para la segunda metodología - Hebra.	58
Tabla 14	Valores de los componentes de peso realizados por análisis de componentes principales, para la tercera metodología - Ovillo.	60
Tabla 15	Datos para calcular el PCA de la parte experimental.	62
Tabla 16	Valores de los componentes de peso, para la parte experimental.	62
Tabla 17	Datos de las energías de asociación obtenidos por las tres metodologías y los datos experimentales de SPME.	64

ACRÓNIMOS

HS-SPME	<i>Headspace Solid-Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida en el modo <i>headspace</i>)
K	constante de distribución
PDMS	Poli(dimetilsiloxano)
PCA	análisis de componentes principales
MMH	Hipersuperficie de Múltiples Mínimos
PM3	método semi-empírico
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases)
GC-MS	<i>Gas Chromatography – Mass Spectometry</i> (Cromatografía de gases – Espectrometría de masas)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
n	Cantidad de analito extraído por el recubrimiento
K_{fs}	Constante de distribución del equilibrio fibra/muestra
V_f	Volumen de recubrimiento de la fibra
V_s	Volumen de la muestra
C_o	Concentración inicial de un analito en la muestra
PA	Poli(acrilato)
PDMS-DVB	Poli(dimetilsiloxano divinilbenceno)
A_{ad}	Concentración superficial de A en mol cm ⁻²
S_o	es la concentración total de los sitios activos en la superficie (máxima concentración en la superficie de analitos) en mol cm ⁻²
K_A	Constante de equilibrio de la adsorción
A	Concentración de A en la matriz
K_{hr}	Constante de distribución en la fase <i>headspace</i> /recubrimiento
DDS	Dimetildimetoxisilano
FID	Detector de ionización en llama
E^{ass}	Energía de Asociación
$E_{Terpeno-PDMS}$	Energía del agregado
$E_{Terpeno}$	Energías de las moléculas de terpeno individuales
E_{PDMS}	Energía de la molécula PDMS
N	Número de átomos en la molécula
ν_j	Frecuencia vibracional fundamental
MM	Mecánica molecular
V_{ten}	Energía de la molécula debido al estiramiento del enlace
V_{flex}	Energía de la molécula debido a la flexión del ángulo de enlace
V_{ffp}	Energía de la molécula debido a la flexión fuera del plano
V_{tor}	Energía de la molécula debido a la rotación interna (torsión) en torno a los enlaces
V_{cruc}	Energía de la molécula debidos a la interacciones entre estos movimientos (que producen un término cruzado)
V_{vdW}	Energía de la molécula debido a las atracciones y repulsiones de van der Waals entre átomos no ligados
V_{el}	Energía de la molécula debido a las interacciones electrostáticas

	entre átomos
MNDO	Modified neglect of diatomic overlap (negligencia modificada del solapamiento diatómico)
AM1	Austin Model 1 (modelos de Austin 1)
s	Segundos
F	Fuerza
m_i	masa a lo largo de un coordenada (x_i)
S°	Entropía molar estándar
C_p°	Capacidad calorífica
ΔH	Cambios de entalpía
Q	Función molecular de partición
HRGC/FID	<i>High Resolution Gas Chromatography / Flame Ionization Detector</i> (Cromatografía de gases de capilar con detector de ionización en llama)
min	Minutos
Kcal/mol	Kilocalorias/mol
kJ/mol	Kilojulios/mol
F	energía libre de Helmholtz
mL	Mililitros
μL	Micrólitros
DFT	Método del funcional de la densidad
DM	Dinámica molecular
fs	Femtosegundo
ps	Picosegundos

1. INTRODUCCIÓN

En el presente trabajo se estudió la energía de asociación entre terpenos como limoneno, α -pineno, α -terpineno, cariofileno, geraniol, linalol, terpinen-4-ol, citral (cis y trans) y eucaliptol con el polidimetilsiloxano, PDMS, este tipo de investigación puede ser interesante a la hora de aplicarla a la técnica de microextracción en fase sólida (SPME), ya que en este caso se utiliza el PDMS como recubrimiento de la fibra.

La técnica de extracción SPME consiste en la exposición directa de la muestra o sus vapores en una fibra de sílice fundida recubierta con un material adsorbente o absorbente. La extracción por SPME se considera completa cuando la concentración del analito alcanza el equilibrio entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de la fibra; este equilibrio puede ser evaluado, al considerar un sistema de dos fases (muestra y recubrimiento de la fibra) según lo propuesto por Louch et al., para recubrimientos que extraen analitos por absorción, o en un sistema de tres fases (muestras, *headspace* y recubrimiento de la fibra) según como lo indican Zhang y Pawliszyn, para recubrimientos que extraen analitos por adsorción.

Uno de los aspectos importantes de SPME, es que la eficiencia de la extracción depende de la interacción entre los analitos y el recubrimiento. Así pues, en los materiales absorbentes la eficiencia de la extracción dependerá de la difusión de los analitos en el recubrimiento, mientras que, en el material adsorbente dependerá de la afinidad del analito por el sitio activo de la superficie del recubrimiento. Adicionalmente, mientras la absorción es un proceso no competitivo (al principio de la extracción), la adsorción es por definición competitiva, y una molécula con alta afinidad por la superficie puede reemplazar a una molécula con baja afinidad.

Un perfil típico de extracción de SPME (Figura 1) muestra el cambio con el tiempo, de la masa absorbida por el recubrimiento para diferentes constantes de distribución K , en la fase *headspace*/recubrimiento. Además de la naturaleza química del analito, la extracción depende de la concentración y del tipo de fase estacionaria. También podemos observar cómo los analitos se van extrayendo hasta alcanzar un equilibrio, unos en mayor cantidad que otros y otros más rápido. Teóricamente en un periodo largo de extracción la cantidad de analito extraído no varía^[1, 2].

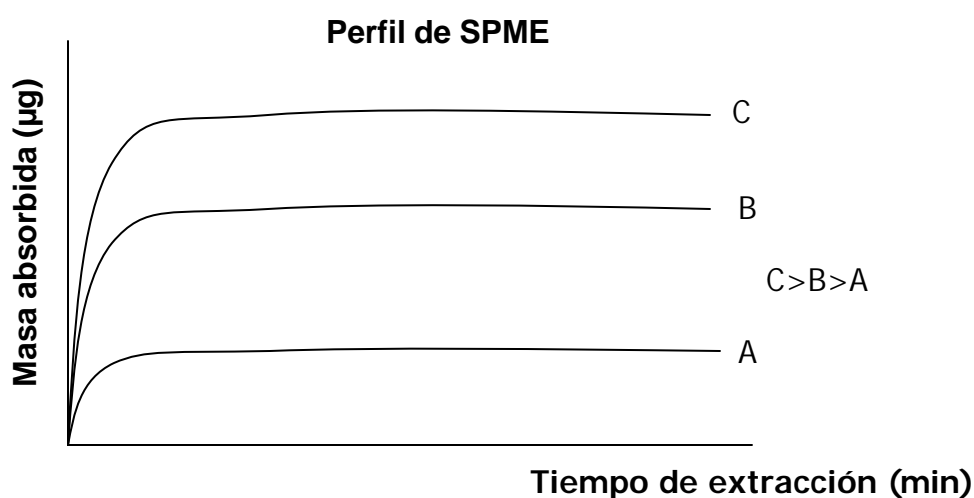


Figura 1. Perfil teórico de extracción por SPME

Teniendo en cuenta que la eficiencia de la extracción depende entre otros factores de la naturaleza química del analito, lo que a su vez está asociado con las fuerzas intermoleculares y por lo tanto con la facilidad de interacción con el recubrimiento; el cálculo de las energías de asociación entre los terpenos y el PDMS, mediante metodologías computacionales, podría ayudar a soportar el comportamiento observado experimentalmente en los perfiles de SPME de los terpenos. Cabe decir que los datos experimentales disponibles (perfiles de absorción) son afectados por la energía de asociación, pero no constituyen una medición de la energía de asociación. Dentro de los alcances de este proyecto no se incluye el estudio de la difusión de los analitos en el recubrimiento.

Para calcular los valores de la energía de asociación, se empleó la metodología de la aproximación de la Hipersuperficie de Múltiples Mínimos (MMH) ^[3,9] y una modificación de ésta. Además se utilizaron las aproximaciones de mecánica molecular, dinámica molecular, método semi-empírico (PM3) y reconocimiento molecular (*DOCKING*) y el paquete de programas de Montero (MMH) (GRANADA, MOPAC 6.0 y Q3), Hyperchem 7.5, y Hex 4.2. ^[10] y para la parte estadística se utilizó, el método de análisis de componentes principales (PCA), en el programa STATISTICA 6.0.

Entre los terpenos evaluados se encuentran los monoterpenos: limoneno, α -pineno, α -terpineno, el sesquiterpeno: cariofileno y los terpenos oxigenados: geraniol, linalol, terpinen-4-ol, citral (cis y trans), eucaliptol (Figura 2). Se escogieron estos terpenos como complemento a trabajos realizados en el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander; además se dispone de estos patrones.

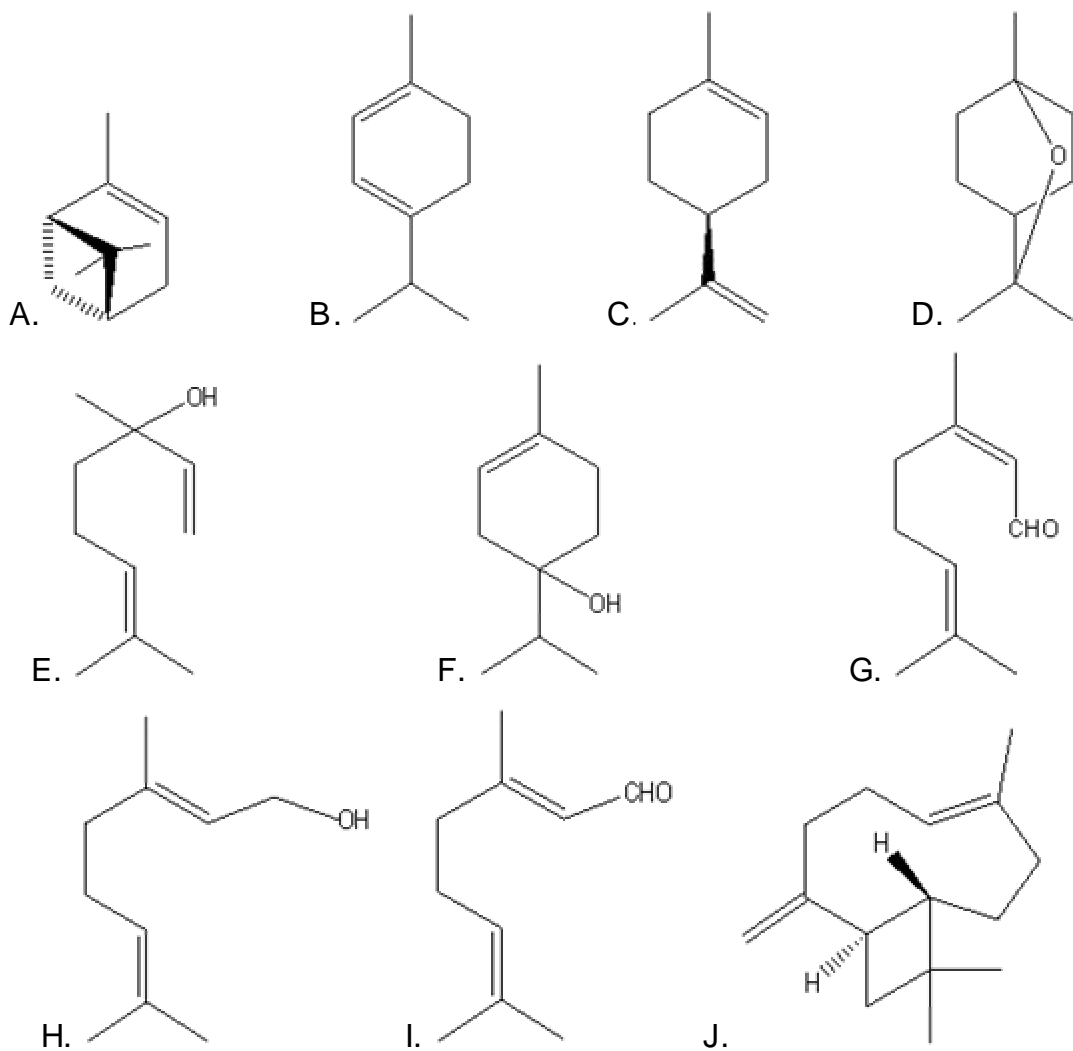


Figura 2. Estructuras de los diez patrones de terpenos empleados en el presente trabajo. A. α -Pineno; B. α -Terpineno; C. Limoneno; D. 1,8-Cineol (eucaliptol); E. Linalol; F. Terpinen-4-ol; G. Neral; H. Geraniol; I. Geranial y J. *trans*- β -Cariofileno.

2. ESTADO DEL ARTE

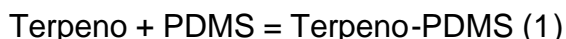
2.1. Energía de Asociación

Las moléculas generalmente no se encuentran aisladas sino en forma de conjuntos con cierto grado de cohesión. El grado de cohesión depende de tres factores:

- a) Las fuerzas de atracción que tienden a unirlos.
- b) Las fuerzas de repulsión que tienden a separarlos.
- c) La energía cinética que las mantiene dispersas.

El estudio de las tendencias de atracción y dispersión ayuda a determinar los tipos de ordenamientos internos de las partículas que constituyen las diferentes sustancias. De acuerdo con la organización interna, la materia puede existir en condiciones que van desde el desorden hasta distribuciones completamente ordenadas^[11].

El proceso de asociación entre el terpeno y el PDMS puede ser descrito como:



Donde Terpeno-PDMS es una asociación en la cual las dos moléculas no están formando enlace. Esto equivale a decir termodinámicamente que:

$$E^{\text{Asoc}} = E_{\text{Terpeno-PDMS}} - E_{\text{Terpeno}} - E_{\text{PDMS}} \quad (2)$$

Donde $E_{\text{Terpeno-PDMS}}$ es la energía del agregado, E_{Terpeno} y E_{PDMS} son las energías de las moléculas de terpeno y PDMS individuales^[3, 4].

A continuación se habla de enlaces y fuerzas de interacción una breve reseña de cada uno de ellos.

2.2. Enlaces y fuerzas de interacción

Partículas como átomos, iones y moléculas, están siempre sujetas a fuerzas de interacción que pueden causar reacciones químicas, cambios de fase (los sólidos y los líquidos), adherencia de un líquido a una superficie sólida, y la agregación de partículas en un líquido entre otros fenómenos. Sin embargo, aunque todos los aspectos antes mencionados dependen de las fuerzas de interacción, también están relacionadas con los cambios de entropía y entalpía del sistema. Generalmente, la formación de una estructura causa una disminución de la entropía, y ésta puede contrariar la tendencia de la formación, dependiendo de que su magnitud sea comparada a la de la energía implicada.

Todos los tipos de fuerzas de interacción, se originan por las fuerzas electromagnéticas, las cuales a su vez dependen de la distancia entre las partículas. Así por ejemplo, la distancia entre las partículas disminuye hasta un valor de equilibrio donde la fuerza de atracción es máxima. Sin embargo, cuando la distancia entre las partículas es menor o igual a la de sus radios de Van der Waals, se originan fuerzas de repulsión.

En general, solamente los enlaces covalentes y algunos enlaces ion-ion pueden ser bastante fuertes para dar un enlace sencillo permanente. Si la energía de enlace es pequeña, el movimiento termal de los átomos tiende a romper los enlaces dentro de un tiempo muy corto. Un gran número de enlaces débiles que actúan en las mismas moléculas o conjuntos de moléculas pueden también causar el enlace permanente. Ejemplos los enlaces de Van der Waals que sostienen las moléculas en cristales y varios enlaces débiles que mantienen las proteínas globulares una conformación compacta o que mantienen partículas floculadas.

Carga-Dipolo. Varias moléculas sin carga llevan dipolos permanentes, es decir, los centros geométricos de carga(s) positiva(s) y de carga negativa(s) no coinciden. Tales moléculas por lo tanto tienen un momento dipolar y se llaman polares. Las

interacciones de carga-dipolo son siempre atractivas, puesto que el dipolo es libre de orientarse de una manera tal que el extremo positivo de la molécula está cerca de un catión.

Fuerzas Van der Waals. Éstas son ubicuas: actúan entre todas las moléculas y son siempre atractivas. Pueden ser debido a tres interacciones algo diversas:

1. Dipolo-dipolo: se origina cuando el extremo positivo de una molécula está cerca del negativo de otra.

2. Dipolo-Dipolo Inducido: Cuando una molécula induce una desigualdad leve en la distribución de la carga de otra molécula.

3. Dipolo Inducido-Dipolo Inducido: son fluctuaciones de los dipolos de átomos o moléculas con sus vecinos quedan origen a atracciones en la red. Las fuerzas que resultan se llaman las fuerzas de London o de dispersión, y actúan siempre entre todos los átomos. Las fuerzas de Van der Waals decaen rápidamente con la distancia entre las moléculas, la energía de interacción es proporcional a r^{-6} .

Enlaces de Hidrógeno. Estos enlaces se forman entre un átomo de hidrógeno covalente limitado y un átomo electronegativo como el O ó N. Un enlace de hidrógeno es en cierto grado covalente, especialmente en el sentido que es dependiente de la dirección, puesto que una desviación pequeña de la orientación óptima da lugar a un debilitamiento apreciable del enlace. Un enlace de H es claramente más débil que un enlace covalente y será a menudo de breve duración. Por otra parte, los enlaces de hidrógeno son mucho más fuertes que las interacciones de van der Waals ^[12].

Las herramientas propuestas para calcular los valores de la energía de asociación son los métodos computacionales de tipo mecánica molecular y semi-empíricos.

Las cuatro aproximaciones más importantes para calcular las propiedades moleculares son: los métodos *ab initio*, los métodos semi-empíricos, el método del funcional de la densidad (DFT) y el método de mecánica molecular.

Los métodos mecanocuánticos moleculares semi-empíricos usan un hamiltoniano más simple que el hamiltoniano molecular correcto, y emplean parámetros cuyos valores se ajustan para concordar con los datos experimentales o con los resultados de cálculos *ab initio*. En contraste un cálculo *ab initio* (o de primeros principios) usa el hamiltoniano completo, y no emplea otros datos experimentales que no sean los valores de las constantes físicas fundamentales. El método del funcional de la densidad no intenta calcular la función de onda molecular, sino que calcula la densidad de probabilidad electrónica molecular, ρ , y calcula la energía electrónica molecular a partir de ρ . El método de la mecánica molecular no es un método mecanocuántico, y no usa un operador hamiltoniano o función de onda molecular. En lugar de eso visualiza la molécula como un conjunto de átomos que se mantienen unidos por resortes (enlaces), y expresa la energía molecular en términos de constantes de fuerzas para la flexión y tensión del resorte, y otros parámetros ^[10, 13-14].

A continuación se da una breve reseña de cada uno de ellos.

2.3. Mecánica molecular

El método de mecánica molecular (MM) fue desarrollado por Westheimer, Hendrickson, Wiberg, Allinger, Warshel y otros ^[13], y es aplicable a estados electrónicos fundamentales. El método usa un modelo de una molécula compuesta por masas puntuales que se mantienen unidas por resortes. Usando parámetros tales como constantes de fuerza de tensión de enlace, de flexión de enlace, y permitiendo interacciones entre los átomos no enlazados, el método construye una expresión de la energía potencial que es función de las posiciones atómicas. El método MM predice geometrías de equilibrio y energías relativas. La mecánica molecular se ocupa de los cambios en la energía de la molécula debidos

al estiramiento del enlace (V_{ten}), flexión del ángulo de enlace (V_{flex}), flexión fuera del plano (V_{ffp}), rotación interna (torsión) en torno a los enlaces (V_{tor}), interacciones entre estos movimientos (que producen un término cruzado, (V_{cruc}), atracciones y repulsiones de Van der Waals entre átomos no ligados (V_{vdW}) e interacciones electrostáticas entre átomos (V_{el}) (Ecuación 3). La mayoría de las aplicaciones han sido a compuestos orgánicos, organometálicos y compuestos de coordinación de metales de transición. Debido a que los cálculos MM son mucho más rápidos que los cálculos mecanocuánticos, se pueden tratar sistemas con 1000 átomos [10, 13, 15].

$$V = V_{\text{ten}} + V_{\text{flex}} + V_{\text{ffp}} + V_{\text{tor}} + V_{\text{cruc}} + V_{\text{vdW}} + V_{\text{el}} \quad (3)$$

2.4. Método PM3 (método Paramétrico 3)

Los parámetros para el modelo PM3 fueron obtenidos usando el procedimiento de parametrización automática ideado por J J P Stewart. PM3 es un método semi-empírico, es además basado en el método MNDO (el nombre se deriva del hecho que es la tercera parametrización de MNDO, AM1 es considerada la segunda). Los métodos semi-empíricos consideran explícitamente solamente a los electrones de valencia y en la solución de Schrödinger se sustituyen algunas integrales por resultados empíricos. El Hamiltoniano de PM3 contiene esencialmente parámetros que fueron obtenidos aplicando conocimiento químico e intuición. PM3 predice varias propiedades termodinámicas y estructurales. Algunos problemas se presentan con PM3. Uno de los más importantes de éstos es la barrera rotacional del enlace amida, que es demasiado baja y en algunos casos casi no existente. Este problema puede ser arreglado con el uso de un potencial de torsión empírico. Todavía hay consideraciones sobre el debate de los meritos relativos del aprovechamiento de AM1 y PM3 para parametrización [25]. Se ha parametrizado para H, C, Si, Ge, Sn, Pb, N, P, As, Sb, Bi, O, S, Se, Te, F, Cl, Br, I, Al, Ga, In, Tl, Be, Mg, Zn, Cd y Hg [10, 13, 15].

2.8. Dinámica molecular

La dinámica molecular (DM), es un modelo computacional que nos permite explorar las estructuras moleculares promedio y sus evoluciones en el tiempo, en función de las distintas condiciones físicas y químicas del medio. La DM simula los movimientos moleculares para visualizarlos en tiempo real con base en la integración de las ecuaciones de Newton. La inclusión de la variable tiempo en el análisis de la estructura molecular proporciona una increíble cantidad de detalles, aun cuando el tiempo asumido en el estudio sea pequeñísimo. Los períodos de tiempo estudiados son del orden de varias decenas de picosegundos (ps, 10-12 s), si bien se generan estructuras cada femtosegundo (fs, 10⁻¹⁵ s). Es importante resaltar que este modelo nos proporciona estructuras promediadas en el tiempo de simulación. ^[16] El resultado es una trayectoria que especifica cómo la posición y la velocidad de la partícula en el sistema varían con el tiempo. Las leyes de Newton de movimiento pueden ser descritas como:

1. Un cuerpo continúa moviéndose en una línea recta a velocidad constante a menos que una fuerza actúe sobre él.
2. La fuerza iguala el índice del cambio del momento.
3. A cada acción hay una reacción igual y opuesta.

La trayectoria es obtenida solucionando las ecuaciones diferenciales incorporadas a la segunda ley del newton ($F = ma$):

$$\frac{d^2x_i}{dt^2} = \frac{F_{x_i}}{m_i} \quad (4)$$

Esta ecuación describe el movimiento de una partícula de masa m_i a lo largo de una coordenada (x_i) con F_{x_i} la fuerza de la partícula en esa dirección ^[10, 16].

2.6. Reconocimiento Molecular

El reconocimiento molecular (*docking*) es una metodología de gran utilidad en bioquímica. Puesto que permite un reconocimiento altamente específico de las

enzimas y sus substratos, los receptores de la proteína y la señal que inducen los ligandos, o los antígenos y sus anticuerpos en sistemas biológicos.

Los algoritmos de *docking* pueden generar una gran cantidad de estructuras posibles, así que también requieren medios para guardar cada estructura para identificar las de mayor interés. Éste procura predecir la estructura (o las estructuras) de los complejos intermoleculares formados entre dos o más moléculas. *Docking* es ampliamente utilizado para sugerir modos enlazantes de los inhibidores de la proteína (Figura 3). [10, 17, 18].

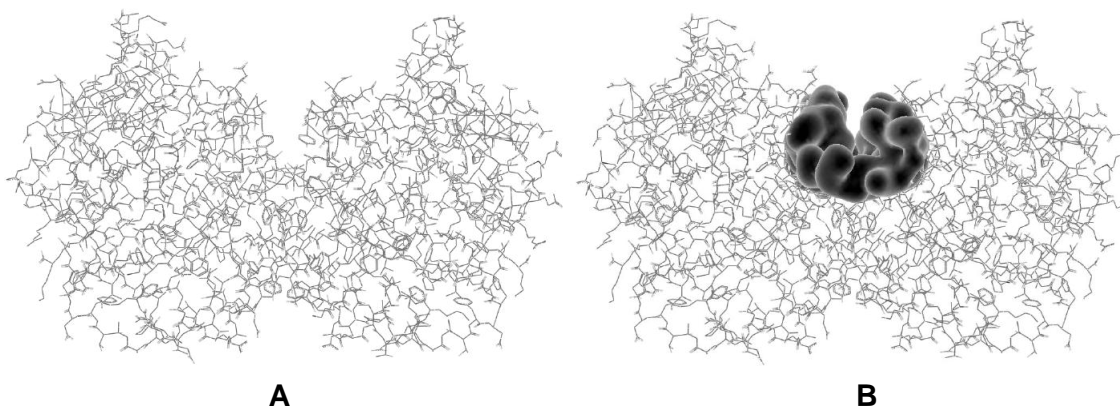


Figura 3. A. Estructura tridimensional de la triosafofosfato isomerasa usada como blanco en *docking* **B.** Estructura tridimensional obtenida al permitir la difusión de hexano a través de cristales de la triosafofosfato isomerasa. La posición de las moléculas de hexano se muestra en color negro.

2.7. Modelación de los efectos de solvente

La mayoría de las representaciones teóricas de moléculas y sus procesos asociados se limitan a cálculos en fase gaseosa, por lo que no representan fielmente la realidad, de ahí la importancia de ejecutar cálculos donde se modelen efectos del ambiente molecular, como los de solvente.

Los métodos más utilizados dentro de los enfoques clásicos y cuánticos para considerar los efectos del solvente son las simulaciones de Monte Carlo y de Dinámica Molecular. Sin embargo, éstos no tienen en cuenta ciertas propiedades colectivas, que sólo pueden explicarse por Mecánica Cuántica. Una alternativa

aproximada es considerar los efectos de campos externos sobre el "soluto" en diferentes formas, Montero et al. [8, 9]

2.7.1. La aproximación de la Hipersuperficie de Múltiples Mínimos.

Los procedimientos de la aproximación de la Hipersuperficie de Múltiples Mínimos (MMH), son de gran utilidad en el estudio de los efectos colectivos del ambiente molecular. Esta aproximación combina los procedimientos mecánico cuánticos para el cálculo de las energías con la termodinámica estadística para la determinación de las propiedades fisicoquímicas como la energía de asociación (E_{ass}), entropía (S), función de partición absoluta, función de partición relativa y energía libre de Helmholtz (F).

Para esto seguimos los siguientes pasos:

- Se dibuja la molécula en estudio mediante una interfaz gráfica y se optimiza a través del método semi-empíricos PM3 del paquete MOPAC versión 6.0.
- Se crea un número conveniente de distribuciones aleatorias de moléculas de solvente en torno a la molécula central optimizada. Este objetivo se logra con el programa GRANADA.
- Las distribuciones obtenidas por GRANADA se optimizan con el método PM3 de MOPAC. Con el objetivo de obtener una serie de distribuciones de mínima energía para el sistema molécula-solvente.
- Las energías y las geometrías de todas las distribuciones calculadas anteriormente, se utilizan como archivos de entrada para el programa de cálculo estadístico Q3 con el objetivo de tener las propiedades termodinámicas. [8, 9]

2.7.2. GRANADA - Distribución aleatoria de moléculas alrededor de un sistema poliatómico central

GRANADA es un método desarrollado por Montero et al, el cual genera distribuciones donde las moléculas medioambientales están en los alrededores o en las cavidades de la molécula central de forma aleatoria. GRANADA crea un

cubo en el cual van a colocar a interaccionar las moléculas del medio con la molécula central, el criterio de selección es que la distancia entre las moléculas implicadas no sea igual a el radio de Van der Waals, para que no se genere enlace, no utiliza ningún potencial que pueda alterar la distribución perfectamente aleatoria de las moléculas. Este es un programa ejecutable de MS-DOS que está diseñado para leer archivos de coordenadas cartesianas o internas que contienen datos atómicos de las moléculas, con el fin de generar celdas Los archivos que produce pueden ser en coordenadas cartesianas o internas MOPAC, para el manejo del programa específicamente ver Anexo 1 [6].

2.7.3. Termodinámica estadística

La termodinámica estadística se basa en el principio de que los observables termodinámicos son promedios de las propiedades moleculares y se centra en el cálculo de estos promedios [19].

Algunos métodos computacionales no producen información termodinámica directa. Sin embargo, con base en la función molecular de partición es posible calcular los valores de entropía molar estándar (S^0), capacidad calorífica (C_p^0), y cambios de entalpía [$H^0(T)-H^0(0)$], como funciones de la temperatura [20].

En términos estadísticos, la energía interna de las moléculas puede ser expresada, así:

$$E = RT^2 \left(\frac{\partial \ln q}{\partial T} \right)_V = RT^2 \frac{q'}{q} \quad (5)$$

Donde q es la función de partición molecular, es decir, la sumatoria estadística de estados correspondientes al conjunto dado

$$q = \sum_i g_i e^{-E_i/RT} \quad (6)$$

La sumatoria se extiende sobre todos los niveles de energía. Sin embargo, para las temperaturas muy altas en las cuales la molécula llega a ser inestable, el grado de la suma puede ser ambiguo [3, 20].

Como consecuencia de este análisis se necesita el uso de un procedimiento de procesamiento estadístico. El programa Q3, que considera el cálculo de las funciones termodinámicas de asociación de todas las celdas generadas por GRANADA, fueran o no degeneradas. Posteriormente elimina todas las celdas con valores iguales o muy similares de energía, además toma todas aquellas celdas con energías muy similares y las compara desde el punto de vista geométrico, eliminando las que presenten misma energía y semejante arreglo. De este modo lleva a cabo el procesamiento estadístico con aquellos arreglos moleculares que contribuyen a la descripción del estado del sistema. Así, evitamos considerar celdas que no contribuyen a la función de partición y a su vez no eliminamos aquellas que, aunque tengan la misma energía, son realmente diferentes ^[5].

2.7.4. Q3 - Evaluación estadística de la distribución de moléculas alrededor de un sistema poliatómico central en las hipersuperficies de múltiples mínimos

Q3 es un método desarrollado por Montero et al, el cual consiste en calcular las propiedades termodinámicas como la energía de asociación (E_{ass}), entropía (S), función de partición absoluta, función de partición relativa y energía libre de Helmholtz (F), con base en la distribución de las energías obtenidas por GRANADA. Este es un programa ejecutable de MS-DOS que está diseñado para leer archivos denominados *input.q* que contienen las energías de las celdas generadas (una en cada línea) después de la optimización por MOPAC, y las del sistema de referencia, así como la indicación de cuál fichero contiene la información espacial para las comparaciones entre estructuras con posibilidades de ser redundantes, según los índices de Tanimoto, para el manejo del programa específicamente ver Anexo 2 ^[7].

Las herramientas propuestas para el estudio experimental es la técnica de SPME utilizando Cromatografía de gases para el análisis de los terpenos. A continuación se da una breve descripción teórica de las técnicas.

2.8. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases (GC) es un método dinámico de separación y detección de compuestos orgánicos en mezclas. Los componentes principales de un GC incluyen: (1) suministro de gases; (2) puerto de inyección; (3) columna analítica; (4) detector y (5) sistema de adquisición de datos compuesto por una interfase, un PC y el software. GC involucra el reparto de solutos gaseosos entre la fase móvil y una fase estacionaria líquida o sólida, donde la separación sucede principalmente debido a las diferencias en la solubilidad o adsorción de los componentes de la muestra en la fase estacionaria. La distribución en el equilibrio está controlada por la presión de vapor de los componentes y su absorción en la fase estacionaria líquida. Es una técnica multiuso, que se emplea en las industrias ambiental, farmacéutica, de productos naturales, petroquímica, así como para monitorear procesos químicos y para el análisis en química clínica, forense, de alimentos, y otros. ^[21-26].

2.8.1 Sistemas de detección

El detector es un dispositivo que localiza, en dimensiones de espacio y tiempo, la posición de los componentes de una mezcla, después que éstos han sufrido un proceso cromatográfico y, permite apreciar la naturaleza de la separación que ha sido obtenida. La función básica de un detector en GC es responder a la presencia de cantidades muy pequeñas de vapor de un analito en un gas permanente; los detectores pueden clasificarse como universales, selectivos o específicos. La selectividad es la capacidad del detector para reconocer y responder a los componentes de interés pero es importante resaltar que no todos los detectores responden a todos los compuestos. La sensibilidad, formalmente, se define como el cambio en la respuesta con el cambio en la cantidad detectada ^[22, 23, 27].

2.8.1.1. Detector de ionización en llama

La respuesta del detector de ionización en llama (FID) resulta de la combustión de compuestos orgánicos en una pequeña llama (hidrógeno/aire) localizada en un mechero capilar, la cual genera especies eléctricamente cargadas o iones. Un electrodo colector cilíndrico se instala a pocos milímetros por encima de la llama y la corriente de los iones se mide al establecer un potencial entre la punta del mechero y el electrodo colector. La corriente es aproximadamente proporcional a la cantidad total de carbono e hidrógeno en el analito. La pequeña señal de corriente es amplificada por un electrómetro. El FID es un detector casi universal para compuestos orgánicos, excepto agua y gases permanentes, este es, sensible, estable, de fácil operación, volumen muerto bajo y amplio rango lineal de respuesta (hasta 10^7) [21, 23, 26, 28].

2.8.2. Ley de Henry

La aproximación más general al fenómeno de distribución es el tratamiento de la ley de partición como una extensión de la Ley de Henry. Para un gas en equilibrio con su solución en el mismo solvente, se tiene:

$$K = \frac{m}{p} \quad (7)$$

donde m es la masa del gas disuelto por unidad de volumen y p es la presión a temperatura constante. Puesto que la concentración de moléculas en la fase gaseosa es proporcional a la presión, p se puede reemplazar por C_1 y la masa/unidad de volumen de gas en solución, por C_2 . La Ecuación 7 se puede describir como:

$$K = \frac{C_2}{C_1} \quad (8)$$

En términos generales, la concentración de cualquier especie molecular individual entre dos fases, las cuales están en equilibrio, llevará una relación constante respecto una de la otra tan grande como el coeficiente de actividad permanezca relativamente constante. La limitación de la definición anterior es que se presume

que no hay ninguna interacción significativa soluto-soluto como tampoco ninguna interacción fuerte específica soluto-solvente [29].

2.8.3. K_D en cromatografía

Un soluto sometido a un proceso cromatográfico al entrar en la columna, inmediatamente se reparte entre la fase móvil y la fase estacionaria. Esta distribución entre las dos fases se refleja por su constante de distribución (K_D), definida como la relación de los pesos del analito en volúmenes iguales de las fases móvil y estacionaria (Ecuación 9):

$$K_D = \frac{C_S}{C_M} \quad (9)$$

donde C_S es la concentración del analito en la fase estacionaria y C_M es la concentración del analito en la fase móvil [21, 25, 30].

2.9. Micro-Extracción en Fase Sólida

Las técnicas más conocidas para la extracción de compuestos orgánicos de una muestra son los métodos *headspace* para concentración de volátiles, y extracción líquido-líquido y extracción por fluido supercrítico, para compuestos semi-volátiles o no volátiles. Estos métodos presentan varios inconvenientes, incluyendo alto costo y tiempos de preparación largos. La SPME no requiere solventes o aparatos complicados. Puede concentrar compuestos volátiles y semi-volátiles, en muestras líquidas o gaseosas, para análisis por GC, GC/MS, o HPLC.

La técnica de micro-extracción en fase sólida (SPME) consiste en exponer directamente a la muestra o a sus vapores en fibra de sílice fundida recubierta con un material adsorbente o absorbente; El transporte de analitos desde la matriz a un recubrimiento empieza tan pronto la fibra recubierta ha sido puesta en contacto con la muestra (Figura 4); típicamente, la exposición por SPME es considerada completa cuando la concentración del analito alcanza el equilibrio entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de la fibra. Cuando se alcanza el equilibrio, la cantidad extraída es constante dentro de los límites de error experimental y es

independiente de un incremento adicional de tiempo de extracción. Las condiciones de equilibrio pueden ser descritas como:

$$n = \frac{K_{fs} V_f V_s C_0}{K_{fs} V_f + V_s} \quad (10)$$

Donde n es la cantidad de analito extraído por el recubrimiento, K_{fs} es la constante de distribución del equilibrio fibra/muestra, V_f es el volumen de recubrimiento de la fibra, V_s es el volumen de la muestra y C_0 es la concentración inicial de un analito en la muestra.

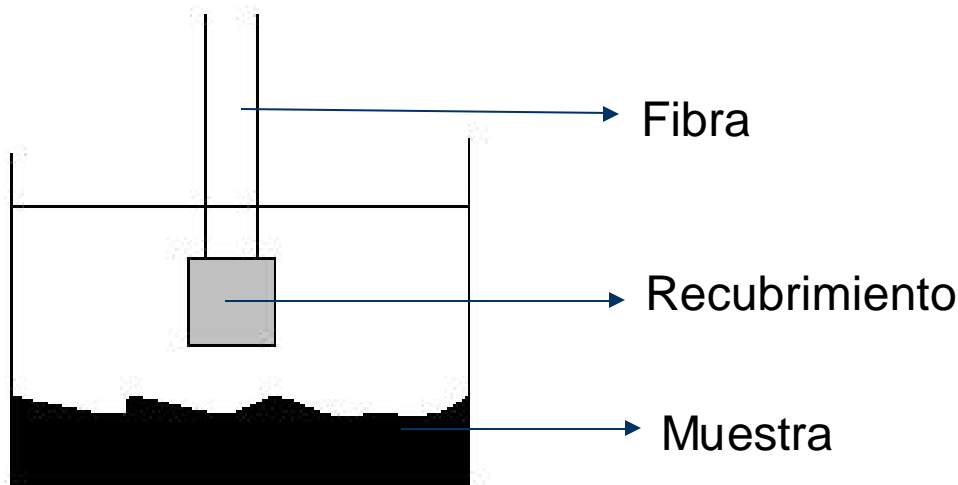


Figura 4. Gráfica montaje de Micro-Extracción en Fase Sólida.

La Ecuación 10 supone que la matriz puede ser representada como una fase homogénea sencilla y que no existe *headspace* en el sistema; puede ser modificada para la existencia de otros componentes en la matriz por consideración del volumen de la fase individual y la apropiada constante de distribución. Louch et al ^[31]. desarrollaron una teoría de equilibrio para recubrimientos que extraen analitos por absorción, ésta considera un sistema de dos fases (muestra y recubrimiento de la fibra), mientras Zhang y Pawliszyn ^[32] consideran un sistema de tres fases (muestras, *headspace* y recubrimiento de la fibra), para recubrimientos que extraen analitos por adsorción..

La extracción puede ser interrumpida y la fibra analizada. Para obtener datos reproducibles, sin embargo, hay que mantener constante las condiciones de

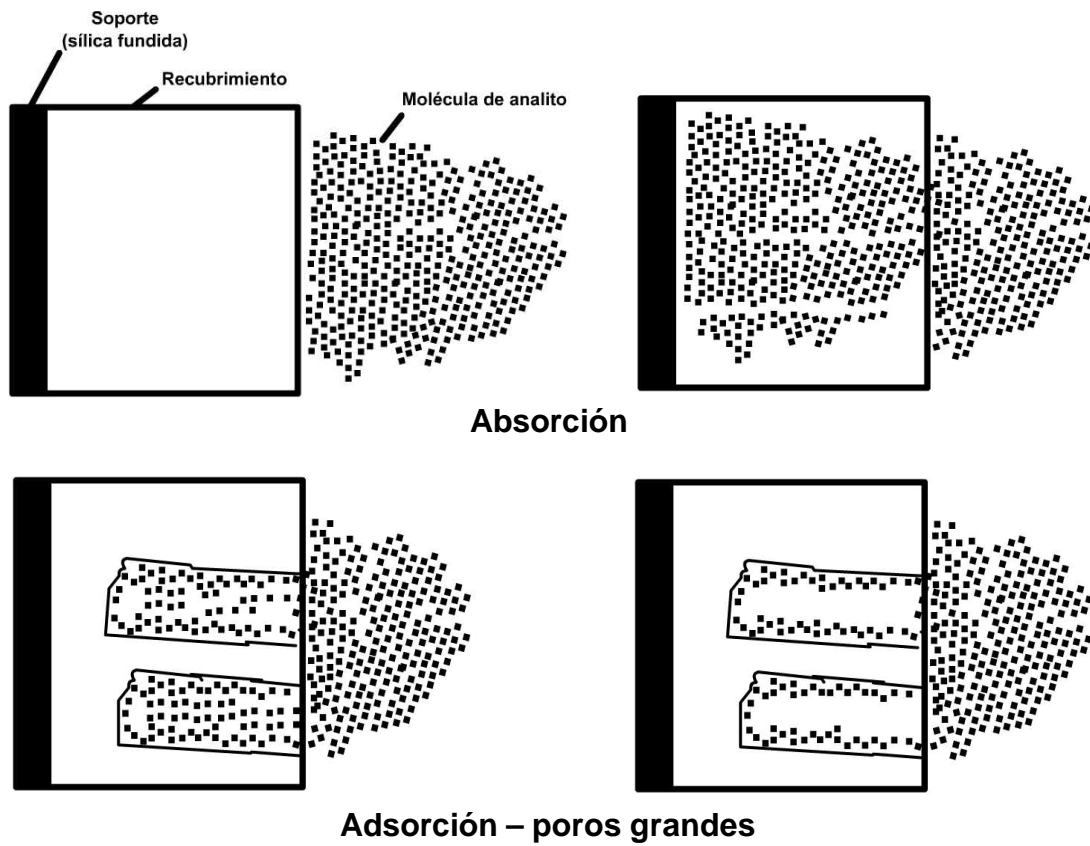
convección y el tiempo de extracción. La Ecuación 10 indica que hay una relación de proporcionalidad directa entre la concentración de la muestra y la cantidad de analito extraído, esta es la base de la cuantificación del analito^[1].

Existen dos tipos distintos de recubrimientos de SPME disponibles comercialmente. El más usado es poli(dimetilsiloxano) [PDMS], que es un recubrimiento líquido, elástico altamente viscoso. El PDMS extrae analitos por absorción. El poli(acrilato) [PA] es un recubrimiento sólido que actúa como líquido a temperaturas de desorción. Tanto PDMS como PA extraen analitos vía absorción. Los demás recubrimientos, incluyendo poli(dimetilsiloxano divinilbenzeno) [PDMS-DVB], carbowax DVB, carbowax TR (resina base-DVB con tamaño de poro uniforme) y carboxen, son recubrimientos mezclados, en los cuales la fase de extracción es un sólido poroso, extrayendo analitos vía adsorción. La Figura 5 ilustra el inicio y estado estable/equilibrio de los procesos de extracción tipo absorción y adsorción en recubrimientos de SPME. Independientemente de la naturaleza de un recubrimiento, las moléculas de analito inicialmente son adheridas a la superficie; si migran al volumen del recubrimiento o permanecen en esta superficie depende de la magnitud del coeficiente de difusión del analito en el recubrimiento. Los coeficientes de difusión de moléculas orgánicas en PDMS son similares a en los solventes orgánicos, por lo tanto la difusión en PDMS es relativamente rápida y estos recubrimientos extraen analitos vía absorción. Los coeficientes de difusión en poli(acrilato) son cerca de un orden de magnitud menores, pero siguen siendo suficientemente grandes para que la absorción sea el mecanismo de extracción primaria. Por otra parte, el coeficiente de difusión de moléculas orgánicas en el volumen de poli(divinilbenceno) y carboxen son tan pequeñas que dentro del lapso de tiempo del análisis de SPME, esencialmente todas las moléculas permanecen en la superficie del recubrimiento^[1].

Podrían las moléculas permanecer por un largo tiempo en la fibra (medirse en días o semanas en vez de horas), los analitos extraídos aún podrían estar difundidos

en el volumen del recubrimiento, esto podría manifestarse durante el análisis como *carry-over* (efecto memoria en la fibra), difícil de remover aún después de repetidas desorciones.

Interacciones intermoleculares débiles e interacciones hidrofóbicas cuando la muestra tiene agua, juegan el papel más importante en la extracción de analitos por los polímeros porosos de los recubrimientos de SPME disponibles comercialmente. El número de sitios activos donde la adsorción puede ser realizada es limitado. Cuando todos los sitios activos están ocupados, no pueden atraparse más analitos (a menos que éste pueda condensarse en los poros por el mecanismo de condensación capilar). Esto significa que la dependencia entre la concentración de los analitos en una muestra y la cantidad de los analitos extraídos de la muestra por los recubrimientos sólidos de SPME, no puede ser lineal sobre un amplio rango de concentraciones ^[1].





Adsorción – poros pequeños

Figura 5. Comparación del mecanismo de extracción absorción y adsorción.

Además, mientras la absorción es un proceso no competitivo, la adsorción es por definición competitiva, y una molécula con alta afinidad por la superficie puede reemplazar a una molécula con baja afinidad. De esta manera, la cantidad de analito extraído por la fibra desde una muestra puede ser afectada por la composición de la muestra.

La dependencia entre la concentración de equilibrio de un compuesto asociado con el sorbente y su concentración en la solución es comúnmente referido como isoterma de adsorción. Para estas isotermas se utiliza el modelo de Langmuir; la superficie tiene un número límite de sitios de adsorción que pueden ser ocupados por el sorbato. Las siguientes normas se aplican:

- 1) La molécula adsorbida se adsorbe en un estado inmóvil.
- 2) Todos los sitios son equivalentes.
- 3) Cada sitio puede mantener a lo máximo una molécula de adsorbato.
- 4) No hay interacciones entre moléculas de adsorbato en sitios adyacentes para que la constante de equilibrio sea independiente del alcance de las especies adsorbidas.

En equilibrio, la concentración superficial de A en mol cm⁻², [A_{ad}], es descrita por la Ecuación 11:

$$[A_{ad}] = [S_o] \frac{K_A [A]}{[A] K_A + 1} \quad (11)$$

Donde $[S_0]$ es la concentración total de los sitios activos en la superficie (máxima concentración en la superficie de analitos) en mol cm^{-2} , K_A es la constante de equilibrio de la adsorción y $[A]$ es la concentración de A en la matriz^[2].

En la Figura 1 se muestra el perfil temporal de la masa absorbida por el recubrimiento para diferentes constantes de distribución en la fase *headspace*/recubrimiento K_{hr} . Además de la constante de distribución la extracción depende de de la fase estacionaria, la naturaleza química del analito y la concentración del analito^[1].

EL polidimetilsiloxano es el recubrimiento por excelencia para los procesos de extracción en SPME y de separación en cromatografía ya que este es universal extrae tanto polares (mayor cantidad) como no polares (menor cantidad), a continuación una breve reseña de sus propiedades:

2.10. Poli(dimetilsiloxano)

El polidimetilsiloxano (PDMS) es un líquido viscoso claro con una densidad de 0.98 g/cm^3 a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. El peso molecular dado por el fabricante (Supelco) es de 65000 g/mol según determinación por viscosidad^[33].

Los polímeros de silicona tienen muchas características que los hacen muy útiles en aplicaciones en la ingeniería. Por ejemplo, por el alto grado de flexibilidad de su esqueleto polimérico, el PDMS tiene la temperatura de transición de cristal más baja que la de cualquier polímero conocido. Debido a su alto grado de estabilidad química, el PDMS es además funcional a relativamente altas temperaturas. Por esta razón, materiales basados en PDMS son ideales para aplicaciones tales como sellos elastoméricos, adhesivos, recubrimientos, y encapsulamiento. En estas aplicaciones el PDMS existe en el estado de volumen amorfo como un líquido o como una red entrecruzada. El PDMS, por otra parte, tiene una densidad relativamente baja y una difusividad de gases alta. Esto es primordialmente una

consecuencia de la longitud de los enlaces Si-O y Si-C y los amplios ángulos tetraédricos de los enlaces Si-O-Si ^[34, 35].

Los terpenos estudiados son característicos en los aceites esenciales de las plantas aromáticas, a continuación una breve reseña de estos:

2.11. Aceites Esenciales

Los aceites esenciales o esencias se pueden definir como una parte del metabolismo de un vegetal, compuesto generalmente por terpenoides, que están asociados o no a otros componentes, la mayoría de ellos volátiles, y generan en conjunto el olor de dicho vegetal ^[36].

2.11.1. Terpenoides

Se encuentran en la mayoría de los organismos, pero constituyen el grupo más abundante de los aceites vegetales. Estos compuestos, se forman a partir del isopreno. La clasificación de los terpenos según el número de unidades isoprénicas es la siguiente:

a) Monoterpenos: (dos isoprenos). Se encuentran aquí los aceites esenciales de muchas plantas, a las que dan su olor y sabor característicos: mentol, geraniol, limoneno, α -pineno, alcanfor y demás.

b) Diterpenos: (cuatro isoprenos). Es de destacar el fitol que forma parte de la clorofila y es precursor de la vitamina A. Las vitaminas A, E y K también son diterpenos.

c) Tetraterpenos: (ocho isoprenos). En este grupo son abundantes las xantofilas y carotenos, pigmentos vegetales amarillo y anaranjado respectivamente. Dan color a los frutos, raíces (zanahoria) flores y otros.

En la fotosíntesis desempeñan un papel clave absorbiendo energía luminosa de longitudes de onda distinta a las que capta la clorofila. El caroteno es precursor de la vitamina A.

d) Politerpenos: (muchos isoprenos) Es de destacar el caucho, obtenido del *Hevea brasiliensis*, que contiene varios miles de isoprenos. Se usa en la fabricación de objetos de goma ^[37].

Los análisis de datos por medio de la estadística multivariable, principalmente el análisis de componentes principales (PCA), el análisis de factores y el análisis de agrupamiento, se han convertido en una herramienta muy utilizada en las investigaciones químicas, debido a su alto poder predictivo, de clasificación y su capacidad de predecir resultados, los cuales no son accesibles por medio de la utilización de otros métodos.

2.12. Análisis de componentes principales.

El análisis de componentes principales (PCA) es uno de los métodos más comúnmente utilizados para proveer una descripción condensada y describir métodos de variación en conjuntos de datos con muchas variables.

El método PCA computa los componentes principales, y una amplia gama de la estadística asociada. Este método se diseñó para solucionar problemas de muchas variables. Dos tipos de análisis están disponibles, dependiendo sobre si los datos necesitan ser estandarizados o ser centrados. En el caso anterior el análisis se realiza vía matriz de correlación, mientras que en el último el análisis se realiza vía matriz de covarianza. El método básico, sin embargo, consiste en diagonalizar la matriz simétrica: correlación o covarianza. La característica especial de este método son los gráficos que proporcionan una ayuda visual para la clasificación de variables y de casos.

El método PCA produce resultados en dos formas: hojas de cálculo y gráficos. Mientras que las hojas de cálculo se pueden utilizar para interpretar los resultados, los gráficos proporcionan la ayuda visual para la clasificación de variables y de casos.

El método PCA produce una amplia gama de resultados, tales como coordenadas del factor de variables y casos, contribuciones de variables y casos, valores del factor, coeficientes del valor del factor, coseno-cuadrados, valores propios, y estadística descriptiva.

El propósito principal en el PCA es buscar un espacio vectorial de una dimensión más baja que de los puntos originales (las variables o los casos) para que puedan ser proyectados, de modo que la estructura fundamental de los datos pudiera ser detectada. Para facilitar esto, los diagramas en 2D de las coordenadas del factor son de gran ayuda. Esta opción está disponible para ambos: las variables y los casos ^[38-40].

La correlación es una medida de la relación entre dos o más variables. Los coeficientes de correlación pueden extenderse a partir de -1.00 a +1.00. El valor de -1.00 representa una correlación negativa perfecta mientras que un valor de +1.00 representa una correlación positiva perfecta. Un valor de 0.00 representa una carencia de correlación.

Los datos se recogen a menudo en variables que no se correlacionan, pero también son grandes en número. Esto hace la interpretación de los datos y la detección de su estructura difícil. Pero transformando las variables originales a un número más pequeño de variables sin correlación, hace el análisis más sencillo, el método PCA hace estos dos trabajos más fáciles. Los componentes principales y el análisis de la clasificación (PCA) puesto en ejecución alcanzan dos objetivos:

1. Reducción en el número de variables a un número más pequeño de, variables “representativas” y “sin correlación”.
2. Clasificación de variables y casos.

La técnica que puede lograr estos objetivos creando un nuevo sistema de ejes, llamado eje factor, es obtenido en un espacio dimensional más bajo sobre el cual el espacio original de variables pueda ser proyectado.

Para ser específico, para los datos recogidos en las p variables para los N casos, PCA realiza análisis en el espacio de N dimensiones definido por las p variables y el espacio p -dimensional definido por los N casos. Matemáticamente, el cómputo de factores en PCA consiste básicamente en diagonalizar una matriz simétrica: matriz de correlación o matriz de covarianza, dependiendo sobre si los datos necesitan ser estandarizados o centrados sobre los valores promedios. En ambos casos, el resultado es un nuevo sistema de variables (componentes principales) que son combinaciones lineales de las variables originales y son sin correlación. Las nuevas variables generadas así son más pequeñas en número, pero explican la variación inherente de los datos al grado posible máximo. De esta manera, se genera un nuevo espacio (espacio del factor) sobre el cual los casos y las variables se pueden proyectar y clasificar en categorías ^[38-40].

PCA vía matriz de covarianza o matriz de correlación. El método PCA proporciona opciones para computar los componentes principales vía la matriz de correlación o la matriz de covarianza. Al analizar la matriz de la covarianza, el análisis, y los factores computados de ella, serán afectados por las diferencias en la cantidad de variabilidad en las variables activas. Por lo tanto, un análisis basado en la matriz de la covarianza será apropiado solamente si la detección de tales diferencias tiene importancia al tipo de estudio que se está realizando. En la mayoría de las situaciones, sin embargo, estas diferencias no son de interés simplemente porque éstas son debido a las diferencias en las unidades de medida. Por ejemplo, dos diversas medidas de la temperatura, grados centígrados y Fahrenheit, se podían utilizar para las medidas en dos variables. Obviamente,

sacar una diferencia para este análisis sería una pérdida de esfuerzo. El requisito en este caso es la transformación de los datos para quitar el efecto del escalamiento. PCA calcula los componentes principales para recuperar la mayoría de la variabilidad con el primer factor, el segundo la mayoría a través de un segundo factor, y así sucesivamente. Esto significa que si las variables implicadas fueran heterogéneas con respecto a sus variaciones, ejemplo, primero los factores más importantes reflejarían sobre todo la variabilidad más grande en algunas de las variables. El análisis, por lo tanto, no se puede realizar vía la matriz de correlación, si no a través de la matriz de covarianza de las variables estandarizadas (escaladas) ^[38-40].

2.12.1. Gráficas de PCA

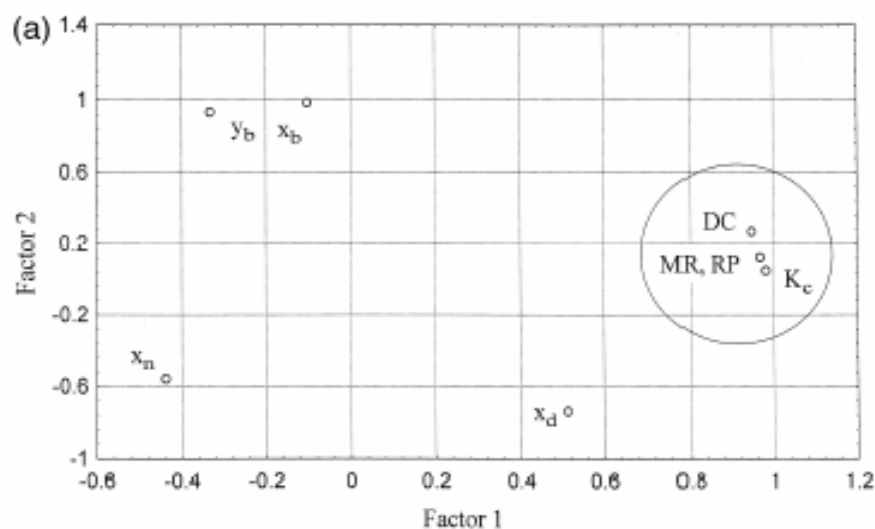
Además de reducir las dimensiones del espacio original de variables, los componentes principales y el análisis de clasificación (PCA) se pueden también utilizar como técnica de clasificación, de modo que las relaciones entre variables y casos puedan ser culminantes. Para hacer esto, las variables y los casos se grafican en el espacio generado por ejes factor. Sin embargo, las relaciones entre las variables y los casos no se pueden considerar fácilmente en el espacio del factor, si su dimensión es mayor de dos. En este caso, para tener una grafica más clara, las proyecciones de los puntos (las variables o los casos) se deben estudiar en los espacios de factores de dos dimensiones (planos del factor), formados por pares de ejes elegidos del conjunto de ejes factor ^[38-40].

Gráfica de dispersión de puntos 2D

Los puntos de datos individuales son representados por puntos marcados en un espacio de dos dimensiones, donde los ejes representan las variables. Las dos coordenadas (X y Y) que determinan la localización de cada punto correspondiéndolo un valor específico en las dos variables. Si las dos variables son fuertemente relacionadas, entonces los puntos de datos forman una pareja sistemática (ejemplo, una línea recta o una curva clara) ^[38-40].

La gráfica de dispersión de puntos se utiliza típicamente para explorar o para identificar la naturaleza de relaciones entre dos variables, porque pueden proporcionar mucho más información que un coeficiente de correlación. Por ejemplo, Un PCA como evaluador de indicador de polaridad y fases estacionarias en cromatografía gas-líquida. En este podemos apreciar la gráfica (Figura 6) representada por los dos primeros PC derivados de un conjunto de datos de 8 variables (indicadores de polaridad) para 30 fases estacionarias.

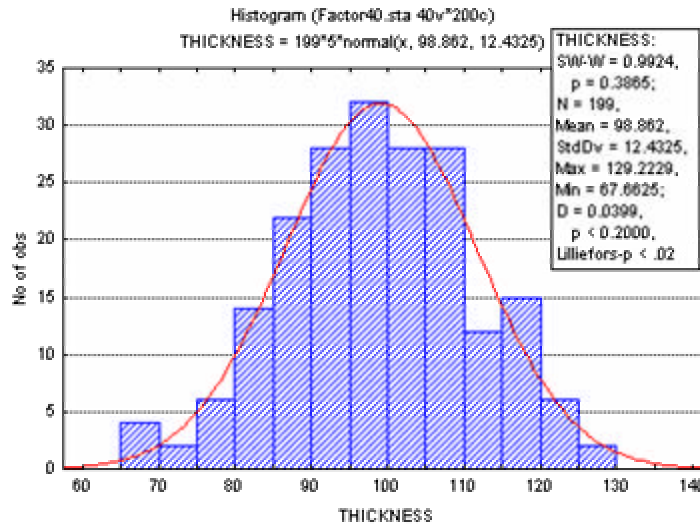
Figura 6. Gráfica de PCA en 2D, de los factor 1 y factor 2.



Algunas de las variables incluidas fueron polaridad de McReynolds (MR), Coeficientes de Kovàts (K_C), Polaridad retenida (RP) x_b , x_n y x_d para butanol, nitropropano y dioxano, respectivamente y valores de Castello's ΔC (o DC) $y_b = x_b/(x_b+x_d)$. El primer componente principal explica el 54%, el segundo el 35% y el tercero el 10% de la varianza total. En este ejemplo es posible intentar darle algún significado químico al: factor 1, polaridad, Kovàts, en el factor 2, la habilidad de donar y aceptar hidrógenos y en el factor 3, interacciones dipolo, sin embargo, siempre debe tenerse en cuenta que los componentes principales son construcciones matemáticas, los cuales no poseen necesariamente significado físico [38-41].

2.13. Histogramas

Los histogramas en dos dimensiones, presentan una representación gráfica de la distribución de frecuencia de las variable(s) seleccionada en la cual la columna se dibujan sobre el intervalo clase y la altura de la columna es proporcional a la frecuencia de la clase.



Se utilizan para examinar distribuciones de frecuencia de valores de variables. Por ejemplo, la gráfica de distribución de frecuencia muestra cual valor específico o rango de valores de la variable examinada son los más frecuentes, cómo diferenciar los valores, si la mayoría de las observaciones están concentradas alrededor del promedio, si la distribución es simétrica o sesgada, si es multimodal (es decir, tiene dos o más picos) o unimodal. Los histogramas también permiten evaluar la semejanza de una distribución observada a las distribuciones teóricas o previstas.

Hay dos razones importantes por las que las distribuciones de frecuencia sean de interés:

- Uno puede aprender de la forma de la distribución sobre la naturaleza de la variable examinada (e.g., una distribución bimodal puede sugerir que la muestra

no sea homogénea, y consista de observaciones que pertenecen a dos poblaciones que sean más-o-menos distribuidas normalmente).

- Mucha estadística se basa en aproximaciones sobre las distribuciones de variables analizadas; los histogramas ayudan a uno para probar si esas aproximaciones están resueltas ^[38-40].

3. METODOLOGÍA

3.1. PARTE TEÓRICA

Se plantearon tres metodologías para buscar una mejor aproximación al cálculo de la energía de asociación. Las metodologías propuestas son: la aproximación de la hipersuperficie de múltiples mínimos (MMH) desarrollada por Montero et al. 1995 ^[3-9], teniendo en cuenta el efecto de solvatación del terpeno y n moléculas de dimetildimetoxisilano. Una segunda metodología es la interacción de un segmento de PDMS (10 monómeros de dimetilsiloxano) con el terpeno. Por último la interacción de un ovillo de PDMS (3 hebras de 10 unidades de dimetilsiloxano) con el terpeno.

Las hipótesis de solución se desarrolló por medio de tres enfoques paralelos para el estudio de las energías de asociación de los terpenos y el PDMS. Se tubo en cuenta que el PDMS es un líquido amorfo y el terpeno se difunde en él, es decir, que alrededor del terpeno solamente se encuentran cadenas largas con metilos, oxígenos y silicios.

Como primera hipótesis se creó una esfera de solvatación alrededor del terpeno. Para ello se coloca monómeros alrededor del terpeno. Cada unidad repetitiva de PDMS estuvo representada por el dimetildimetoxisilano (DDS) (Figura 7). Esta aproximación es la base para el desarrollo de la primera metodología - MMH.

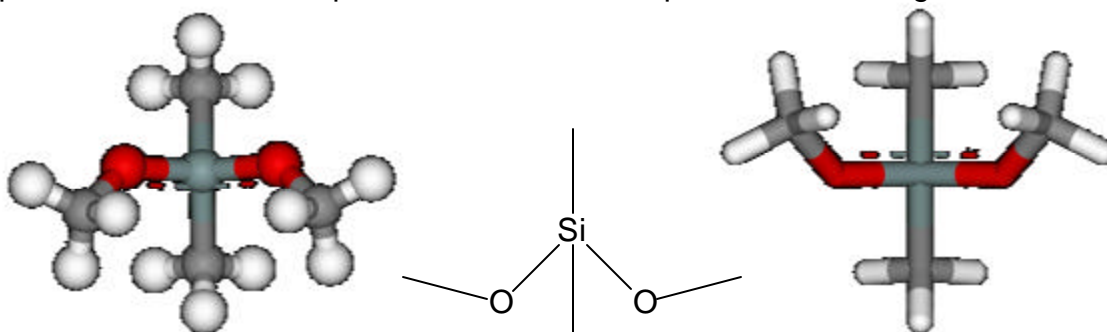


Figura 7. Dimetildimetoxisilano (DDS), fórmula $C_4H_{12}O_2Si$, peso molecular 120,22, CAS 1112-39-6.

Un segundo enfoque fue el estudio de la asociación de una molécula de terpeno con un oligómero de PDMS. Este es un segmento de 10 monómeros de dimetilsiloxano (Figura 8). Esta aproximación es la base para el desarrollo de la segunda metodología - Hebra.



Figura 8. Hebra, un oligómero de PDMS.

Como tercera aproximación, se estudió la asociación del terpeno con un ovillo de PDMS, compuesto por tres cadenas de poli(dimetilsiloxano). Las cadenas tienen aproximadamente tres veces el tamaño del terpeno, formando un ovillo donde se pueda ubicar el terpeno en el PDMS, representado por tres segmentos de 10 monómeros de dimetilsiloxano (Figura 9).

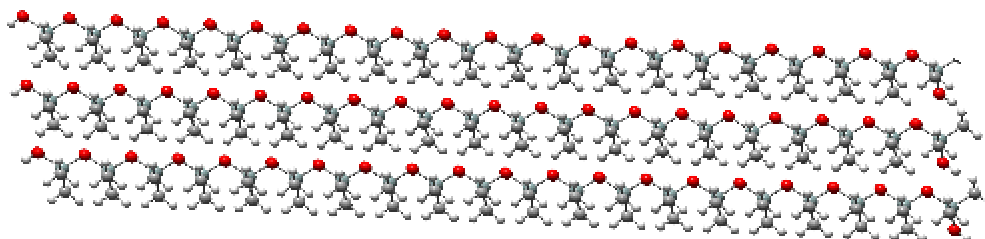


Figura 9. Ovillo, tres fragmentos de PDMS.

3.1.1. Optimización de la geometría de las moléculas individuales

Se seleccionaron 10 terpenos de diferente naturaleza química (monoterpenos, terpenos oxigenados y sesquiterpenos) y el dimetildimetoxisilano (para la primera metodología). Las estructuras de las moléculas fueron “dibujadas” empleando el programa hyperchem 7.5, usando el método PM3, en modo de optimización de geometría, con carga 0 y multiplicidad de spin 1, y utilizando el algoritmo de Fletcher-Reeves (gradiente conjugado) se obtuvo una geometría estable de las moléculas, para la primera metodología – MMH. Estas se optimizaron con el programa MOPAC con el método PM3 EF PRECISE XYZ NOINTER NOLOG

T=10D MMOK. Para la segunda y tercera metodologías se utilizó el método MM+, en modo electrostatic: bond dipoles, cutoffs: none, utilizando el algoritmo de Fletcher-Reeves (gradiente conjugado)

La hebra y las 3 hebras fueron sometidas a dinámica molecular para simular su comportamiento real ya que este método introduce las variables tiempo y temperatura; esto se realizó en Hyperchem 7.5, bajo las condiciones del método mecánica molecular. Además, usando 4 ps de tiempo de calentamiento, 10 ps de tiempo de corrida y 4 ps de tiempo de enfriamiento, con una rampa de temperatura de 0 al inicio, 300 en la corrida y 0 al finalizar. Previamente se optimizaron las estructuras del dimetildimetoxisilano, una hebra de 10 fragmentos de dimetilsiloxano y 3 hebras de 10 fragmentos de dimetilsiloxano. Se utilizó hyperchem 7.5, con el método PM3, en modo de optimización de geometría, con carga 0 y multiplicidad de spin 1, y el algoritmo de Fletcher-Reeves (gradiente conjugado) para obtener la configuración más probable para las moléculas.

3.1.2. Primera metodología - MMH

Se consideró un conjunto compuesto por m agregados (clusters). Cada agregado constó de una molécula de terpeno y n moléculas de dimetildimetoxisilano. Para determinar el mejor n (cantidad de moléculas de dimetildimetoxisilano), se calcularon series de diferentes agregados cambiando el número de moléculas de dimetildimetoxisilano en cada uno. La cantidad de las n moléculas va aumentando secuencialmente hasta encontrar un mínimo valor de E^{asoc}/mol de solvente. Esto se realizó para un terpeno apolar y un terpeno oxigenado. El programa que genera estos arreglos aleatorios es GRANADA. Los datos obtenidos fueron transferidos a MOPAC para su respectiva minimización, utilizando los mismos parámetros usados para las moléculas individuales. Los cálculos de termodinámica estadística se realizaron utilizando el programa Q3.

Se creó un número conveniente de distribuciones aleatorias de moléculas de solvente en torno a la molécula central optimizada. Este objetivo se logró con el

programa GRANADA; las moléculas estuvieron representadas en archivos con extensión .car, la cual consta de la matriz XYZ de las moléculas y los números atómicos que las componen. Se crea un archivo de entrada llamado input el cual contiene los parámetros del cálculo, (n,5.0,50,1,1), siendo n el número de moléculas colocadas alrededor del terpeno, 5.0 el tamaño de la caja en Å, 50 el número de agregados a obtener, 1 el número de tipo de moléculas de solvente presentes, 1 la fracción molar de las diferentes moléculas de solvente. Una vez obtenidas las distribuciones se calculan las energías con el programa MOPAC con el método PM3 EF PRECISE XYZ NOINTER NOLOG T=10D MMOK. Así se obtuvo una serie de distribuciones de mínima energía para cada sistema. Seguidamente, se ejecutó el programa de cálculo estadístico Q3 que utiliza como ficheros de entrada la energía de todas las distribuciones calculadas y las geometrías de cada molécula y sus solventes debidamente optimizadas. Los parámetros fueron (Eref,1,298.15,0.0001,0.001,*.rsm), Eref la energía de referencia (suma de las energías de los reactivos individuales), 1 implícito, 298.15 la temperatura (en K) a la que se hicieron los cálculos termodinámicos, 0.0001 es la energía de convergencia de las entalpías molares (en eV), 0.001 es el nivel de discriminación para el coeficiente de semejanza de Tanimoto y el nombre del fichero del tipo *.rsm que debe estar en el subdirectorio de corrida. Por último, se realizó el procesamiento de los resultados.

3.1.3. Segunda metodología - Hebra

Para esta parte se trabajó con una metodología parecida a la anterior sólo que ahora se utilizó *docking*, un método creado para estudiar interacciones de proteínas y moléculas en general, buscando encontrar sitios donde las moléculas puedan interactuar con la proteína. La variante es que en vez de utilizar una proteína se usa un oligómero de PDMS, obteniendo así los agregados para su posterior análisis. Esto se realizó con el programa Hex 4.2. usando la siguiente programación, search mode: full rotation, correlation type: shape only, radial filter: None, post processing: None, receptor range: 180, simples: 492, ligand range:

180, simples: 642, twist range: 360 samples: 128, distance range: 30, step size: 0.75, grid dimension: 0.6, steric scan: 16, final search: 25, soln: 0. Después de obtener los agregados, estos fueron procesados con el programa Swiss-PdbViewer para cambiarlos de formato ya que las salidas de Hex 4.2 no son compatibles con Hyperchem 7.5. Para reducir el tiempo de conversión se creó un script (ver Anexo 3) el cual monta la molécula y la guarda con la nueva extensión. Una vez obtenidos los agregados compatibles con hyperchem 7.5 fueron programados para su minimización, utilizando los siguientes parámetros el método MM+, en modo electrostatic: bond dipoles, cutoffs: none, utilizando el algoritmo de Fletcher-Reeves (gradiente conjugado). Para realizar esto se creó un script (ver Anexo 3) el cual monta todas las moléculas, las optimiza y almacena los resultados. Los cálculos de termodinámica estadística se realizaron utilizando el programa Q3 con los mismos parámetros de la primera metodología. Por último, se realiza el procesamiento de los resultados.

3.1.4. Tercera metodología - Ovillo

En esta parte se incluyen más átomos en el modelo del PDMS, y por tanto, los cálculos son más complejos. Por eso se utiliza un método que permite procesar una mayor cantidad de átomos (1000 átomos) como es la mecánica molecular. Este método es muy usado para proteínas y macromoléculas en general. La metodología fue utilizar DOCKING (Hex 4.2) para obtener los clusters, seguido de la minimización en Hyperchem 7.5, usando los mismos scripts creados para la segunda metodología. Los cálculos de termodinámica estadística se realizaron utilizando el programa Q3 (utilizando los mismos parámetros descritos en la primera metodología). Por último, se realizó el procesamiento de los resultados.

3.2. PARTE EXPERIMENTAL

3.2.1. Micro-Extracción en Fase Sólida en el modo *headspace*

Para determinar las mejores condiciones de extracción para SPME de los compuestos volátiles presentes en los patrones se empleó un recubrimiento, patrones certificados de monoterpenos, terpenos oxigenados y sesquiterpenos y se llevó a cabo análisis por HRGC/FID.

3.2.1.1. Recubrimiento empleado

El dispositivo de SPME se adquirió de Supelco, Inc. (Bellefonte, PA, EE.UU.) y se utilizó el recubrimiento para la fibra de PDMS de 100 μm . La variable evaluada fue el tiempo de exposición de la fibra. Para la determinación del tiempo, se expuso la fibra a los vapores de los patrones durante 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 min, manteniendo constante la temperatura (22°C); Cada experimento se repitió tres veces. Las fracciones volátiles aisladas por HS-SPME se analizaron por GC/FID.

3.2.1.2. Selección de terpenoides

Se utilizaron patrones certificados de monoterpenos (limoneno, α -pineno, α -terpineno), sesquiterpeno (cariofileno) y terpenos oxigenados (geraniol, linalol, terpinen-4-ol, citral (cis y trans), eucaliptol). En la Tabla 1, se registran la pureza y las casas distribuidoras de estas sustancias certificadas.

Tabla 1. Pureza de patrones certificados de monoterpenos, sesquiterpenos y terpenos oxigenados.

Terpenos	Pureza, %	Casa distribuidora
Limoneno	97	Aldrich Chemical
α -Pinoeno	97	Merck
α -Terpineno	89	Sigma
Cíneol	99	Aldrich Chemical
Linalol	95-97	Sigma
Citral	64-cis; 32-trans	Sigma
Terpinen-4-ol	96	Aldrich Chemical
Geraniol	97	Aldrich Chemical
β -Cariofileno	98	Sigma

3.2.1.3. Preparación de las soluciones de patrones

Para inyección directa de las soluciones, se tomaron 50 μ L de cada patrón certificado de terpenos y se diluyeron hasta 1 mL con metanol grado HPLC (*J.T. Baker*), se expuso con la fibra de PDMS (SPME) y se inyectó al equipo GC/FID, para su análisis cromatográfico.

3.2.1.4. HRGC/FID

Se utilizó el cromatógrafo de gases: *Hewlett-Packard HP 5890 Series II* (Palo Alto, CA, EE.UU.) equipado con el puerto de inyección *split/splitless* (*split* 15:1) [inyección manual para SPME], con detector de ionización en llama operado a 250°C y con flujos de aire e hidrógeno de 300 y 30 mL/min, respectivamente. Para los dos equipos se utilizó la columna capilar de sílice fundida HP-5 de fase estacionaria 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano), 30 m x 0.32 mm (d.i.) x 0.25 μ m (f.e.). Como gas de arrastre se usó helio (AGA Fano S.A., 99.995%) con presión de entrada de 152 kPa y velocidad lineal de 35.7 cm/s. Los datos obtenidos en los análisis se procesaron usando el *software* HP *ChemStation Rev. A.03.06* [509] (*Hewlett-Packard*). La programación de temperatura para la columna fue desde 50°C mantenidos 5 min., con una rampa de calentamiento de 5°C/min hasta 250°C, mantenidos durante 10 min.

3.3. PARTE ESTADÍSTICA

Buscando sacarle más provecho a los datos obtenidos se hizo un análisis estadístico multivariable de tipo PCA (análisis de componentes principales).

3.3.1. Análisis PCA de los datos obtenidos teórica y experimentalmente

Se tomaron los datos de las tres metodologías de termodinámica estadística calculados por el programa Q3, energía de asociación, la entropía, la función de partición y la energía libre de Helmholtz de asociación, y se creó un gráfico PCA, para cada metodología. Para la parte experimental se creó uno con los datos obtenidos en la parte experimental, además, se calcularon las ecuaciones de la recta tangente de cada perfil de SPME, de este se tomó la pendiente y el corte en el eje. Además de los datos de los cromatogramas se extrajeron las áreas máxima, mínima y el tiempo de retención promedio y por tablas de la literatura científica se tomaron los índices de Kovàts ^[42]. Los resultados se clasificaron en subconjuntos, según su distancia en el espacio formado por los componentes principales obtenidos del conjunto de los datos para cada una de las metodologías propuestas para el cálculo de la energía de asociación.

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1. PARTE TEÓRICA

4.1.1. Optimización de la geometría de las moléculas individuales

A continuación en la Tabla 2 se tienen los datos de las energías de los terpenos y el PDMS (en sus tres formas, DDS, hebra y ovillo). La energía de los terpenos para el caso de la hebra (segunda metodología) y del ovillo (tercera metodología) es la misma ya que éstos utilizan el mismo nivel de teoría (método mecánica molecular, MM⁺) En el caso del MMH (primera metodología) ocurre lo mismo para cuando la cantidad de moléculas de DDS es n=3 y n=4 (método semi-empírico, PM3). La energía y los datos obtenidos para la hebra y el ovillo por dinámica molecular no son reportados ya que la energía obtenida por DM es dependiente del tiempo y en las metodologías que se utilizan en este trabajo no dependen del tiempo; las estructuras obtenidas de este método son reoptimizadas para cada metodología (MM Y PM3). Las moléculas optimizadas de los terpenos, el dimetildimetoxisilano, la hebra y el ovillo pueden ser observadas en el Anexo 4.

Tabla 2. Energías de los terpenos estudiados, obtenidos mediante, MM y PM3.

	Energía (Kcal/mol)	
	MM	PM3
α -Pino	52.3613	-33008.9437
Cariofileno	49.6505	-49529.3675
Eucaliptol	23.4660	-40525.7329
Geranial	6.4780	-39788.5811
Neral	5.3251	-39790.5165
Geraniol	2.1644	-40510.2859
Terpinen-4ol	9.6807	-40524.9100
Linalol	6.6765	-41971.1950
α -Terpineno	7.7120	-33024.4341
Limoneno	4.6406	-33019.4907
Ovillo	-208.9788	
Hebra	-1.5514	
MMH n=3		-91508.1916
MMH n=4		-122012.2908

La suma de la energía del terpeno con la energía del PDMS es la energía de referencia (Tabla 3) para el cálculo de la energía de asociación para la creación del archivo de entrada del programa Q3.

Tabla 3. Energía de referencia de los terpenos para el cálculo de la energía de asociación.

	Energía de referencia (Kcal/mol)			
	Ovillo	Hebra	MMH n=3	MMH n=4
α -Pinoeno	-156.6175	50.8099	-124517.1353	-155021.2345
Cariofileno	-159.3283	48.0991	-141037.5591	-171541.6582
Eucaliptol	-185.5128	21.9146	-132033.9245	-162538.0237
Geranial	-202.5008	4.9266	-131296.7727	-161800.8719
Neral	-203.6537	3.7737	-131298.7081	-161802.8073
Geraniol	-206.8144	0.6130	-132018.4775	-162522.5766
Terpinen-4-ol	-199.2981	8.1293	-132033.1016	-162537.2007
Linalol	-202.3023	5.1251	-133479.3866	-163983.4858
α -Terpineno	-201.2668	6.1606	-124532.6257	-155036.7249
Limoneno	-204.3382	3.0893	-124527.6823	-155031.7815

Con los valores de la Tabla 3 se pueden evidenciar las diferencias que hay de entrada en las tres metodologías, ya que las tres están dando información (ordenando de mayor a menor las energías) diferente; MMH para n=3 y n=4 estás dando la misma información, estas diferencias son debido a las diferencias en los métodos de cálculo (MM y PM3).

4.1.1. Primera metodología - MMH

4.1.1.1. Cálculo de la cantidad de moléculas necesarias para el efecto de solvatación de los terpenos

Debido a que en los terpenos de estudio hay grupos funcionales diferentes (CH, OH, CHO), es necesario buscar para cada molécula de terpeno la mejor cantidad de n (cantidad de moléculas de dimetildimetoxisilano (DDS)). Pero teniendo en cuenta que los monoterpenos son CH y los demás son terpenos oxigenados, se realizaron los cálculos para el limoneno (monoterpeno) y el linalol (terpeno oxigenado), para cada uno se buscó la mejor cantidad de n, y se realizó lo

propuesto en la metodología 3.1.2. Los resultados de las energías de asociación están registrados en la Tabla 4.

Tabla 4. Energías de asociación para el limoneno y el linalol a diferentes valores de n.

n	E _{ass} (kJ/mol)	
	Limoneno	Linalol
1	-14.1173	-5.2473
2	-9.0423	-5.8536
3	-35.5235	-21.1412
4	-13.5051	-38.3389
5	-11.2608	-17.4065
6	-19.7981	-11.0627

Con los valores de la Tabla 4 se puede deducir que se presenta mejor estabilidad en los agregados del limoneno para cuando el valor de n=3. Este valor se utilizó para los terpenos y el sesquiterpeno. Para el linalol se obtuvo el valor de n=4 el cual se utilizó para los terpenos oxigenados. Teniendo ya el mejor valor de n se procedió a crear los agregados con el programa GRANADA.

La exploración no se puede realizar a un valor de n mayor de 6 moléculas de DDS debido a las limitaciones de MOPAC 6.0. que analiza un valor máximo de 100 átomos pesados y 100 átomos de hidrógeno. En este caso, se tiene que la molécula de DDS cuya fórmula es C₄H₁₂O₂Si, posee 7 átomos pesados y 12 hidrógenos, y el cariofileno C₁₅H₂₄ (el terpeno de mayor tamaño), son 15 átomos pesados y 24 hidrógenos, entonces, si tenemos en cuenta la asociación de estas dos moléculas tendríamos un total de 22 átomos pesados y 36 átomos de hidrogeno, por lo tanto para completar los 100 átomos de cada restricción faltan 78 átomos pesados y 64 átomos de hidrogeno, pero para saber a cuantas moléculas equivalen estos valores se utilizó la ecuación 12; como el DDS es igual para todos los terpenos en el caso de átomos pesados se divide sobre 7 y en los hidrógenos sobre 12, en la Tabla 5 se muestran los resultados.

$$n = \frac{100 - \# \text{átomos pesados y hidrogenos de terpeno}}{\# \text{átomos pesados y hidrogenos de dimetildimetoxisilano}} \quad (12)$$

Tabla 5. Cálculo de la máxima cantidad de moléculas de dimetildimetoxisilano, con las que se puede calcular en MOPAC.

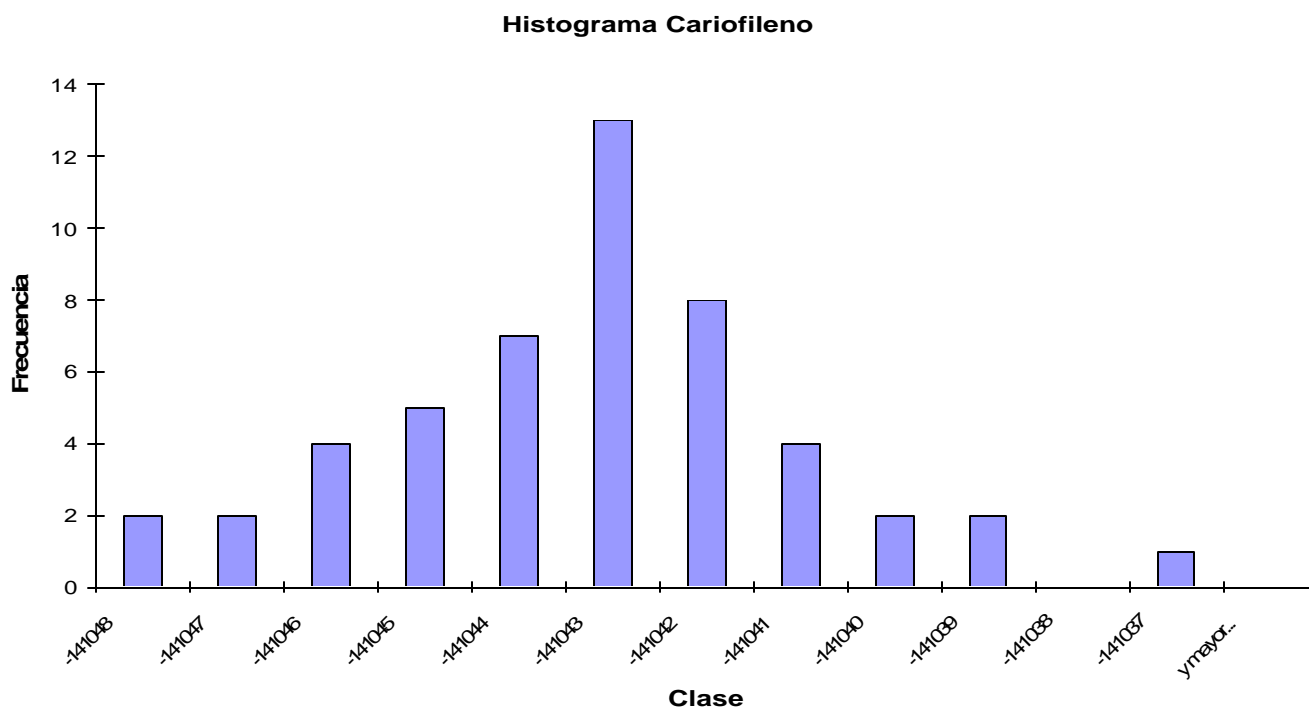
	# átomos pesados	# átomos de hidrógenos	n según los átomos pesados	n según los átomos de hidrogeno
α -Pinoeno	10	16	12.8571	7.0000
Cariofileno	15	24	12.1429	6.3333
Eucaliptol	11	18	12.7143	6.8333
Geranial	11	16	12.7143	7.0000
Neral	11	16	12.7143	7.0000
Geraniol	11	18	12.7143	6.8333
Terpinen-4-ol	11	18	12.7143	6.8333
Linalol	11	18	12.7143	6.8333
α -Terpineno	10	16	12.8571	7.0000
Limoneno	10	16	12.8571	7.0000

Con los valores de la Tabla 5, se puede deducir que si tenemos en cuenta n según los átomos pesados se podría trabajar máximo con 12 moléculas de DDS, en cambio si se tienen en cuenta los átomos de hidrogeno podría trabajar máximo 6 moléculas de DDS.

4.1.1.2. Obtención de la distribución de la energía de los agregados obtenidos por GRANADA

Los resultados de la optimización de los agregados obtenidos por GRANADA, están en el Anexo 5. En la Figura 10 se aprecia el histograma de frecuencia vs clase, donde la frecuencia son las veces que se repite la energía de cada agregado en un rango determinado de energía. Este histograma sugiere una distribución unimodal de la energía de los agregados. Además los datos están concentrados alrededor del promedio, lo cual garantiza que se esté trabajando en un rango confiable de trabajo; este comportamiento se presentó en todos los terpenos (ver Anexo 6).

Figura 10. Histograma de la distribución de los energía de los agregados (kJ/mol) obtenidos por GRANADA para el cariofileno con el DDS, para la primera metodología - MMH.



4.1.1.3. Cálculo de la energía de asociación de los terpenos

Con los valores de energía de los agregados (Anexo 5) y la energía de referencia (Tabla 3) se realizaron los cálculos de la energía de asociación, la entropía, la función de partición absoluta, la función de partición relativa y energía libre de Helmholtz por medio del programa Q3 como se planteó en la metodología 3.1.2. En la se muestran los resultados de termodinámica estadística obtenidos.

Tabla 6. Resultados de termodinámica estadística calculados por Q3 para la primera metodología - MMH, energía de asociación (E_{ass}), entropía (S), Función de partición absoluta, Función de partición relativa y energía libre de Helmholtz (F).

Terpenos	# de agregados	E _{ass} (kJ/mol)	n	Función de partición absoluta	Función de partición relativa	S (J/K mol)	F (kJ/mol)
Geraniol	50	-47.8080	4	1.0103	254118775.2000	0.5747	-47.9793
Linalol	50	-38.3389	4	1.3168	12063009.5700	6.9927	-40.4238
Limoneno	50	-35.5235	3	2.3251	5784828.7140	10.3250	-38.6019
α-Terpineno	50	-30.9137	3	1.5272	805383.1942	9.3915	-33.7138
Terpinen-4-ol	50	-21.7730	4	1.4000	19781.7270	9.2297	-24.5248
Geranial	50	-21.0230	4	1.3196	11745.5000	7.4106	-23.2325
Cariofileno	50	-20.9451	3	1.9986	20325.8060	12.2318	-24.5921
Neral	50	-17.2890	4	2.8575	4888.1140	12.6450	-21.0591
Eucaliptol	50	-16.3622	4	2.6881	5583.2643	16.8590	-21.3887
α-Pineno	50	-15.0385	3	1.7158	1922.7283	12.4348	-18.7459

En la Tabla 6 se encuentran los valores de la energía de asociación de los agregados terpeno-DDS ordenados de mayor a menor. Se puede ver que el terpeno con mayor energía de asociación con el PDMS es el geraniol que es un terpeno oxigenado y el de menor es el α-pineno que es un monoterpeno. Analizando las interacciones entre el dimetildimetoxisilano y los terpenos se deduce que los sitios de interacción del DDS que es un compuesto de naturaleza no polar son los metilos electrodonantes y el oxígeno que se pueden involucrar en interacciones de tipo dipolo-dipolo inducido con los grupos metilos, OH, C=O y las insaturaciones de los terpenos ^[43, 44], pero interaccionan más los metilos que los oxígenos ya que estos están impedidos por los metilos y el silicio.

Teniendo en cuenta la energía de asociación se puede observar que los terpenos más estables con la esfera de solvatación, son el geraniol, seguido del linalol, esto es debido a que estructuralmente son muy semejantes (ver Anexo 4); ambos presentan un grupo hidroxilo y dos insaturaciones, la diferencia radica en la ubicación del grupo OH, mientras uno es terminal (geraniol), el otro (linalol) está enlazado a un carbono quiral que contiene un CH₂, CH y CH₃, por lo tanto el OH

libre del geraniol esta disponible a interactuar con los metilos de la esfera de solvatación. En el caso de las insaturaciones presentan una en común en el grupo isoprenico. Mientras que la otra insaturación en el linalol es terminal, en el geraniol presenta isomería *cis*, alejando el OH terminal y quedando expuesto a las interacciones con los metilos.

En el caso del limoneno y el α -terpineno ambos son semejantes estructuralmente, solamente difieren en la posición de una insaturación, la insaturación en común se encuentra en el anillo, la otra en el limoneno está en el grupo isoprenico y en el α -terpineno está dentro del anillo. Las dos insaturaciones en el anillo presentan una conjugación la cual va a crear una interacción tipo dipolo inducido con los metilos del dimetildimetoxisilano, haciéndolo más estable. En cambio, el limoneno presenta un anillo semi-móvil en forma de semi-silla permitiendo mayor interacción de las insaturaciones y los metilos del terpeno con el medio. Por otra parte, la insaturación del grupo isopreno, se encuentra interaccionando con el medio, además de la insaturación del anillo, creando dipolos inducidos por separado, haciendo al limoneno más estable con el medio que el α -terpineno.

Continuando con el orden de aparición de las energías se tienen tres terpenos, terpinen-4-ol, geranial y cariofileno. El terpinen-4-ol presenta un OH terciario unido a un anillo que contiene una insaturación a diferencia del geraniol (alcohol primario) y el linalol (terciario unido a un carbono quiral); además tiene una insaturación que presenta dipolos inducidos que interaccionan mejor con la esfera de solvatación, que en el caso del geranial, ya que éste tiene un grupo aldehído (CHO) (es el isómero *cis* del citral). Los electrones π localizados del grupo C=O, dan como resultado, una improbabilidad de interacción entre el medio y el terpeno. Adicionalmente, tiene una insaturación que presenta un dipolo inducido. El caso del cariofileno, que es un sesquiterpeno y no debería estar tan alejado de los terpenoides, es debido a que este es un biciclo más voluminoso, con dos insaturaciones separadas, haciendo probable la interacción de éste con el medio. Para terminar están el neral, eucaliptol y α -pineno, el neral tiene un grupo aldehído (CHO) (es el isómero *trans* del citral), por lo tanto ocurre algo muy similar que con el geranial, en este caso se puede ver que el medio se estabilizó mejor con el

geranial que es el isómero *cis*. El eucaliptol es un biciclo que consta de un anillo unido por un enlace éter –O–. Este oxígeno se puede involucrar en una interacción dipolo-dipolo inducido con los grupos metilos electrodonantes de la esfera de solvatación; a diferencia de los demás terpenos este es el único que no presenta insaturaciones, no presentando así sitios adicionales de interacción. Por último está el α -pineno, que es un semibiciclo, el cual presenta una insaturación y grupos metilos electrodonantes los cuales interaccionan con el medio. En general esto se aplica para todas las metodologías.

Por medio de los resultados obtenidos en la primera metodología - MMH (efecto de solvatación del medio (PDMS) con el terpeno), y considerando el sistema como la absorción de los terpenos en el PDMS ^[45], se podría decir, que el α -pineno, que es el de menor energía de asociación, tiene poca afinidad y se absorbe difícilmente en el PDMS. Adicionalmente, sería el que más fácilmente se desprende del medio de solvatación. Seguidamente, según aumenta la energía de asociación (menos negativa) aumenta la afinidad del terpeno con el PDMS y es más difícil desorber éstos del PDMS. Lo mismo se aplica para los demás terpenos; el orden de los siguientes terpenos es: eucaliptol, neral, cariofileno, geranial, terpinen-4-ol, α -terpineno, limoneno, linalol y geraniol.

4.1.2. Segunda metodología - Hebra

4.1.2.1. Obtención de la distribución de la energía de los agregados obtenidos por *DOCKING*

A diferencia de GRANADA que se fijaba el número de agregados a obtener, en *docking* solamente se reportan los agregados que mejor se asociaron con los sitios de unión de la hebra, ya que para cada sitio de unión se prueban las diferentes rotaciones del terpeno; el número de agregados va a depender de la cantidad de sitios de unión que encuentre el terpeno en la hebra. En la Tabla 7 se indica la cantidad de agregados obtenidos para cada terpeno.

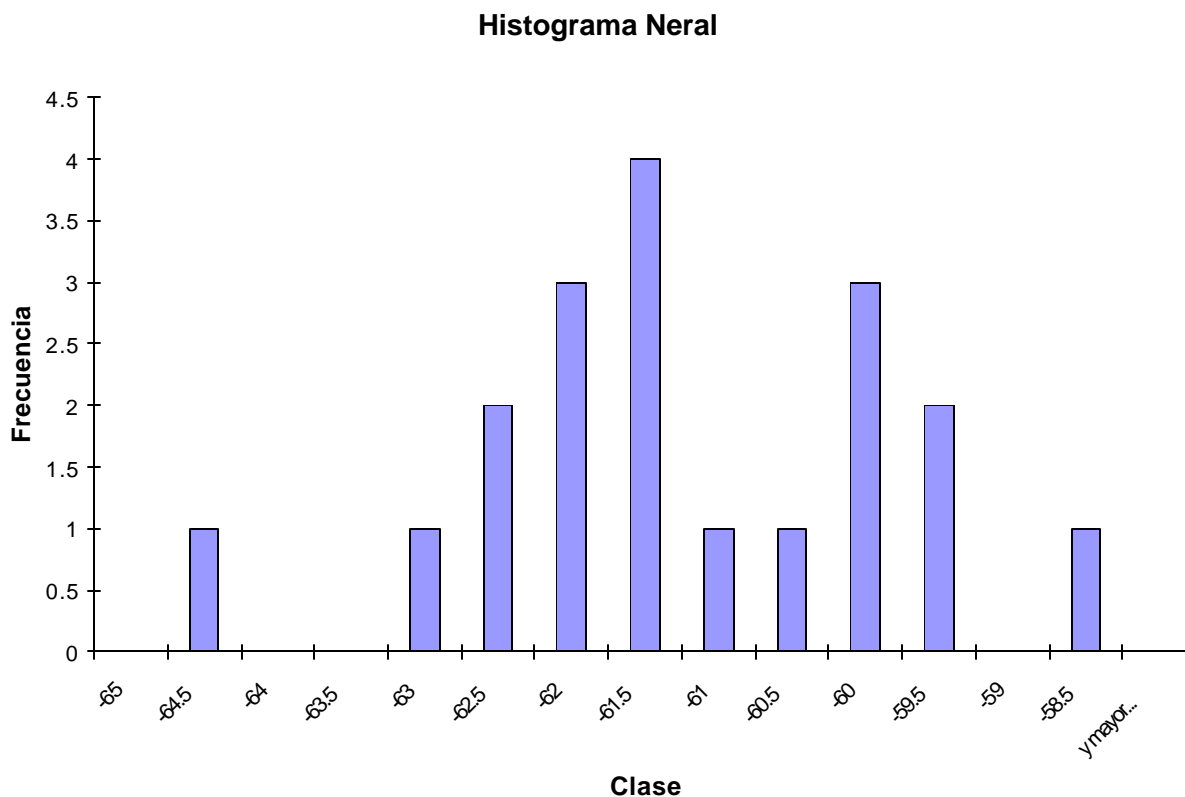
Tabla 7. Número de agregados obtenidos para cada terpeno por *Docking* para la segunda metodología - Hebra.

Terpeno	# Agregados
α -Terpineno	6
Eucaliptol	9
Linalol	9
α -Pino	11
Limoneno	11
Terpinen-4-ol	11
Cariofileno	12
Geraniol	13
Geranial	17
Neral	19

En la Tabla 7 se puede observar que el número de agregados obtenidos fue pequeño, debido al tamaño de la hebra, ya que presentó pocos sitios de unión con el terpeno.

Los resultados de la optimización de los agregados obtenidos por *Docking*, están en el Anexo 5. En la Figura 11 se aprecia el histograma de frecuencia vs clase, donde la frecuencia son las veces que se repite la energía electrónica de cada agregado en un rango determinado de energía. En este histograma se sugiere lo mismo que en el análisis anterior, pero en este caso, el número de agregados no es suficiente, la distribución no es homogénea pero, igual se abarca un buen rango de trabajo; los demás histogramas se pueden ver en el Anexo 6.

Figura 11. Histograma de la distribución de las energías de los agregados (kJ/mol) obtenidos por *Docking* para el neral con la hebra, para la segunda metodología - Hebra.



4.1.2.3. Cálculo de la energía de asociación de los terpenos

Con los valores de energía de los agregados (Anexo 5) y la energía de referencia (Tabla 3) se calcularon la energía de asociación, la entropía, la función de partición absoluta, la función de partición relativa y energía libre de Helmholtz por medio del programa Q3 como se planteó en la metodología 3.1.3. En la Tabla 8 se muestran los resultados de termodinámica estadística obtenidos.

Tabla 8. Resultados de termodinámica estadística calculados por Q3 para la segunda metodología - Hebra.

	# de agregados	E _{ass} (kJ/mol)	Función de partición absoluta	Función de partición relativa	S (J/K mol)	F (kJ/mol)
Cariofileno	12	-286.3540	1.5684	4.13E+50	8.6519	-288.9336
Neral	19	-285.5324	1.1924	2.24E+50	6.3313	-287.4201
Eucaliptol	9	-280.1854	1.0547	1.63E+49	2.4931	-280.9287
Geranial	17	-280.1049	3.7939	7.95E+49	15.9159	-284.8503
Linalol	9	-279.8014	1.9657	4.37E+49	11.9627	-283.3681
Geraniol	13	-277.2358	1.7294	1.45E+49	11.3842	-280.6300
α -Terpineno	6	-275.6750	1.6070	6.65E+48	10.1406	-278.6984
Limoneno	11	-273.8620	1.6398	3.76E+48	11.4862	-277.2866
Terpinen-4-ol	11	-270.5676	3.7188	1.74E+48	16.1501	-275.3828
α -Pino	11	-268.2252	1.8381	3.86E+47	11.4617	-271.6425

En el caso de la segunda metodología – Hebra, las posibles interacciones entre la hebra y los terpenos son las mismas que las planteadas en la primera metodología – MMH. Por otra parte, los sitios de unión son dados por el programa *docking*; de ahí las diferencias en la cantidad de agregados que se obtuvieron. Adicionalmente, se corrobora que la cantidad de agregados no es directamente proporcional a la energía de asociación, ya que para el caso del neral, para el que se obtuvieron 19 agregados (la mayor cantidad), la energía de asociación no fue la mayor, como se puede observar en la Tabla 8. Además, se observa que la molécula con menor energía de asociación con la hebra fue el α -pino. La afinidad del α -pino con la hebra es poca, por lo tanto, es el que más rápidamente se puede desprender de la hebra. De la misma manera, se espera que el terpeno con mayor energía de asociación que es el cariofileno, el que más se adhiera, pero mas difícilmente se pueda desprender de la hebra y así respectivamente se esperaría que pasara con los demás terpenos estudiados ^[45].

4.1.3. Análisis tercera metodología - Ovillo

4.1.3.1. Obtención de la distribución de la energía de los agregados obtenidos por *DOKING*

A continuación en la Tabla 9 se reportan los agregados que mejor se asociaron con los posibles sitios de unión del ovillo.

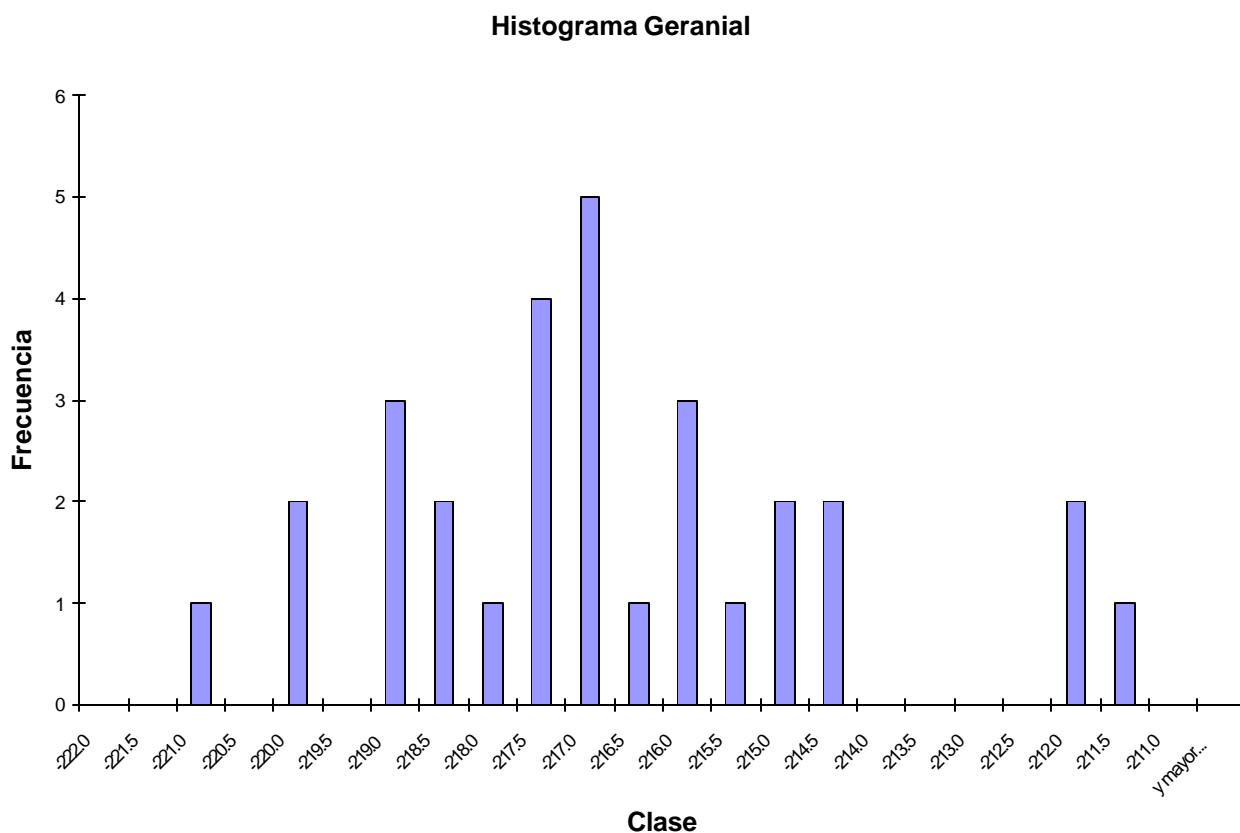
Tabla 9. Número de agregados obtenidos para cada terpeno por *Docking* para la tercera metodología - Ovillo.

Terpeno	# Agregados
Eucaliptol	11
α -Pino	14
Neral	21
α -Terpino	23
Terpino-4-ol	23
Linalol	24
Limoneno	26
Geranial	30
Cariofileno	32
Geraniol	37

La cantidad de agregados en la tercera metodología - Ovillo se incrementó, debido a que el ovillo es más voluminoso que la hebra. Por lo tanto, este ofrece más sitios de unión. Adicionalmente, esto va a depender de las interacciones que ocurran entre los sitios de unión del ovillo y el terpeno.

Los resultados de la optimización de los agregados obtenidos por *Docking*, están en el Anexo 5. En la Figura 12 se aprecia el histograma de frecuencia vs clase, donde la frecuencia son las veces que se repite la energía electrónica de cada agregado en un rango determinado de energía. En este histograma se sugiere lo mismo que en los análisis anteriores, pero en este caso, el número de agregados aumentó, por que es mayor la cantidad de posibles sitios de asociación, mejorando así la distribución de la energía de los agregados. Los demás histogramas se pueden ver en el Anexo 6.

Figura 12. Histograma de la distribución de los energía de los agregados (kJ/mol) obtenidos por *Docking* para el geranial con el ovillo, para la tercera metodología - Ovillo.



4.1.3.2. Cálculo de la energía de asociación de los terpenos

Con los valores de energía de los agregados (Anexo 5) y la energía de referencia (Tabla 3) fueron calculadas la energía de asociación, la entropía, la función de partición absoluta, la función de partición relativa y energía libre de Helmholtz por medio del programa Q3 como se planteó en la metodología 3.1.4. En la Tabla 10 se muestran los resultados de termodinámica estadística obtenidos.

Tabla 10. Resultados de termodinámica estadística calculados por Q3 para la tercera metodología - Ovillo.

	# de agregados	E _{ass} (kJ/mol)	Función de partición absoluta	Función de partición relativa	S (J/K mol)	F (kJ/mol)
Cariofileno	32	-87.8813	1.0739	3.26E+15	2.2732	-88.559
Terpinen-4-ol	23	-83.3354	1.0591	5.02E+14	1.9526	-83.9176
Limoneno	26	-82.5507	1.0273	3.31E+14	1.1171	-82.8838
Geraniol	37	-81.6105	1.8338	6.57E+14	9.9712	-84.5834
Neral	21	-80.3942	1.8102	3.04E+14	7.6358	-82.6708
α -Terpineno	23	-78.0489	1.1684	8.32E+13	4.743	-79.463
Geranial	30	-77.2916	1.4678	1.11E+14	9.6487	-80.1683
Linalol	24	-72.7183	2.0628	2.18E+13	11.4961	-76.1459
α -Pino	14	-69.2659	1.1918	2.25E+12	4.1811	-70.5125
Eucaliptol	11	-62.8514	2.1096	3.48E+11	10.1813	-65.8869

En el caso de la tercera metodología - Ovillo las posibles interacciones entre el ovillo y los terpenos son las mismas que las planteadas en la primera metodología – MMH. Por otra parte, se puede decir lo mismo que se planteó en la segunda metodología - Hebra respecto a la relación número de agregados-energía de asociación. Adicionalmente, se observa que la molécula con menor energía de asociación con el ovillo fue el eucaliptol. La afinidad del eucaliptol con el ovillo es poca, por lo tanto, es el que más rápidamente se puede desprender de la hebra. De la misma manera, se espera que el terpeno con mayor energía de asociación que es el cariofileno, el que más se adhiere, pero mas difícilmente se puede desprender de la hebra y así respectivamente se esperararía que pasara con los demás terpenos estudiados ^[45].

4.1. PARTE EXPERIMENTAL

4.1.1. Perfiles de saturación por HS-SPME

Las condiciones experimentales de esta sección se describieron detalladamente en el Numeral 3.2. La eficiencia de extracción del recubrimiento estudiado (PDMS, 100 μ m) se relaciona a continuación.

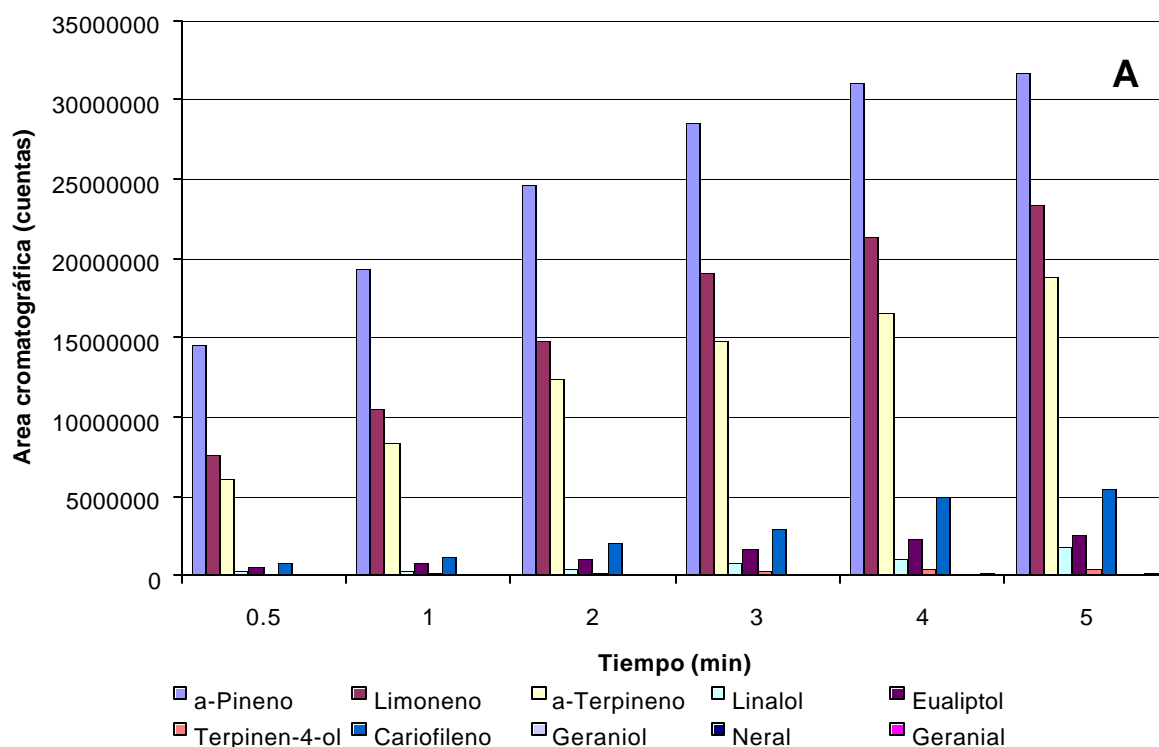
Para la obtención de los diferentes perfiles de saturación se realizó un diseño experimental (180 mediciones) teniendo como parámetro diferente el tiempo de exposición (0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 min) a temperatura ambiente (22 °C). Los datos

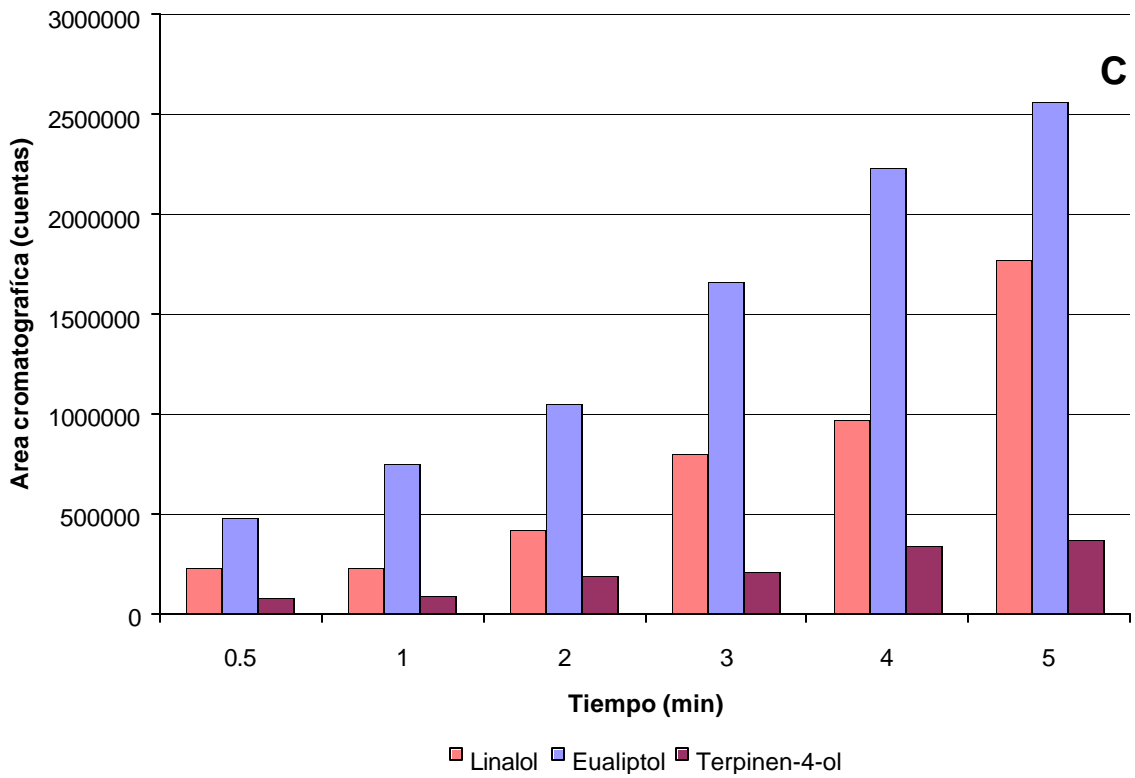
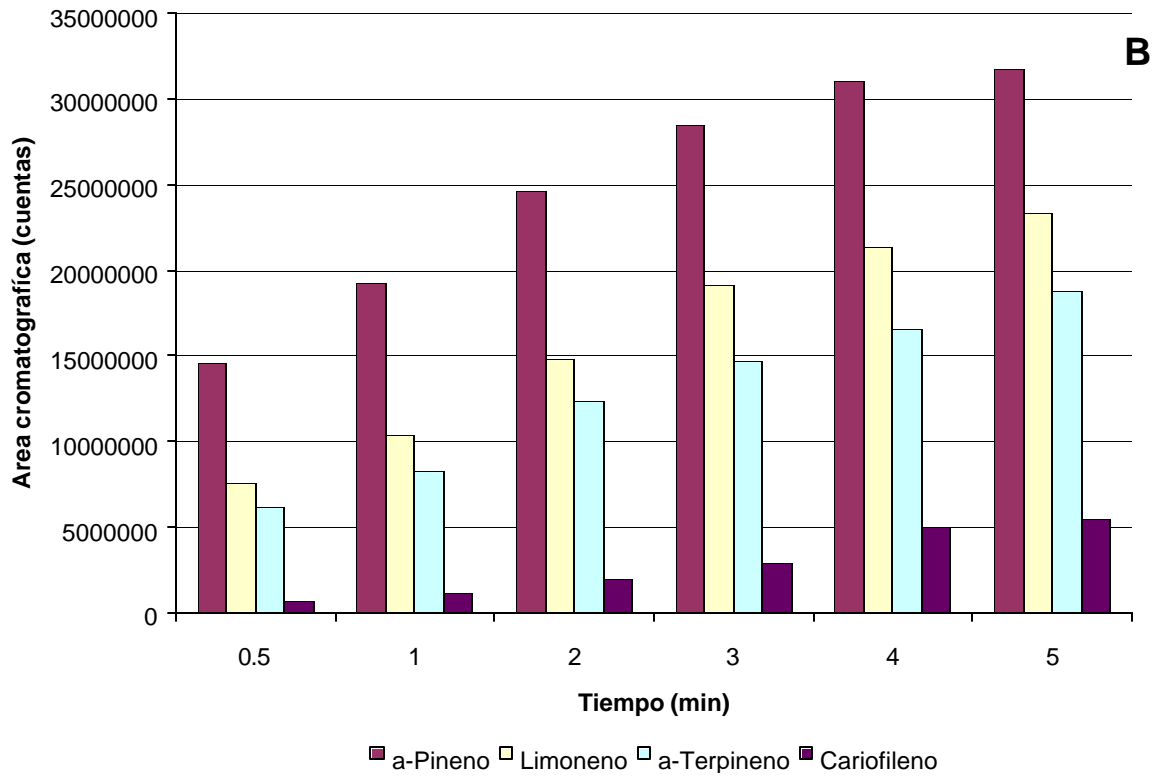
obtenidos aparecen en la Tabla 11. En la Figura 13 se presenta las tendencias encontradas en los perfiles de saturación logrados por terpenoides extraídos por el recubrimiento de PDMS-100 μ m.

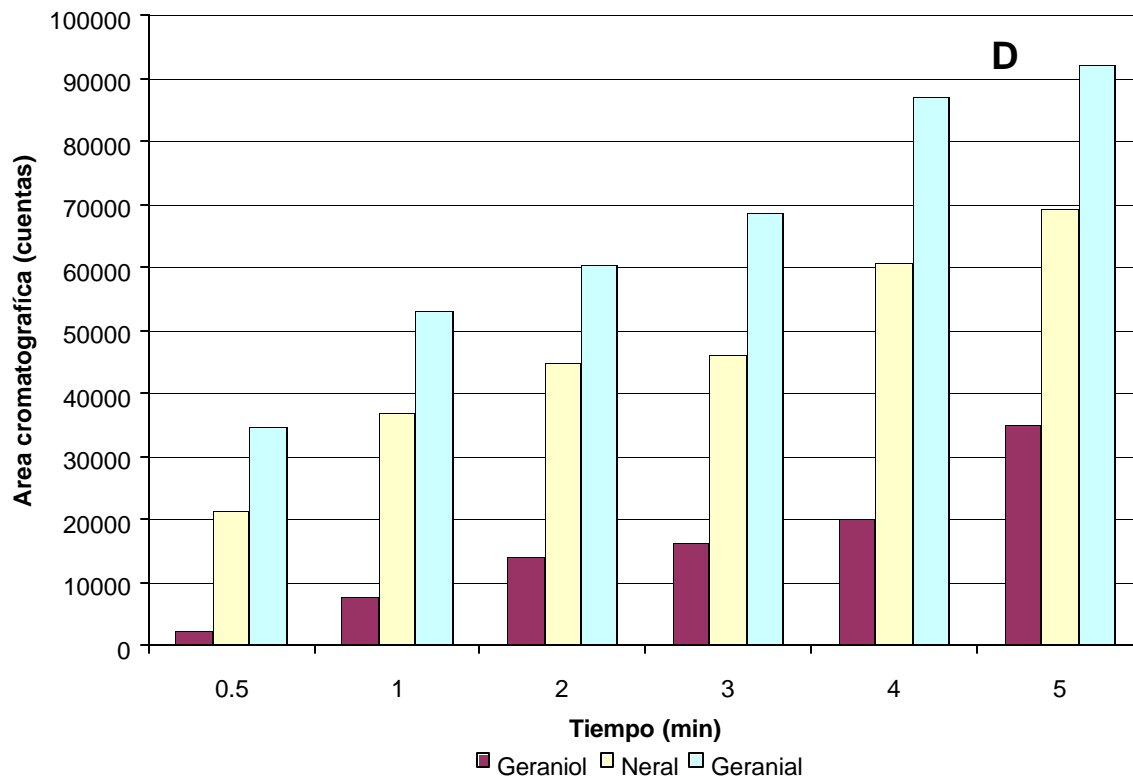
Tabla 11. Resultados obtenidos experimentalmente, áreas cromatográficas (cuentas) para los terpenos.

Tiempo (min)	0.5	1	2	3	4	5
α -Pineno	14582912	19268742	24627834	28526250	30988492	31707698
Limoneno	7532571	10426339	14829963	19087792	21320244	23355302
α -Terpineno	6130392	8317453	12320156	14749737	16556818	18782952
Cariofileno	722017	1134512	2025098	2945672	4977412	5498808
Eucaliptol	481697	754780	1048125	1664985	2232669	2564942
Linalol	234254	233078	420230	802153	965597	1766849
Terpinen-4-ol	74639	85156	187799	208294	343882	372663
Geranial	34630	53175	60261	68804	86987	92116
Neral	21172	36879	44830	46052	60604	69352
Geraniol	2175	7640	13900	16218	20115	35087

Figura 13. Perfiles de extracción de SPME por absorción con PDMS, A. de los 10 terpenos, B. de los 3 monoterpenos (α -pineno, α -terpineno, limoneno) y del sesquiterpeno (β -cariofileno), C. terpenos oxigenados (linalol, eucaliptol y terpinen-4-ol), D. terpenos oxigenados (geraniol, neral y geranial).







En la Figura 13 se presenta el efecto del tiempo, medido desde 0.5 hasta 5 min, sobre la recuperación por HS-SPME de los 10 terpenoides (α -pineno, α -terpineno, limoneno, eucaliptol, linalol, terpinen-4-ol, neral, geraniol, geranial y *trans*- β -cariofileno) a temperatura ambiente (22°C). Se observa que, para la mayoría de los patrones de terpenoides, existió un tiempo de extracción en el cual hubo un máximo de absorción sobre el recubrimiento con un incremento de la absorción con el aumento del tiempo de exposición. Así mismo, se encontró que al comparar las áreas cromatográficas de terpenos polares con los no polares, los valores fueron muy bajos para los terpenos polares. Lo cual indica la baja afinidad del recubrimiento de PDMS por sustancias de naturaleza química polar.

En la Figura A se puede observar la dependencia de la interacción entre el analito y el recubrimiento de la fibra. Esto se puede observar en las figuras por la cantidad de analito extraído para cada terpeno por la fibra (Tabla 14). Las Figuras B, C, D, son divisiones de la Figura A; éstas se dividieron con relación a la cantidad de analito retenido en la fibra que es debido a la naturaleza del PDMS que es un

recubrimiento no polar, por lo tanto va a tener menor afinidad por los terpenos oxigenados, ya que estos presentan un átomo electronegativo, como el oxígeno, que puede estar implicado en una interacción dipolo dipolo-inducido con los grupos metilos ricos en electrones del recubrimiento y ser retenidos en menor cantidad; en cambio, los monoterpenos y el sesquiterpeno presentan insaturaciones y grupos alquilo. Las insaturaciones no presentan un momento dipolar marcado, lo cual favorecería la extracción creando un dipolo inducido y los grupos alquilo ricos en electrones forman un dipolo marcado, lo cual favorecerá la atracción analito-fibra de cada uno de ellos.

4.3. Parte Estadística

4.3.1. Análisis de componentes principales de los datos obtenidos por la primera metodología - MMH

El análisis de componentes principales fue realizado al conjunto de 5 variables correspondientes a los valores de energía de asociación, entropía, función de partición absoluta, función de partición relativa y energía libre de Helmholtz indicados en la Tabla 6. En la Tabla 12 están los valores de los componentes de peso, para los cuatro componentes principales.

Ya que casi todas las variables contribuyen casi en igual medida en el factor 1, se podría decir que es un índice que representa el promedio de las variables que lo conforman, mientras que en el factor 2 corresponde a la función de partición relativa, seguida de la energía de asociación, y para el factor 3 corresponde a la función de partición absoluta, seguida de la función de partición relativa. Por otra parte, se puede decir que el primer factor depende de la distribución de las moléculas (S) y sus interacciones (E_{ass}), el segundo depende de la forma de la distribución de la energía del sistema y de sus interacciones y el tercer factor es la forma de la distribución de la energía del sistema.

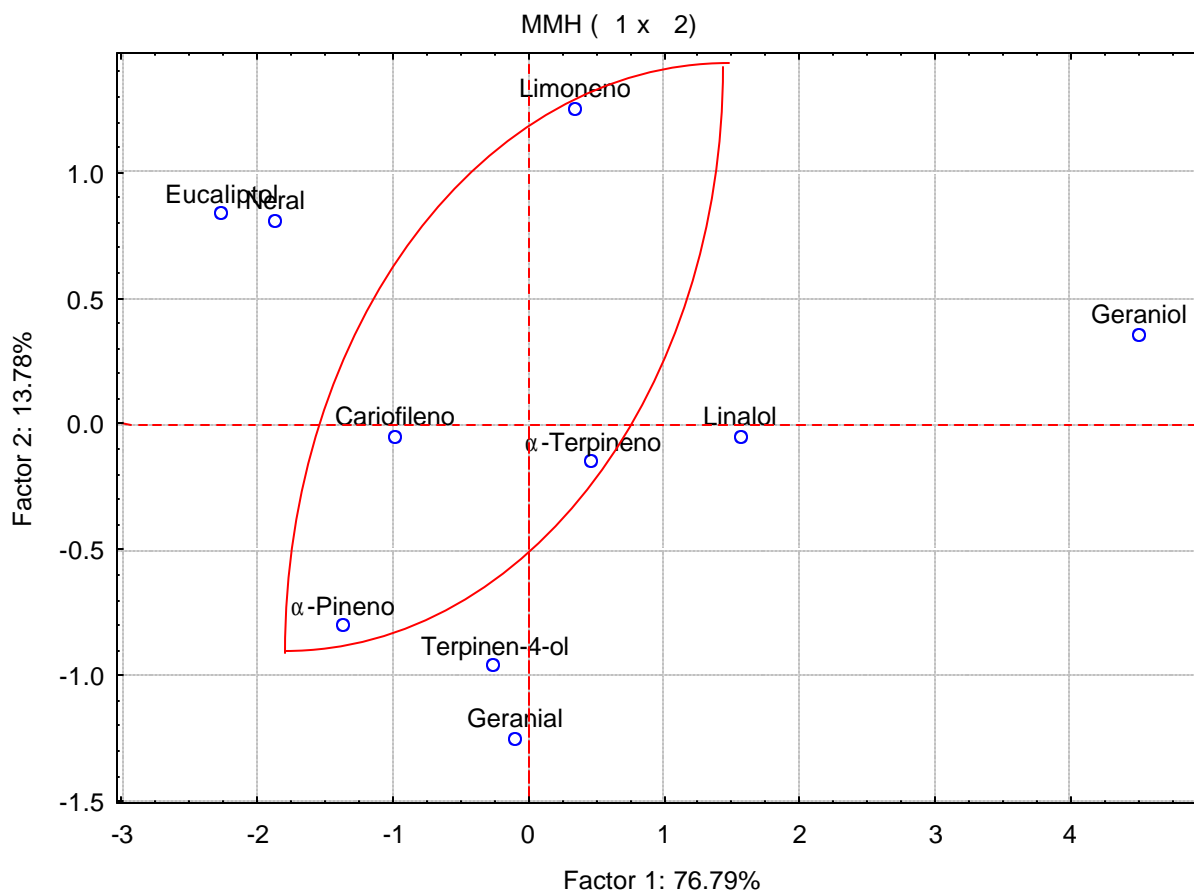
El primer componente principal explica el 76.79%, el segundo 13.78% y el tercer 7.80% de la variación total. En este caso los tres componentes principales se conservan con una calidad del 98.37%.

Tabla 12. Valores de los componentes de peso realizados por análisis de componentes principales, para la primera metodología - MMH.

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4
Eass	-0.2443	-0.5604	0.4148	-3.1477
Función de partición absoluta	-0.1922	-0.3966	-0.6278	0.3076
Función de partición relativa	0.2154	0.9537	-0.5330	-1.4278
S	-0.2472	0.2366	-0.2374	0.2430
Valor propio	3.8394	0.6889	0.4000	0.0717
% Total varianza	76.7883	13.7776	7.9993	1.4348
% acumulado	76.7883	90.5659	98.5652	100.0000

En la Figura 14 se tiene el gráfico de PCA, del factor 1 y del factor 2, en ella se puede ver el grupo de los terpenos (α -pineno, limoneno, α -terpineno) y el sesquiterpeno (cariofileno), rodeado de los terpenos oxigenados (eucaliptol, linalol, terpinen-4-ol, geranial, neral y geraniol).

Figura 14. Gráfica de PCA en 2D, de los factor 1 y factor 2, con una varianza del 90.57%, para los datos de la primera metodología - MMH.



4.3.2. Análisis de componentes principales de los datos obtenidos por la segunda metodología - Hebra

El análisis de componentes principales fue realizado al conjunto de 5 variables correspondientes a los valores de energía de asociación, entropía, función de partición absoluta, función de partición relativa y energía libre de Helmholtz indicados en la Tabla 8. En la Tabla 13 están los valores de los componentes de peso, para los cuatro componentes principales.

Ya que casi todas las variables contribuyen casi en igual medida en el factor 1, se podría decir que es un índice que representa el promedio de las variables que lo conforman. La función de partición relativa, seguida de la energía de asociación son las variables que más aportan al factor 2. En general, la correlación en los cuatro factores es alta respecto a la energía de asociación y la función de partición relativa. Por otra parte, se puede decir que en este caso predominó la distribución de la energía del sistema y las interacciones.

El primer componente principal explica el 62.42%, el segundo 29.31% y el tercer 5.90% de la variación total. En este caso los tres componentes principales se conservan con una calidad del 97.63%.

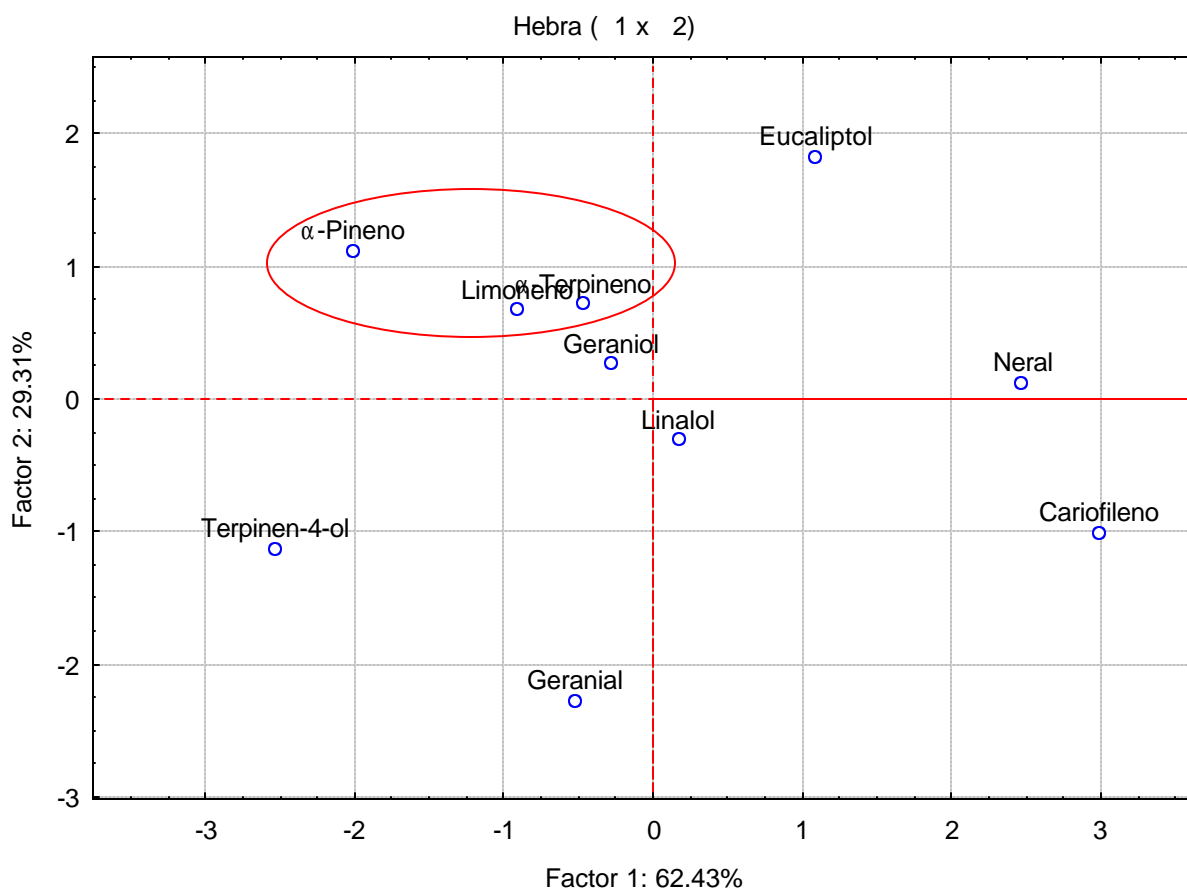
Tabla 13. Valores de los componentes de peso realizados por análisis de componentes principales, para la segunda metodología - Hebra.

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4
E _{ass}	-0.3034	-0.4107	-1.0455	-2.3698
Función de partición absoluta	-0.1826	0.1707	0.6510	-0.4593
Función de partición relativa	0.2612	-0.5334	-0.6802	-1.0686
S	-0.2180	-0.2515	0.3744	0.1569
Valor propio	3.1213	1.4657	0.2950	0.1180
% Total varianza	62.4254	29.3148	5.9001	2.3596
% acumulado	62.4254	91.7403	97.6404	100.0000

En la Figura 15 se tiene el gráfico de PCA, del factor 1 y del factor 2. En ella se puede ver el grupo de los terpenos (α -pineno, limoneno, α -terpineno), rodeado de

lo terpenos oxigenados (eucaliptol, linalol, terpinen-4-ol, geranial, neral y geraniol) y el sesquiterpeno (cariofileno).

Figura 15. Gráfica de PCA en 2D, de los factor 1 y factor 2, con una varianza del 91.73%, para los datos de la segunda metodología - Hebra.



4.3.3. Análisis de componentes principales de los datos obtenidos por la tercera metodología - Ovillo

El análisis de componentes principales fue realizado al conjunto de 5 variables correspondientes a los valores de energía de asociación, entropía, función de partición absoluta, función de partición relativa y energía libre de Helmholtz indicados en la Tabla 10. En la Tabla 14 están los valores de los componentes de peso, para los cuatro componentes principales.

Ya que casi todas las variables contribuyen casi en igual medida en el factor 1, se podría decir que es un índice que representa el promedio de las variables que lo

conforman. La función de partición relativa, seguida de la energía de asociación son las variables que más aportan al factor 2. En general, la correlación en los cuatro factores es alta respecto a la energía de asociación y la función de partición relativa. Por otra parte, se puede decir que en este caso predominó la distribución de la energía del sistema y las interacciones.

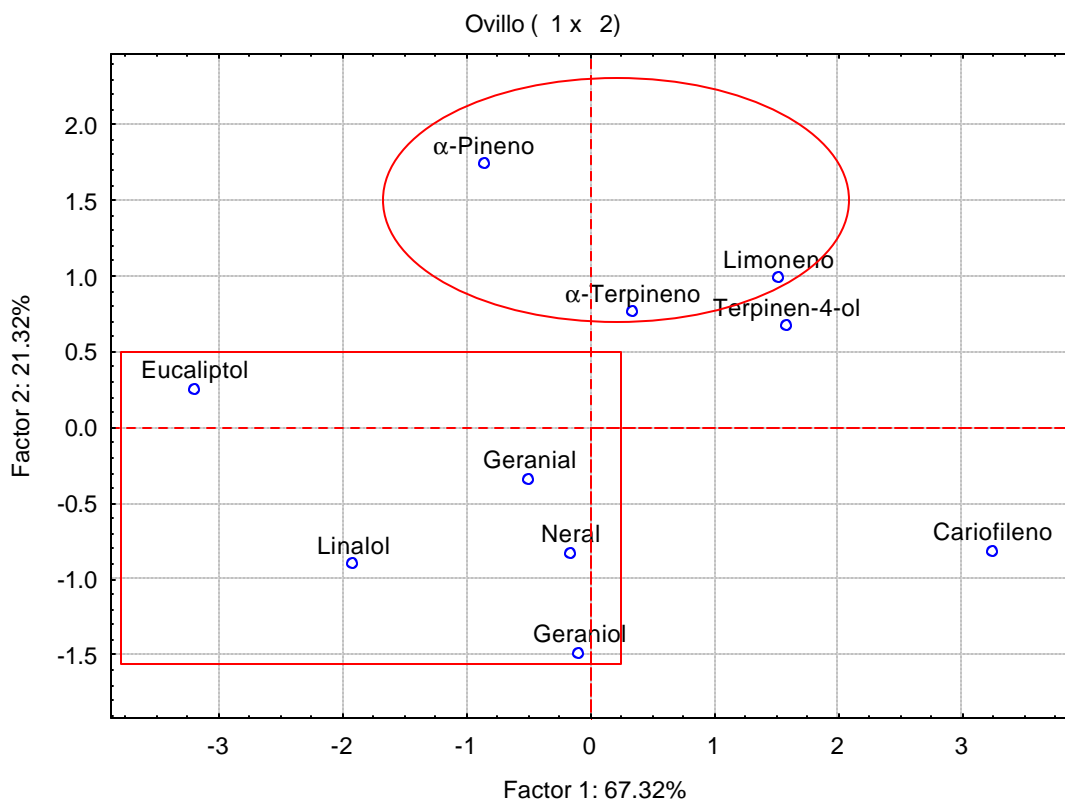
El primer componente principal explica el 67.31%, el segundo 21.32% y el tercer 9.89% de la variación total, En este caso los tres componentes principales se conservan con una calidad del 98.52%.

Tabla 14. Valores de los componentes de peso realizados por análisis de componentes principales, para la tercera metodología - Ovillo.

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4
E _{ass}	-0.2732	-0.4538	-0.7962	3.1302
Función de partición absoluta	-0.2374	0.2908	0.5959	-0.3733
Función de partición relativa	0.2138	-0.5333	0.4860	1.4252
S	-0.2350	-0.3318	0.0790	-0.3735
Valor propio	3.3658	1.0660	0.4947	0.0735
% Total varianza	67.3151	21.3194	9.8949	1.4706
% acumulado	67.3151	88.6345	98.5294	100.0000

En la Figura 16 se tiene el gráfico de PCA, del factor 1 y del factor 2. En ella se puede ver el grupo de los terpenos (α -pineno, limoneno, α -terpineno), rodeado del terpinen-4-ol que es un terpeno oxigenado, adicionalmente, se observa el grupo de terpenos oxigenados (eucaliptol, linalol, geranial, neral y geraniol) y el sesquiterpeno (cariofileno) por aparte.

Figura 16. Gráfica de PCA en 2D, de los factor 1 y factor 2, con una varianza del 88.63%, para los datos de la tercera metodología - Ovillo.



4.3.4. Análisis PCA de los datos obtenidos experimentalmente

El análisis de componentes principales realizado al conjunto de 6 variables correspondientes a los valores de las ecuaciones de la recta tangente de cada perfil de SPME. De éstas se tomaron la pendiente y el corte en el eje, además de los datos de los cromatogramas (área máxima, mínima y el tiempo de retención promedio) y de la literatura se tomaron los índices de Kovàts en la Tabla 15. En la Tabla 16 están los valores de los componentes de peso, para los cuatro componentes principales.

Tabla 15. Datos para calcular el PCA de la parte experimental.

Terpenos	Corte	Pendiente	Índice de Kovàts	Área mínima	Área máxima	Tiempo de retención promedio
α-Pineno	15241445.20	3758274.63	939	14582912	31707698	7.13
Cariofileno	6962430.29	1123440.86	1418	722017	5498808	22.58
Geranial	5698160.60	12034.31	1270	34630	92116	18.24
Geraniol	-18302.39	6267.03	1255	2175	35087	17.88
Limoneno	29523.80	3534040.60	1031	7532571	23355302	10.58
Linalol	-333.99	320208.73	1098	234254	1766849	12.86
Neral	-90179.05	9468.08	1240	21172	69352	17.33
α-Terpineno	34906.87	2752809.32	1018	6130392	18782952	10.09
Terpinen-4-ol	22022.29	70663.88	1177	74639	372663	15.30
Eucaliptol	227159.31	476402.72	1033	481697	2564942	10.49

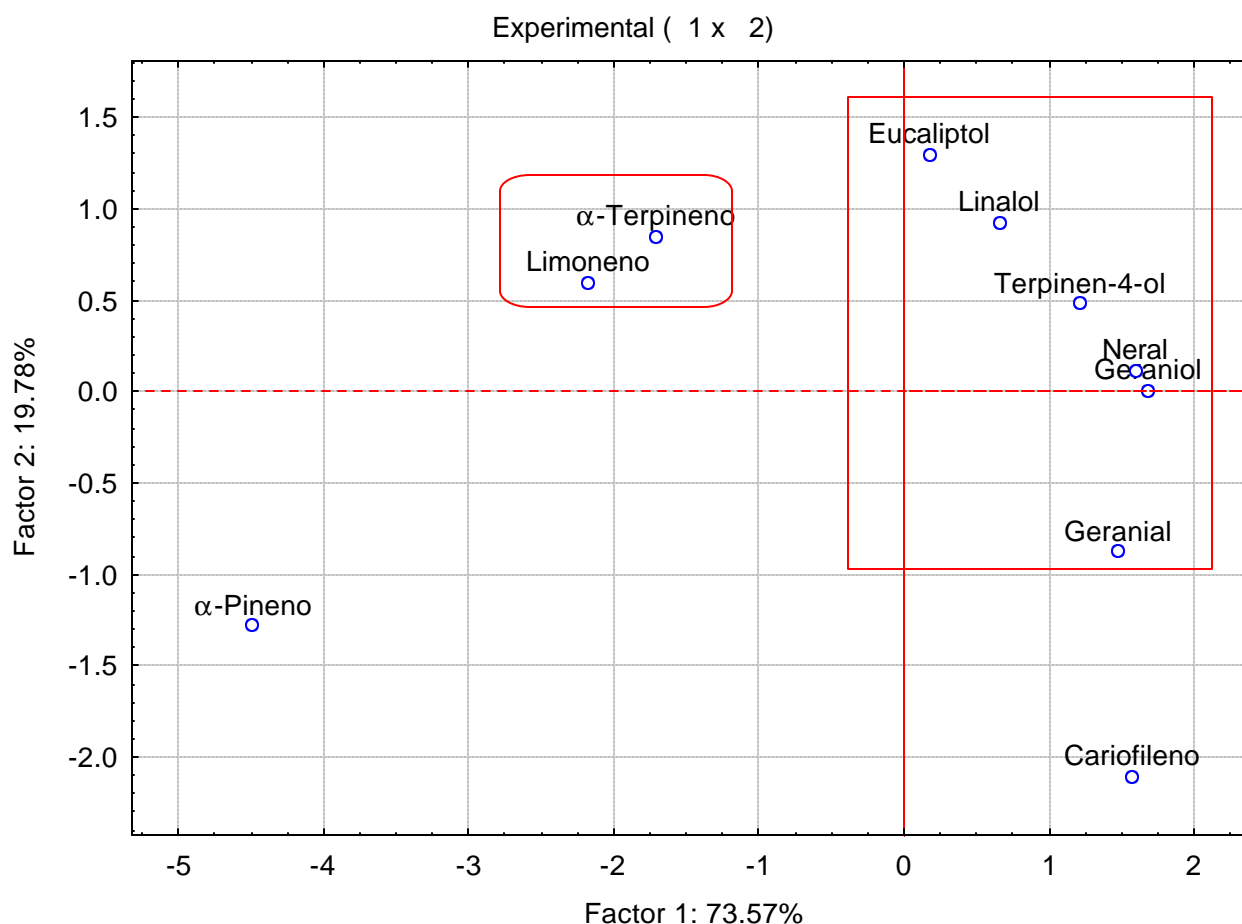
Ya que casi todas las variables contribuyen casi en igual medida en el factor 1, se podría decir que es un índice que representa el promedio de las variables que lo conforman, en el factor 2 corresponde a la pendiente, seguida del índice de Kovàts y el tiempo de retención promedio, y para el factor 3 corresponde a el corte, seguido de la pendiente y el tiempo de retención promedio. Por otra parte, se puede decir que el primer factor es la cantidad de analito retenido en la fibra de SPME, el segundo y tercer factor es el comportamiento de los perfiles de SPME. El primer componente principal explica el 73.57%, el segundo 19.78% y el tercer 6.29% de la variación total, En este caso los tres componentes principales se conservan con una calidad del 99,64%.

Tabla 16. Valores de los componentes de peso, para la parte experimental.

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6
Corte	-0.1158	-0.6533	0.9763	-1.8637	2.8529	-0.1679
Pendiente	-0.2111	-0.0998	-0.8862	-3.6558	-2.8609	-76.4436
Índice de Kovàts	0.1877	-0.4388	-0.5447	0.4086	-50.3228	19.9525
Área mínima	-0.2204	-0.1675	-0.0730	5.4286	-7.8695	-57.6795
Área máxima	-0.2191	-0.1259	-0.5439	0.3513	9.8605	131.9062
Tiempo promedio	0.1918	-0.4113	-0.5584	1.0927	50.0389	-19.3592
Valor propio	4.4142	1.1871	0.3776	0.0209	0.0002	0.0000
% Total varianza	73.5692	19.7847	6.2936	0.3487	0.0032	0.0006
% acumulado	73.5692	93.3539	99.6475	99.9962	99.9994	100.0000

En la Figura 17 se tiene el gráfico de PCA, del factor 1 y el factor 2. En ella se puede ver el grupo de los terpenos oxigenados (eucaliptol, linalol, terpinen-4-ol, geranial, neral y geraniol), además de la agrupación del limoneno y el α -terpineno que son terpenos muy similares a diferencia del α -pineno y cariofileno que son biciclos.

Figura 17. Gráfica de PCA en 2D, de los factor 1 y factor 2, con una varianza del 93.35%, para los datos experimentales.



4.4. Comparación de las metodologías

Al comparar el orden relativo de las energías de asociación calculadas por las 3 metodologías (Tabla 17), no se encuentra mucha concordancia entre ellas. Los datos teóricos están ordenados de menor energía de asociación a mayor y las columnas experimentales, se ordenaron de mayor a menor cantidad de analito retenido.

Tabla 17. Datos de las energías de asociación obtenidos por las tres metodologías y los datos experimentales de SPME.

Experimental (perfil SPME)	Teórico MMH	Teórico HEBRA	Teórico OVILLO
α -Pinoeno	α -Pinoeno	α -Pinoeno	Eucaliptol
Limoneno	Eucaliptol	Terpinen-4-ol	α -Pinoeno
α -Terpineno	Neral	Limoneno	Linalol
Cariofileno	Cariofileno	α -Terpineno	Geranial
Eucaliptol	Geranial	Geraniol	α -Terpineno
Linalol	Terpinen-4-ol	Linalol	Neral
Terpinen-4-ol	α -Terpineno	Geranial	Geraniol
Geranial	Limoneno	Eucaliptol	Limoneno
Neral	Linalol	Neral	Terpinen-4-ol
Geraniol	Geraniol	Cariofileno	Cariofileno

Comparando los comportamientos de los datos obtenidos de las energías de asociación (Tabla 17) entre sí se puede observar que los tres están dando información diferente del sistema.

En la primera metodología - MMH se puede decir que es el efecto de solvatación del medio con el terpeno, lo cual podría ser considerado como la absorción de los terpenos en el PDMS. Por lo tanto, se podría esperar, que el orden ascendente de absorción de los terpenos con el PDMS fuera: α -pinoeno, eucaliptol, neral, cariofileno, geranial, terpinen-4-ol, α -terpineno, limoneno, linalol y geraniol; además, la desorción sería a la inversa.

En la segunda metodología - Hebra el terpeno por medio de docking busca sitios donde asociarse con el PDMS, lo cual podría ser considerado como la adsorción del terpeno en el PDMS. Esta adsorción sería la asociación del terpeno a un fragmento del PDMS, lo cual puede ser la superficie exterior de un volumen de PDMS, se podría considerar como el proceso de aproximación o de entrada del terpeno al PDMS. Por lo tanto, se podría esperar, que el orden de adsorción de los terpenos con el PDMS fuera: α -pinoeno, terpinen-4-ol, limoneno, α -terpineno, geraniol, linalol, geranial, eucaliptol, neral y cariofileno; además, la desorción sería a la inversa.

En la tercera metodología - Ovillo ocurre lo mismo planteado en el análisis de la segunda metodología - Hebra, pero en este caso podría ser considerado como la sorción de los terpenos con el PDMS en donde se combinan la absorción y la adsorción. Por lo tanto, se podría esperar, que el orden de sorción de los terpenos con el PDMS fuera: eucaliptol, α -pineno, linalol, geranial, α -terpineno, neral, geraniol, limoneno, terpinen-4-ol, y cariofileno; además, la desorción sería a la inversa.

También se puede decir que el terpeno al entrar al PDMS (como recubrimiento adsorbente) va a tener dos diferentes etapas: una sería la afinidad del terpeno con la superficie al tratar de entrar al PDMS y la otra sería cuando ya se encuentre el terpeno adentro del PDMS.

Por lo general si saturamos una fibra de SPME recubierta de PDMS con el terpeno se obtiene el comportamiento mostrado en la Tabla 17. Los perfiles de absorción de los terpenos sobre PDMS obtenidos mediante HRGC-FID muestran que el orden de absorción decreciente es el siguiente: α -pineno, limoneno, α -terpineno, cariofileno, eucaliptol, linalol, terpinen-4-ol, geranial, neral y geraniol.

Comparando los datos obtenidos experimentalmente (tendencia de los perfiles de SPME) y las energías de asociación no se encuentra mucha concordancia entre la energía de asociación y el orden de los datos experimentales.

Los grupos de terpenos resultantes del análisis de componentes principales para cada una de las metodologías tanto computacional como experimental fueron similares. El grupo de monoterpenos limoneno, α -pineno y α -terpineno, se encontró rodeado del sesquiterpeno cariofileno y del grupo de terpenos oxigenados geraniol, linalol, terpinen-4-ol, neral, geranial y eucaliptol. Aunque los componente principales 1 y 2, reflejan la información promedio de las variables utilizadas para su construcción, se puede, decir que tales variables resultan de gran ayuda para la clasificación de las moléculas.

5. CONCLUSIONES

Mediante la metodología - MMH se obtuvo el siguiente orden ascendente de Energía de asociación (absorción) de los terpenos en el PDMS: α -pineno, eucaliptol, neral, cariofileno, geranial, terpinen-4-ol, α -terpineno, limoneno, linalol, geraniol.

El orden ascendente de la energía de asociación (adsorción) de los terpenos sobre el PDMS según la metodología - Hebra fue: α -pineno, terpinen-4-ol, limoneno, α -terpineno, geraniol, linalol, geranial, eucaliptol, neral y cariofileno.

En la metodología – Ovillo la energía de asociación en orden ascendente fue: eucaliptol, α -pineno, linalol, geranial, α -terpineno, neral, geraniol, limoneno, terpinen-4-ol, y cariofileno.

Los perfiles de absorción de los terpenos sobre PDMS obtenidos mediante HRGC-FID muestran que el orden de absorción decreciente es el siguiente: α -pineno, limoneno, α -terpineno, cariofileno, eucaliptol, linalol, terpinen-4-ol, geranial, neral y geraniol.

Las energías de asociación entre los terpenos y el PDMS calculados con base en las metodologías computacionales, MMH, Hebra y Ovillo, sugieren ordenes de asociación (absorción y adsorción) terpeno-PDMS diferentes a los obtenidos con base en los perfiles de extracción de SPME obtenidos por HRGC-FID.

Los grupos de terpenos resultantes del análisis de componentes principales para cada una de las metodologías tanto computacional como experimental fueron similares. El grupo de monoterpenos limoneno, α -pineno y α -terpineno, se encontró rodeado del sesquiterpeno cariofileno y del grupo de terpenos oxigenados geraniol, linalol, terpinen-4-ol, neral, geranial y eucaliptol.

6. RECOMENDACIONES

Realizar un estudio más detallado de la absorción y desorción, tanto por SPME como por cromatografía, para de esta forma con los datos obtenidos en este trabajo, crear un modelo para el cálculo de las constantes involucradas en la extracción y en la separación de los analitos.

Realizar los cálculos buscando un modelo al cual se le pueda poner un nivel de teoría más alto tipo ab-initio o DFT, para observar si los datos a ver se ajustan mejor a los resultados experimentales.

7. REVISIÓN BIBLIOGRÁFIA

[1] PAWLISZYN, Janusz, Solid phase microextraction. Theory and practice. Ed. Wiley-VCH. INC. New York, USA. 1997. p 15-16, 75-81.

[2] GÓRECKI, T. YU, X. PAWLISZYN, J. Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME. *The Analyst*. 1999, 124. p 643-649.

[3]. MONTERO, L. A. ESTEVA, A. M. MOLINA, J. ZAPARDIEL, A. HERNANDEZ, L. MARQUEZ, H. ACOSTA, A. A Theoretical Approach to Analytical Properties of 2,4-Diamino-5-phenylthiazole in Water Solution. Tautomerism and Dependence on pH. *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120(46); 12023-12033.

[4]. MONTERO, L. A. MOLINA, J. FABIAN, J. Multiple minima hypersurfaces of water clusters for calculations of association energy. *Int. J. Quantum.Chem.* 2000; 79, 8-16.

[5] SÁNCHEZ, E. MONTERO, L. A. HERMIDA, J. CRUZ, R. GONZÁLEZ, G. Cálculo de la energía de asociación en clusters de acetona mediante la aproximación de la hipersuperficie de múltiples mínimos. *Revista Cubana de Física*. Vol. 17, No.1-2, 2000.

http://intranet.dict.uh.cu/Revistas/Fís2000_2001/F00171-2j.doc

[6] GRANADA. Escrito por Luis A. Montero, Facultad de Química, Universidad de La Habana 10400, Cuba en la Universidad de Granada, Grupo de Modelización y Diseño Molecular, Granada 18071, España, en junio, 1996. Esta entrega es una versión revisada de junio, 2000. <http://karin.fq.uh.cu/mmh/>

[7] Q3. Escrito por Luis A. Montero, Facultad de Química, Universidad de La Habana 10400, Cuba en la Universidad de Granada, Grupo de Modelización y

Diseño Molecular, Granada 18071, España, en junio, 1996. Esta entrega es una versión revisada de junio, 2000. <http://karin.fq.uh.cu/mmh/>

[8] CODORNIZ, E. MONTERO, L. A. MARTÍNEZ, F. MESA, A. SANTANA, J. L. Efectos del solvente sobre la reacción de condensación de dímeros de taninos constituyentes de residuos forestales. Instituto superior de ciencias y tecnología nucleares Cátedra de medio ambiente. Contribución a la educación y la protección ambiental. VII taller de la cátedra de medio ambiente. 13-15 de junio del 2001. <http://puma.sskii.gu.se/cubataller7/viitaller/model%20amb/arrEdelsys2.htm>

[9] CODORNIZ, E. MONTERO, L. A. MARTÍNEZ, F. MESA, A. SANTANA J. L. Características estructurales de monómeros de taninos constituyentes de residuos forestales. Efectos del solvente. Contribución a la educación y la protección ambiental. VII taller de la cátedra de medio ambiente. 13-15 de junio del 2001. <http://puma.sskii.gu.se/cubataller7/VIIITaller/Model%20Amb/arrEdelsys1.htm>

[10] LEACH, Andrew. Molecular modelling: principles and applications. 1ª edición. Pearson educación. London. Longman, 1997. p 103-104, 555-557, 594.

[11] BRICEÑO, C. RODRÍGUEZ, L. Química. 2ª edición. Fondo educativo panamericano. Santafe de Bogotá. Colombia. 1997. p 246.

[12]. WALSTRA, P. Physical Chemistry of Foods. New York, NY, USA: Marcel Dekker Incorporated, 2002. p 46-57.

[13] LEVINE, Ira. Química cuántica. 5ª edición. Pearson educación S.A. Madrid, España. 2001. 467, 638-653.

[14]. GOODMAN, M.J. Chemical Applications of Molecular Modelling. Royal Society of Chemistry, 1998. p 211.

[15] YOUNG, David. Computational Chemistry: A Practical Guide for Applying Techniques to Real-World Problems. John Wiley & Sons, Inc. 2001. 37, 49-58.

[16] MATAS, A. Heredia, A. Dinámica de las biomoléculas. Número 51, Diciembre de 1998. ENCUENTROS EN LA BIOLOGIA (Edición Internet). Departamento de Biología Celular. Facultad de Ciencias. Campus de Teatinos. Málaga. España. <http://www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS51/dinamica.html>.

[17] LIPKOWITZ, K. BOYD, D. *Reviews in computational chemistry*. Volumen 17. 1ª edición. Wiley-vch. New York. USA, 2001. p 1-21.

[18] PADILLA, Jaqueline y ROJO, Arturo. Simulación del reconocimiento entre proteínas y moléculas orgánicas o *docking*. Aplicación al diseño de fármacos. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Departamento de Química. Área de Biofísicoquímica. MENSAJE BIOQUÍMICO, Vol. XXVI (2002). http://laguna.fmedic.unam.mx/mensajebioquimico/MensBioq02v26p129_Rojo.pdf

[19] ATKINS, P. W. FISICOQUIMICA. 3ª edición. Addison-Wesley. Wilmington, USA. 1991. p 588-605.

[20] IRIKURA, K. K. in "Computational Thermochemistry: Prediction and Estimation of Molecular Thermodynamics" (ACS Symposium Series 677); Irikura, K. K. and Frurip, D. J., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, 1998.

[21] ROBARDS, K.; HADDAD, P.R. and JACKSON, P.E. Principles and practice of modern chromatographic methods. San Diego: Academic Press, Inc. 1994. p. 9, 36-40.

[22] SETTLE, Frank A. Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. New Jersey: Prentice Hall, Inc. 1997. 994 p.

[23] GROB, Robert. L. Modern practice of gas chromatography. Second edition. New York: John Wiley and Sons, Inc. 1985. 896 p.

[24] RÖDEL, Wolfgang and WÖLM, Gerhard. A guide to gas chromatography. Berlín: VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften. 1987. p. 15-17.

[25] McNAIR, Harold M. and MILLER, James M. Basic gas chromatography. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1998. 200 p.

[26] WILLET, John. Gas chromatography - Analytical chemistry by open learning. Ed. David Kealey. London: Published on behalf of ACOL by John Wiley & Sons. 1987. 253 p.

[27] SCOTT, Raymond Peter William. Chromatographic detectors: Design, function, and operation. New York: Marcel Dekker, Inc. 1996. 514 p.

[28] POOLE, Colin F. and POOLE, Salwa K. Chromatography today. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, B.V. 1991. p. 4-8.

[29]. LEO, Albert; HANSCH, Corwin and ELKINS, David. Partition coefficients and their uses. En: *Chem. Rev.* Vol. 71, No. 6 (1971); p. 525-554.

[30]. JENNINGS, Walter. Analytical gas chromatography. San Diego: Academic Press, Inc. 1987. p. 7-9.

[31] LOUCH, Derek. MOTLAGH, Safa. PAWLISZYN, Janusz. Dynamics of organic compound extraction from water using liquid-coated fused silica fibers. *Analytical Chemistry*. 1992. 64(10). p 1187-1199.

- [32] ZHOUYAO, Zhang y JANUSZ, Pawliszyn. Headspace solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry*. 1993. 65(14). p 1843-1852.
- [33] Aldrich Fine Chemicals, catalog 1998-99. p 1356, product no. 18, 183-8.
- [34] SIDES, S. CURRO, J. GREY, G. STEVENS, M. SODDEMANN, T. HABENSCHUSS, A. LONDONO, J. Structure of poly(dimethylsiloxane) melts: theory, simulation, and experiment. *Macromolecules*. 2002, 35, p 6455-6465.
- [35] LITVINOV, V. BARTHEL, H. WEIS, J. Structure of a poly(dimethylsiloxane) layer grafted onto silica surface studied by means of DSC and solid-state NMR. *Macromolecules*. 2002, 35, p 4356-4364.
- [36] BANDONI, Arnoldo. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Editorial de la universidad nacional de La Plata. La Plata, Argentina. 2000. p 29.
- [37] VÁZQUEZ, Edgar. BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR EN LÍNEA. Comité asesor de publicaciones. Facultad de Medicina, UNAM. Instituto de Química, UNAM. <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/terpenos.html>
- [38] *STATISTICA Electronic Manual*. StatSoft, Inc. (2001). STATISTICA (data analysis software system), Version 6. www.statsoft.com.
- [39] RENCHER, ALVIN C. *Methods of Multivariate Analysis*. John Wiley & Sons. Second edition, 2002. p 380-407.
- [40] HÄRDLE, Wolfgang. SIMAR, Léopold. *Applied Multivariate Statistical Analysis*. MD*TECH-Methods and data technologies, 2003. p 233-274.

[41]. HEBERGER, Karoly. Evaluation of polarity indicators and stationary phases by principal component analysis in gas–liquid chromatography. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 1999. 47. p 41–49.

[42]. ADAMS, Robert P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Illinois: Allured Publishing Corporation. 1995. 469 p.

[43] SHAPOVALOV, V. L. Langmuir monolayers of polydimethylsiloxane with controllable surface potencial. *Thin Solid Films*. 1998. 327-329. P 816-820.

[44] ZHANG, Z. PAWLISZYN, J. Studying Activity Coefficients of Probe Solutes in Selected Liquid Polymer Coatings Using Solid Phase Microextraction. *J. Phys. Chem.* 1996. 100(44). p 17648-17654.

[45] BEREND, Smit. Computer simulations of the energetics and siting of n-alkanes in zeolitas. *J. Phys. Chem.* 1994. 98. p 8442-8452.

ANEXO 1

Tutorial para el manejo de GRANADA

A continuación se describe las instrucciones generales para el manejo del programa:

LA ENTRADA:

En un directorio predefinido para el programa se tiene un archivo nombrado *input* (sin extensión) que contiene los parámetros generales de la corrida. Los formatos de la entrada son amplios y pueden entrarse como datos numéricos separados por comas.

Primera línea:

`nlim, dimen, nconf, nfsolv, (fracm(i),i=1,nfsolv)`

- `nlim` = es el número de moléculas medioambientales o del solvente deseadas. Si se introduce como un valor negativo, se permitirá a las mismas ocupar el espacio aleatorio completo, incluyendo cavidades dentro de la molécula del soluto. Si es positivo, las moléculas del solvente rodearán externamente un elipsoide con las dimensiones de la molécula del soluto. En todos los casos, el origen de las coordenadas cartesianas del soluto se fija en el centro (medio) de sus coordenadas absolutas.
- `dimen` = es la mitad de la dimensión (en Ångstroms) sobre todos los ejes cartesianos de un cubo virtual dónde las moléculas medioambientales se distribuirá aleatoriamente. El volumen del cubo será $(2*\text{dimen})^3$. Si `dimen` es un valor negativo, el soluto será considerado como un sólido colocado a `dimen` Ångstroms debajo del plano XY escogido y una segunda línea de datos se leerá del archivo *input* con las opciones adicionales.
- `nconf` = es el número de configuraciones o geometrías aleatorias a ser generadas. Significa que los archivos de salida serán `nconf` sucesiones de celdas con las distribuciones aleatorias diferentes de las moléculas medioambientales (el implícito es 1). Si `nconf` es un valor negativo, todos los archivos de la entrada son de coordenadas internas MOPAC o de lo contrario son archivos de coordenadas cartesianas .CAR, que es el implícito.
- `nfsolv` = es el número de moléculas medioambientales diferentes a ser tenido en cuenta si no se quiere que las moléculas medioambientales sean el agua pura (el máximo es 5, y el implícito 0 para el agua).
- `fracm(i)` = es la fracción molar de la molécula medioambiental *i*. Pueden escribirse hasta `nfsolv` valores de `fracm(i)`. Estas fracciones molares sólo se refieren a las moléculas medioambientales.

Línea final:

Esta línea contiene los comandos que se requieren para el cálculo de las energías mediante el método PM3 de MOPAC.

Una vez creado el archivo input, se ejecuta el programa GRANADA mediante la siguiente secuencia de comandos.

LA LÍNEA DE COMANDOS DE GRANADA:

El programa GRANADA se opera desde MS-DOS de Windows. La línea de comandos típica es:

```
granada <molec.central>[.CAR] [<s1>[.CAR]...]
```

Donde molec.central es el nombre del archivo con las coordenadas de la molécula central o del soluto y s1 es el solvente, cuyas extensión implícita son .CAR, el cual consta de la matriz XYZ de las moléculas y los números atómicos que las componen.

ARCHIVOS .CAR

Los archivos .CAR tienen el siguiente formato:

Línea 1:

Columnas 2-4: N #Número de átomos en la entrada.

Líneas 2 y 3:

80 Columnas: #Comentarios

Línea 4 hasta la 3+N:

Para cada átomo I:

Columnas 2-11: X(I) #coordenada X en Ångstroms
Columnas 12-21: Y(I) #coordenada Y en Ångstroms
Columnas 22-31: Z(I) #coordenada Z en Ångstroms
Columnas 32-35: NAT(I) #número atómico

LA SALIDA:

La salida de Granada consiste en 5 archivos de textos cuyo nombre común es "SOLVATED" con las siguientes extensiones:

- .MOP es un archivo que contiene las coordenadas internas de las distribuciones para optimizar en MOPAC.
- .XYZ es un archivo que contiene las coordenadas cartesianas de las distribuciones para optimizar en MOPAC.
- .LOG es un archivo que contiene los detalles de la formación de cada celda.

- .CAR es el equivalente a .XYZ pero en vez de tener los símbolos atómicos se escriben los números atómicos y las coordenadas XYZ de la molécula.
- .INP este contiene los detalles implícitos generales a la generación de todas las celdas.

ANEXO 2

Tutorial para el manejo de Q3

A continuación se describe las instrucciones generales para el manejo del programa:

LA ENTRADA:

En un directorio predefinido para el programa se tiene un archivo nombrado *input.q* que contiene los parámetros generales de la corrida. Los formatos de la entrada son amplios y pueden entrarse como datos numéricos separados por comas.

Primera línea:

Título explicativo

Segunda línea:

eref, anum, temp, conv, tolind, ifile (formatos 5f15.0,a36)

- *eref*= es la energía de referencia (en eV) como suma de las energías totales de las moléculas aisladas y optimizadas con las mismas condiciones que los agregados moleculares.
- *anum*= es el número de moléculas de referencia que se usa para poder expresar los valores por mol y por molécula de referencia. Implícito: 1. Si es negativo las energías de entrada están en kcal/mol.
- *temp*= es la temperatura (en K) a la que se desean los cálculos termodinámicos. Implícito: un rango desde 298 hasta 398 K.
- *conv*= es la energía de convergencia de las entalpías molares (en eV). Implícito: $1 \cdot 10^{-3}$ eV = 0.0965 kJ/mol.
- *tolind*= es el nivel de discriminación para el coeficiente de semejanza de Tanimoto (implícito=0.85).
- *ifile*= es el nombre del fichero del tipo *.rsm* que debe estar en el subdirectorio de corrida.

Restantes líneas hasta el final:

Energías totales (en eV) de los agregados moleculares optimizados, en el mismo orden con que aparecen en el archivo *.rsm*.

LA SALIDA:

La salida de Q3 consiste en 2 archivos de texto cuyos nombres son *output.q3* y *output.dt3*. La información de los mismos es autoexplicativa en el caso del *output.q3*. El *output.dt3* contiene la misma información en forma de columnas para ser extraídas a programas de hojas de cálculo y gráficos.

ANEXO 3

SCRIPTS para los programas Swiss-PdbViewer
y Hyperchem 7.5

Script del programa Swiss-PdbViewer para cambiar el de formato *.pdb de hex 4.2. a *.pdb compatible con Hyperchem 7.5, esto se repite para cada agregado.

```
please do
```

```
open pdb from download "nombre molécula.pdb";
```

```
# ----- example of prosite pattern search -----
```

```
$SEL1 = select in "nombre molécula" all;
```

```
# ----- example of save (not in usrstuff, just for the demo) -----
```

```
if (get gCurrentOS == "SGI")
```

```
{  
    $savefilename = "directorio de salida/nombre nuevo archivo.ent";
```

```
}  
else
```

```
{  
    $savefilename =  
"directorio de salida/nombre nuevo archivo.ent ";  
}
```

```
}
```

```
select $SEL1;
```

```
save selection of "nombre molécula" as $savefilename;
```

```
$ALL = select in "nombre molécula" all;
```

```
$SEL2 = $ALL - $SEL1;
```

Script del programa Hyperchem 7.5, el cual monta todos los agregados, los optimiza y almacena los resultados. Esto se repite para cada agregado.

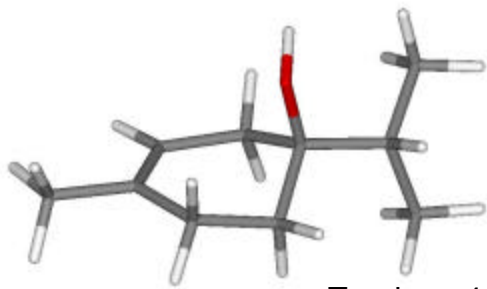
```
open-file nombre molécula entrada.mol  
calculation-method MolecularMechanics  
molecular-mechanics-method mm+  
optim-algorithm fletcherreeves  
optim-max-cycles 32767  
optim-convergence 0.001  
do-optimization
```

```
start-logging nombre molécula salida.out true  
calculation-method semiempirical  
semi-empirical-method pm3  
scf-convergence 0.001  
max-iterations 50  
excited-state false  
uhf true  
quantum-total-charge 0  
multiplicity 1  
optim-algorithm fletcherreeves  
optim-max-cycles 32767  
optim-convergence 0.01  
do-optimization
```

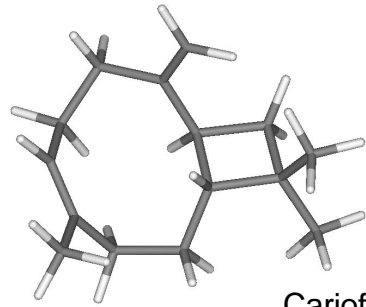
```
append-omsgs-to-file archivo de salida de los resultados.out  
message resultado #  
total-energy ?  
query-value rms-gradient  
stop-logging  
omsgs-not-to-file  
write-file nombre molécula salida.hin
```

ANEXO 4

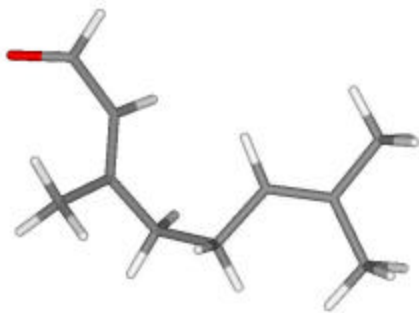
GRAFICOS MOLÉCULAS OPTIMIZADAS



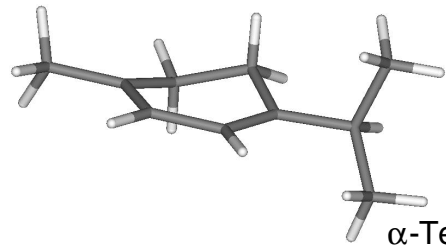
Terpinen-4-ol



Cariofileno



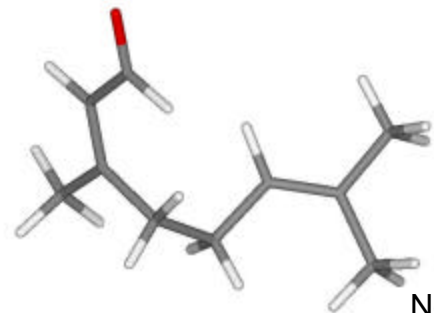
Geranial



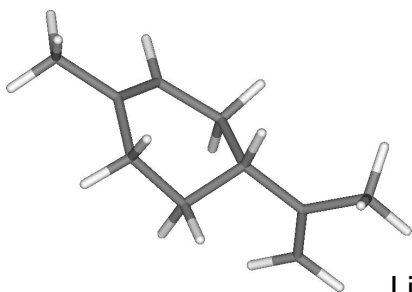
α -Terpineno



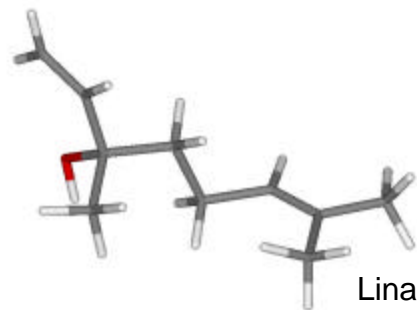
Geraniol



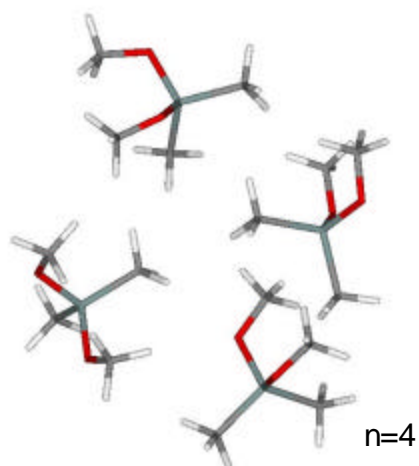
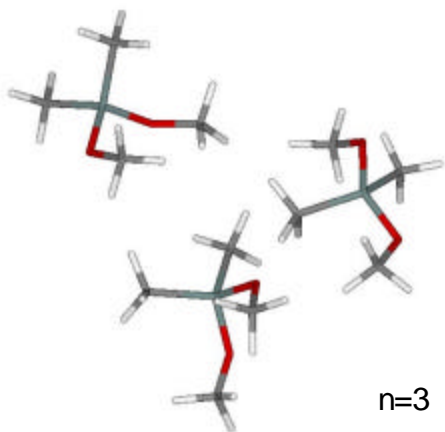
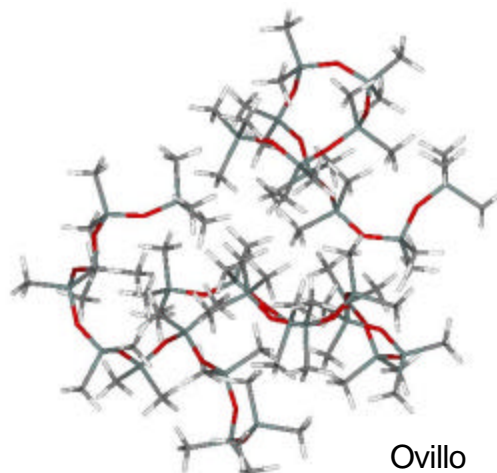
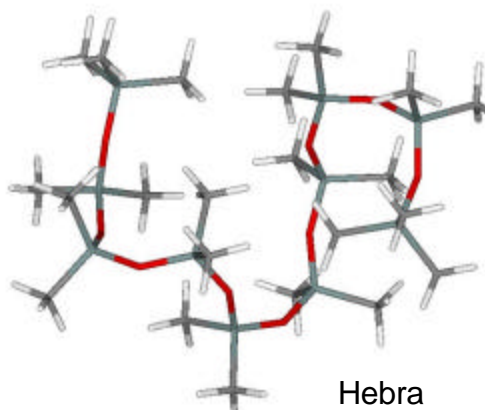
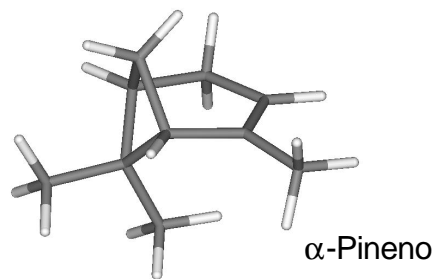
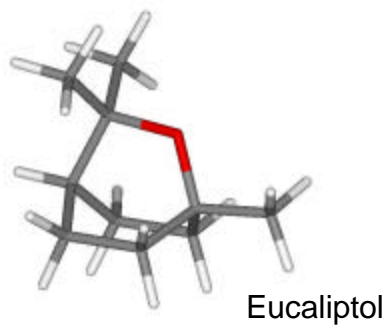
Neral



Limoneno



Linalol



ANEXO 5

Energía de los agregados para las tres metodologías (kJ/mol).

Primera metodología – MMH

Geraniol	α -Pino	Cariofileno	Eucaliptol	Geranial	Limoneno	Linalol	Neral	α -Terpineno	Terpinen-4-ol
-162528.6100	-124523.2440	-141043.1639	-162544.8691	-161809.8632	-155042.0905	-162519.4201	-161810.6097	-124535.4182	-162543.3619
-162533.3033	-124521.8198	-141043.6366	-162540.9871	-161806.5672	-155039.5128	-162519.1130	-161812.1700	-124541.5204	-162545.6679
-162530.7050	-124523.8757	-141045.6150	-162545.6814	-161813.2647	-155044.0451	-162522.6016	-161814.4126	-124537.3423	-162543.7318
-162530.0166	-124522.3442	-141042.4614	-162545.7566	-161810.3886	-155043.0224	-162522.6303	-161807.8789	-124539.9579	-162545.8837
-162524.4073	-124522.4177	-141045.6674	-162543.7016	-161810.9827	-155031.9160	-162519.6909	-161810.2463	-124538.3489	-162545.6080
-162529.1367	-124520.6269	-141047.5924	-162545.0025	-161808.6134	-155038.1407	-162521.0516	-161808.7296	-124540.4806	-162538.2293
-162537.0819	-124524.6208	-141046.7324	-162545.1991	-161815.2515	-155036.7490	-162522.2759	-161810.9432	-124537.6814	-162546.1709
-162527.9175	-124518.0068	-141041.3781	-162544.0668	-161809.4091	-155039.6664	-162520.3284	-161812.0840	-124535.8103	-162542.7484
-162532.0530	-124525.5268	-141043.8442	-162545.7285	-161812.4822	-155042.6020	-162521.7437	-161809.8845	-124542.5621	-162549.0240
-162529.9277	-124520.7018	-141043.1101	-162548.0347	-161812.9979	-155041.1403	-162526.1227	-161809.2733	-124538.2178	-162545.4388
-162530.8190	-124524.8933	-141040.8440	-162543.8280	-161814.3092	-155041.8944	-162520.4696	-161809.1945	-124535.6969	-162546.7179
-162536.1704	-124522.3200	-141048.6312	-162543.6962	-161808.4104	-155036.6191	-162524.2468	-161808.3666	-124538.8881	-162542.0778
-162540.0711	-124520.2270	-141043.5413	-162544.6611	-161807.7386	-155039.2715	-162527.0817	-161807.1105	-124543.2250	-162544.5298
-162534.1362	-124518.6652	-141043.3213	-162543.6913	-161810.1111	-155038.4282	-162521.8415	-161806.8354	-124537.3046	-162544.6559
-162536.2936	-124519.0167	-141045.3809	-162547.7738	-161807.4239	-155034.6915	-162520.1775	-161813.5726	-124539.9070	-162546.3781
-162532.0811	-124519.9302	-141042.0453	-162545.2129	-161805.5221	-155040.9730	-162521.7492	-161814.7089	-124537.6606	-162546.1027
-162524.6096	-124523.6981	-141042.5011	-162539.3234	-161809.7834	-155037.3084	-162521.7926	-161808.8421	-124535.5763	-162545.5190
-162530.8658	-124526.0386	-141044.2112	-162548.7362	-161810.1895	-155034.0903	-162521.4497	-161810.9930	-124541.6740	-162548.1302
-162529.3867	-124522.6168	-141043.0867	-162543.0931	-161805.8551	-155037.2931	-162522.8453	-161808.9624	-124537.8828	-162545.7703
-162530.3234	-124519.4651	-141043.3776	-162547.2255	-161808.6626	-155041.1584	-162526.6608	-161811.4963	-124537.6467	-162543.1063
-162532.5329	-124522.2553	-141044.5019	-162546.1517	-161810.2696	-155040.9897	-162522.6191	-161812.6559	-124533.6850	-162543.8540
-162530.5367	-124525.0374	-141044.0913	-162547.0181	-161805.1832	-155038.1087	-162517.9897	-161809.9793	-124540.8554	-162542.5820
-162529.4756	-124524.2210	-141041.2929	-162544.5015	-161811.1706	-155040.2556	-162520.8801	-161809.4373	-124536.9054	-162543.1946
-162526.8379	-124521.2474	-141043.8824	-162541.0648	-161809.6993	-155038.5861	-162521.7807	-161810.0283	-124539.6173	-162545.2516
-162532.7321	-124526.6070	-141044.1989	-162544.1824	-161810.3908	-155034.4643	-162526.7398	-161810.2596	-124537.3244	-162542.6852
-162528.7730	-124523.5030	-141048.2505	-162548.8074	-161812.1579	-155042.2900	-162522.4219	-161812.0073	-124538.2267	-162543.7336
-162529.9016	-124523.9439	-141046.9053	-162547.5063	-161806.2392	-155042.2639	-162520.2179	-161808.8343	-124539.2482	-162544.5709
-162529.1323	-124521.8095	-141039.6078	-162544.6657	-161808.7085	-155037.3936	-162523.4398	-161808.3089	-124539.7748	-162543.1113
-162532.2310	-124521.5217	-141042.7991	-162547.6029	-161808.5434	-155035.9291	-162522.5826	-161806.6599	-124535.6238	-162545.0757

-162533.7953 -124521.9234 -141042.2693 -162547.1581 -161804.0182 -155042.5586 -162522.1274 -161806.4474 -124540.1943 -162543.5768
-162533.8986 -124526.1224 -141043.6464 -162547.1537 -161810.2287 -155037.5639 -162528.9183 -161810.1895 -124537.3603 -162542.4705
-162528.6448 -124521.1266 -141042.2257 -162544.7298 -161810.6505 -155045.5551 -162522.9262 -161807.0178 -124536.9893 -162545.6207
-162530.6694 -124521.3865 -141047.3479 -162548.9486 -161808.4345 -155038.4041 -162526.1556 -161808.2184 -124537.8318 -162546.2785
-162534.5794 -124527.4043 -141045.4225 -162545.4619 -161807.1830 -155038.0182 -162523.5228 -161810.2842 -124538.2237 -162547.0938
-162534.7454 -124520.7140 -141043.4672 -162546.8932 -161806.0984 -155040.8652 -162527.9759 -161804.3825 -124539.6343 -162544.8873
-162529.7184 -124525.1304 -141046.8130 -162545.2242 -161808.6759 -155038.2909 -162520.5270 -161806.7539 -124538.0577 -162547.1314
-162532.4208 -124516.9070 -141046.0390 -162545.6496 -161809.6189 -155040.9150 -162520.4615 -161806.2029 -124534.1002 -162540.4706
-162533.0913 -124523.3999 -141043.3199 -162546.2870 -161807.7946 -155041.9672 -162520.9275 -161809.2259 -124537.9040 -162543.3109
-162534.9594 -124520.4370 -141044.4350 -162547.0431 -161809.9570 -155040.1813 -162518.6106 -161811.1743 -124538.3206 -162545.2298
-162533.4790 -124521.6742 -141042.3669 -162544.7709 -161811.3545 -155041.3294 -162522.3202 -161814.8668 -124540.0183 -162541.7086
-162531.2792 -124522.6602 -141042.7161 -162545.9257 -161810.4314 -155035.4287 -162523.1277 -161810.7902 -124536.7347 -162541.8439
-162532.1127 -124521.0386 -141039.7312 -162549.3952 -161810.0855 -155036.4356 -162523.7223 -161808.9081 -124536.1548 -162543.6378
-162530.8010 -124520.4750 -141037.6348 -162543.3129 -161812.6231 -155040.7555 -162520.4833 -161806.8026 -124540.5381 -162543.9077
-162530.2745 -124524.7637 -141041.3118 -162545.9254 -161808.1188 -155035.3806 -162521.6188 -161815.0207 -124535.8793 -162544.3108
-162530.0345 -124523.9293 -141045.0484 -162547.4183 -161812.8549 -155040.1852 -162524.5663 -161810.3965 -124539.5719 -162541.1546
-162534.2558 -124522.8753 -141041.8995 -162540.0427 -161803.8398 -155040.9741 -162523.8575 -161804.0770 -124537.0563 -162541.5981
-162528.3390 -124521.2515 -141044.2939 -162546.7584 -161812.3417 -155040.7386 -162519.0997 -161807.4796 -124535.6424 -162542.8915
-162531.5573 -124522.2067 -141043.3194 -162546.4396 -161807.3354 -155037.3155 -162524.2480 -161809.6546 -124538.5242 -162540.2239
-162534.8499 -124526.0553 -141044.2994 -162540.6065 -161811.2914 -155041.1963 -162523.7005 -161806.9421 -124537.6423 -162546.2734
-162528.6466 -124516.9712 -141040.0685 -162547.7078 -161807.6403 -155040.3605 -162521.5207 -161809.3574 -124535.1659 -162541.0090

Segunda metodología – Hebra

Neral	Geranial	Geraniol	Cariofileno	Terpinen-4-ol	α -Pino	Limoneno	Linalol	Eucaliptol	α -Terpineno
-60.2859	-61.0796	-63.9507	-17.8542	-56.6399	-11.8801	-60.6722	-60.0051	-42.4184	-58.8725
-58.6570	-59.1009	-63.4037	-17.0340	-56.9091	-12.5704	-62.8894	-61.7034	-41.9988	-60.1674
-62.1933	-62.1630	-62.8139	-17.7345	-56.1295	-11.2214	-60.8103	-60.5290	-41.3125	-58.9520
-62.5383	-60.6770	-66.1331	-19.7588	-56.5820	-13.2038	-60.3032	-61.2538	-45.2002	-58.6087
-59.7572	-61.9498	-63.8846	-17.1987	-54.5443	-13.7522	-60.2640	-60.1518	-42.5732	-59.3242
-62.1179	-58.7765	-63.4925	-19.9994	-56.1791	17.5814	-61.8926	-61.1339	-42.2367	-58.4265
-64.8155	-62.3462	-64.4150	-18.2974	-56.1114	-10.7761	-59.9909	-62.1995	-42.7047	
-61.5516	-62.3627	-65.1338	-17.5349	-54.8212	-11.1077	-61.0257	-26.2660	-42.0662	
-61.8275	-59.6510	-65.4802	-16.0999	-54.4364	-12.7171	-61.3593	-60.4101	-41.2202	
-60.1621	-59.3257	-62.1212	-17.0919	-54.9169	-11.1877	-61.1200			
-62.8530	-60.5219	-64.3556	-20.6895	-56.5966	-11.8965	-61.9326			
-59.5355	-61.1354	-63.1238	-17.2862						
-60.1735	-60.0443	-63.9921							
-60.7314	-60.5248								
-61.5635	-60.1646								
-61.7941	-60.1158								
-61.2686	-61.1589								
-62.3096									
-63.2535									

Tercera metodología - Ovillo

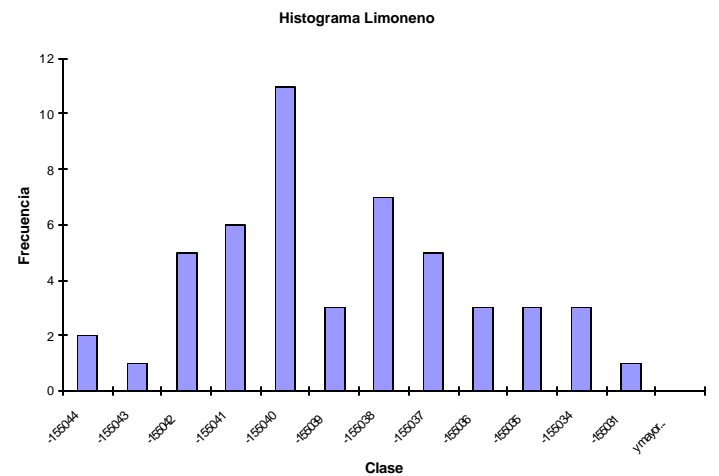
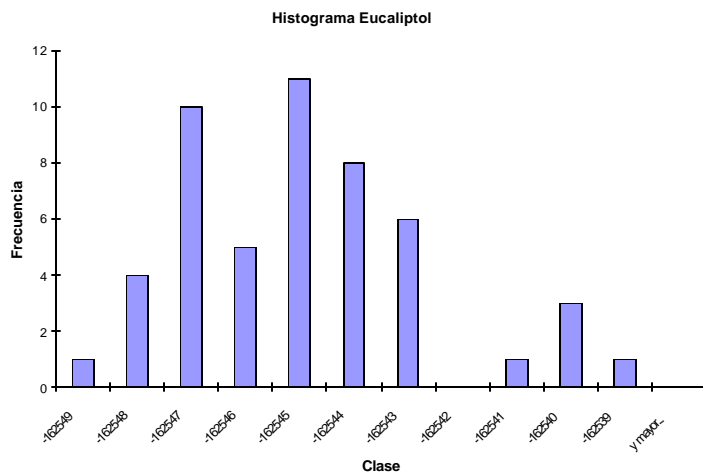
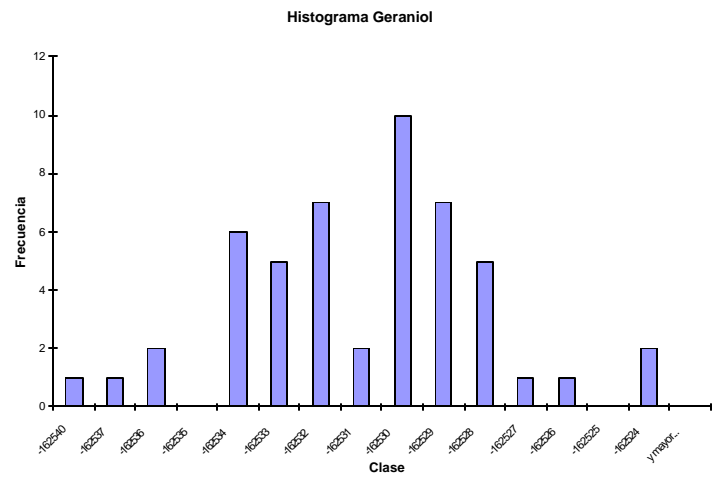
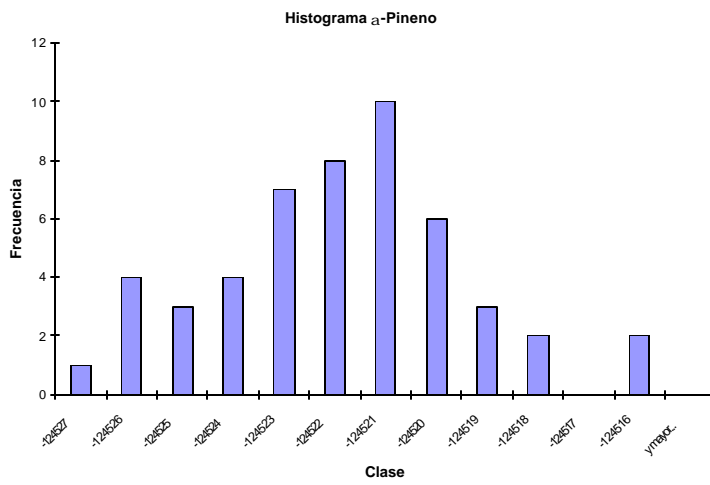
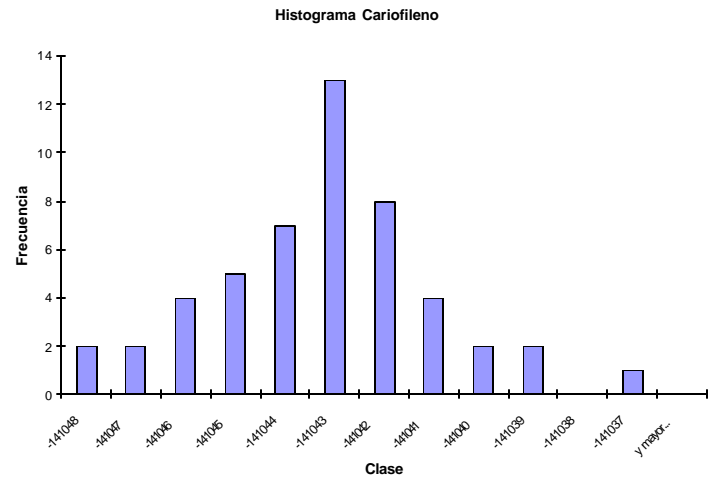
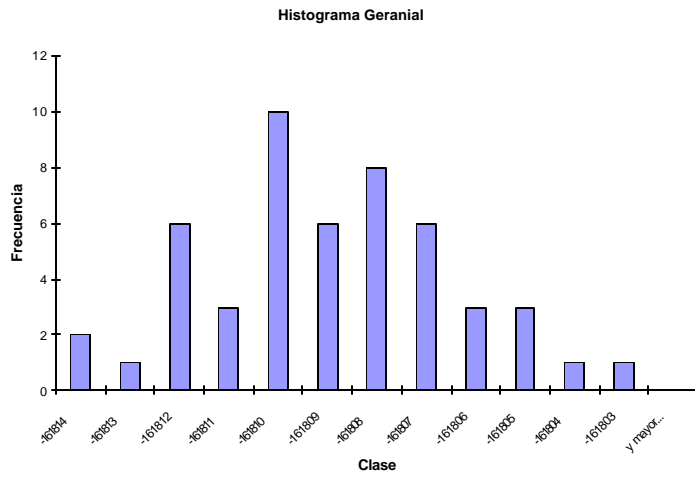
Geraniol	Cariofileno	Geranial	Limoneno	Linalol	α -Terpineno	Terpinen-4-ol	Neral	α -Pineno	Eucaliptol
-223.3398	-171.5053	-217.1745	-213.0023	-214.8340	-215.8952	-214.4279	-216.6979	-165.7357	-200.6456
-220.8925	-176.1189	-215.8276	-216.8297	-216.1493	-216.2378	-211.8334	-215.9997	-165.5554	-197.2680
-219.4394	-175.0493	-219.4029	-218.1066	-214.9090	-215.8271	-119.4237	-220.3471	-169.4889	-197.5723
-219.5833	-174.3555	-218.6598	-216.4774	-214.5089	-214.8217	-216.1431	-222.8374	-166.6922	-197.3834
-218.4215	-170.5622	-211.7002	-219.3508	-216.4755	-220.1663	-213.5007	-216.1200	-166.5922	-199.9345
-217.2941	-176.6133	-214.9700	-218.4040	-216.1282	-215.2829	-213.7598	-221.7322	-170.0300	-195.2492
-221.0564	-174.3658	-217.4386	-221.9440	-217.4814	-216.1664	-212.6550	-218.7356	-170.2338	-198.8860
-224.1994	-174.6775	-220.4483	-214.6390	-217.8534	-216.3000	-212.4968	-215.9201	-173.3661	-199.0666
-224.4310	-173.8623	-215.4377	-219.4938	-218.4809	-213.2377	-209.0293	-219.9419	-172.3401	-198.8438
-221.1810	-175.4904	-216.7299	-216.0291	-213.9173	-215.7201	-210.6680	-215.0129	-166.4232	-200.8175
-222.5749	-172.8030	-215.1012	-218.3983	-217.3058	-212.7624	-213.3170	-217.0766	-168.5678	-195.4073
-221.2817	-171.9453	-212.3859	-220.0144	-215.2028	-215.4301	-219.3204	-217.2174	-170.1310	
-225.7997	-170.5900	-219.3196	-218.1232	-217.1600	-212.6024	-212.6837	-214.1784	-167.6905	
-222.5648	-175.8741	-219.4194	-216.6747	-217.9186	-218.7829	-209.5383	-215.0156	-167.5408	
-223.0850	-170.9281	-216.4061	-224.1315	-220.0722	-213.7558	-208.6918	-218.4711		
-221.7811	-174.5217	-216.2126	-217.3241	-213.4454	-213.2149	-213.2591	-223.0604		
-218.3614	-172.5343	-212.4530	-214.7325	-215.4312	-214.2929	-204.9030	-217.6758		
-191.2959	-171.5789	-217.2201	-219.2401	-217.1634	-213.8717	-211.6315	-218.4563		
-221.6149	-174.7301	-217.4979	-215.3184	-216.6626	-218.4568	-212.2731	-213.9451		
-220.9881	-173.6835	-220.2774	-217.3657	-219.4304	-216.5281	-217.5897	-217.5095		
-221.2019	-175.0568	-221.4337	-218.9691	-219.7153	-215.8410	-213.4490	-218.2431		
-221.1382	-171.7667	-218.2429	-214.4393	-216.9053	-214.4132	-211.3916			
-226.2641	-174.3044	-214.9516	-215.9214	-217.1886	-217.1415	-208.8123			
-220.1255	-173.7207	-217.2241	-215.9189	-214.7792					
-216.5880	-172.2080	-217.9065	-215.9947						
-182.7486	-175.9674	-218.8962	-215.9459						
-220.4392	-178.8742	-217.5361							
-223.5329	-170.8453	-216.2869							

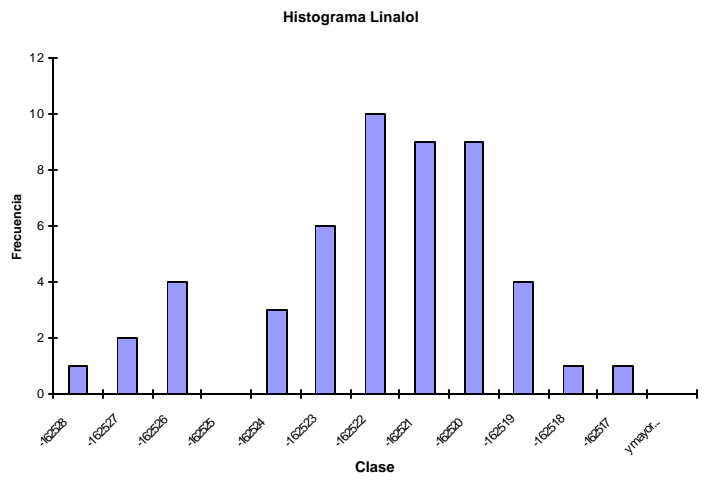
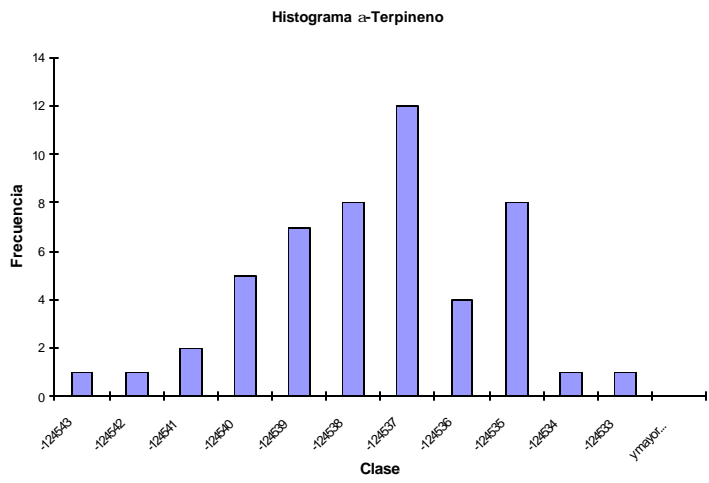
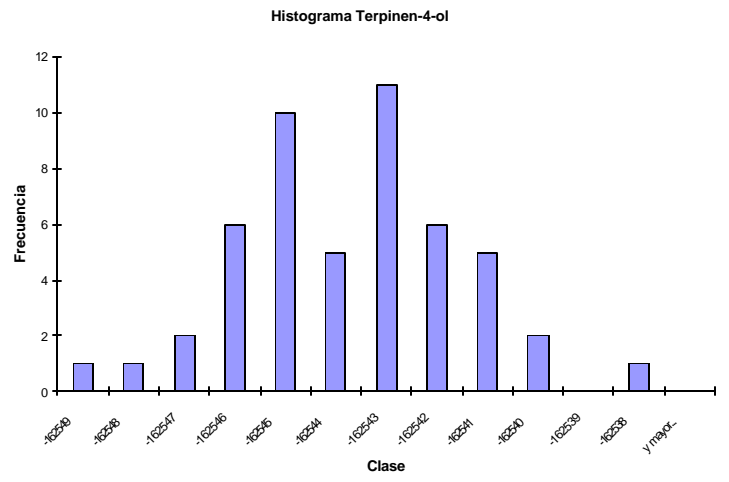
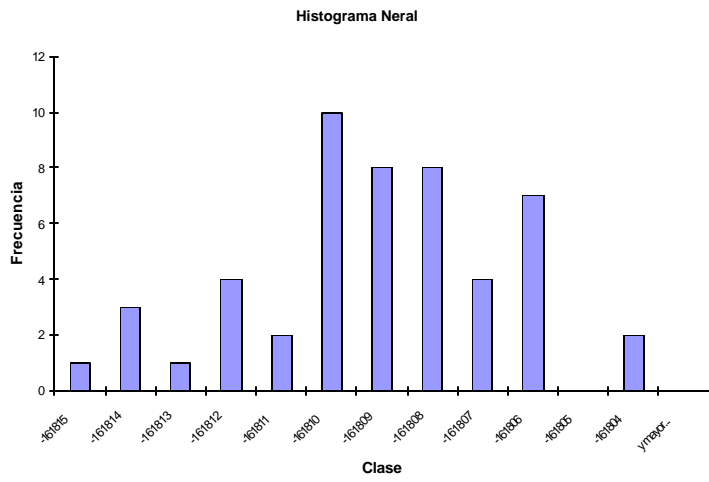
-221.3699	-175.4179	-217.7276
-226.6706	-173.9580	-217.9025
-219.0832	-171.8365	
-221.6734	-180.4517	
-224.7783		
-221.6378		
-220.1716		
-216.8976		
-223.6720		

ANEXO 6

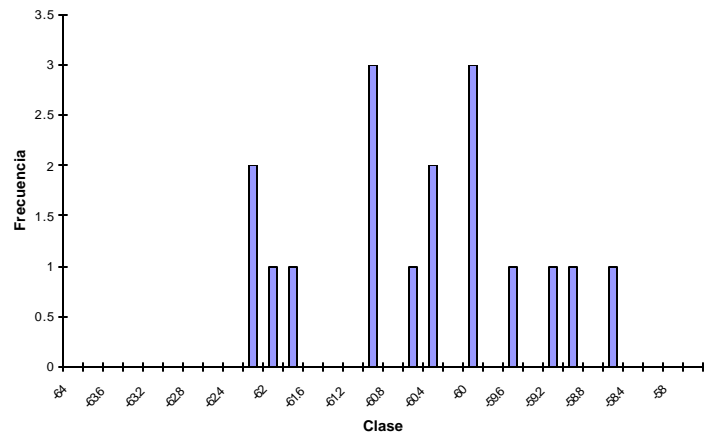
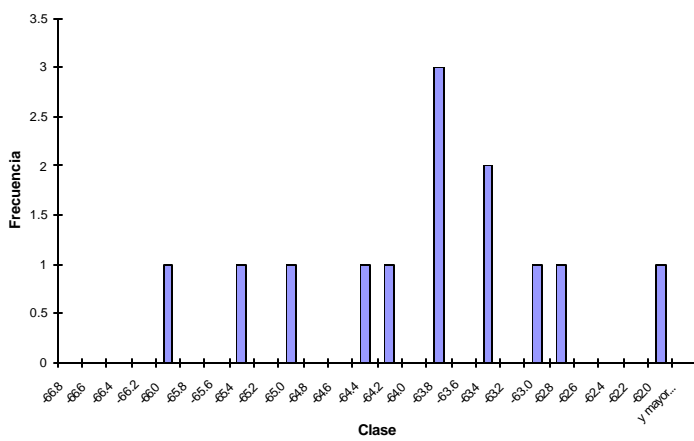
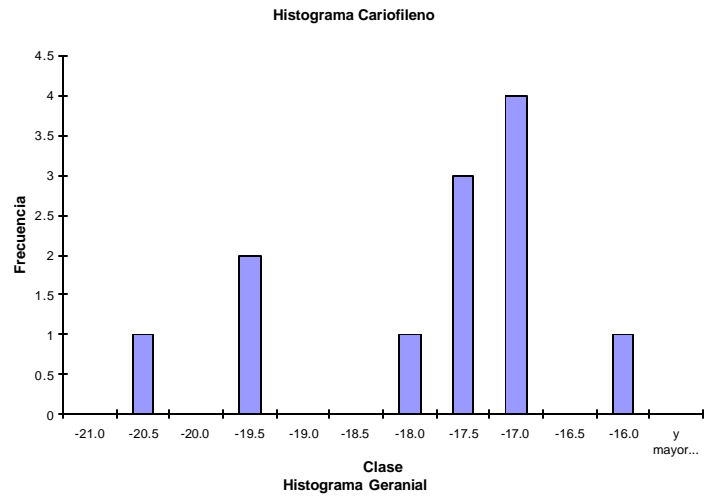
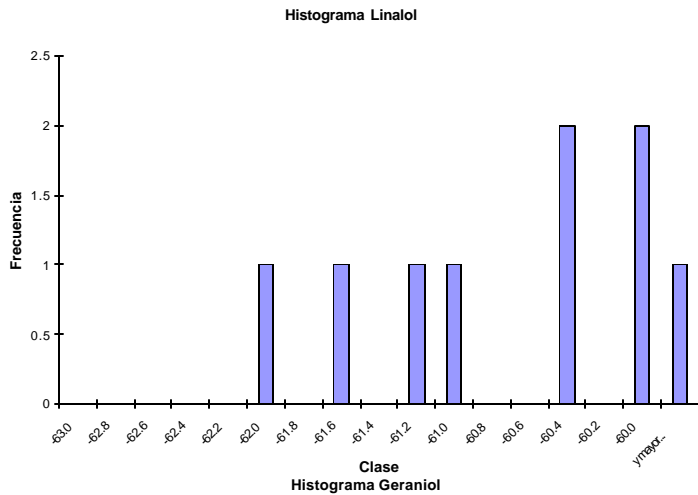
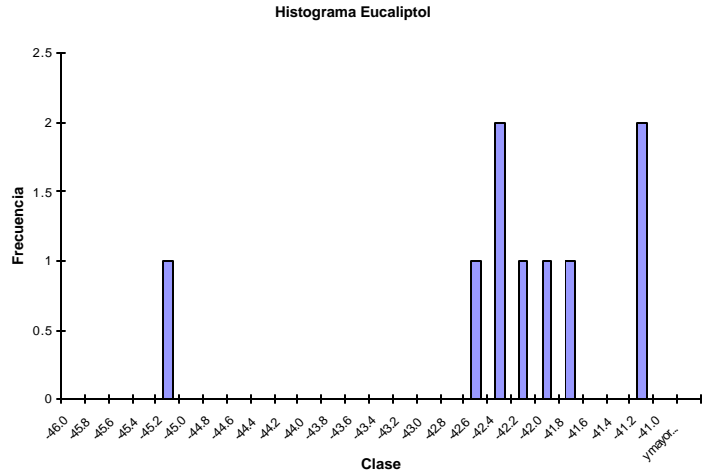
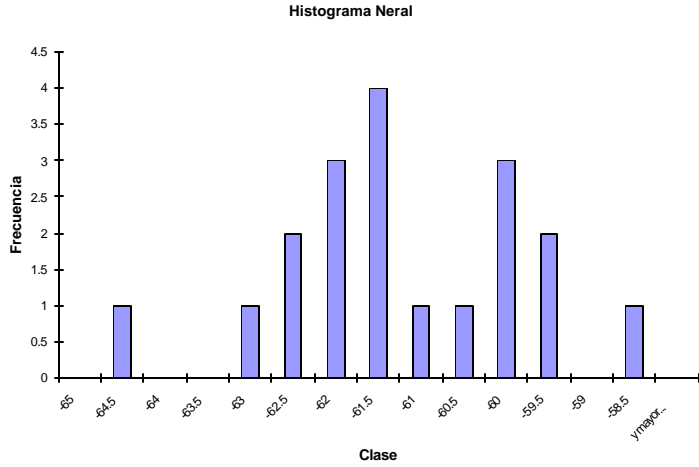
Histogramas de distribución de las energías de los agregados (kJ/mol) obtenidos por GRANADA y Hex 4.2. para la tres metodologías.

Primera metodología - MMH

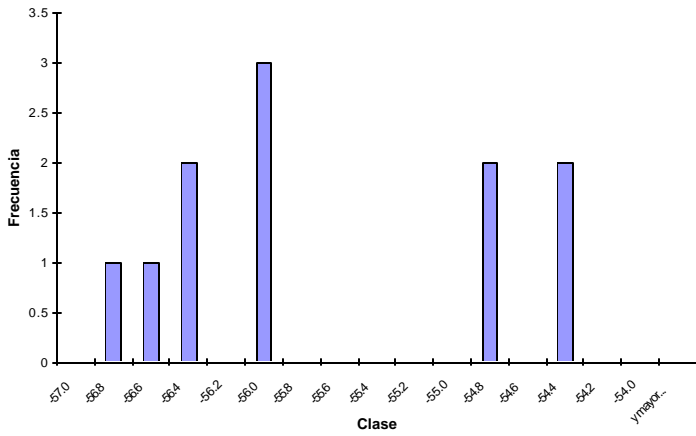




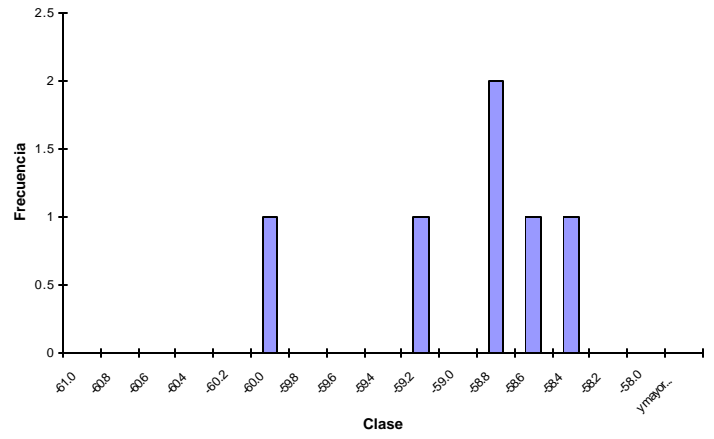
Segunda metodología - Hebra



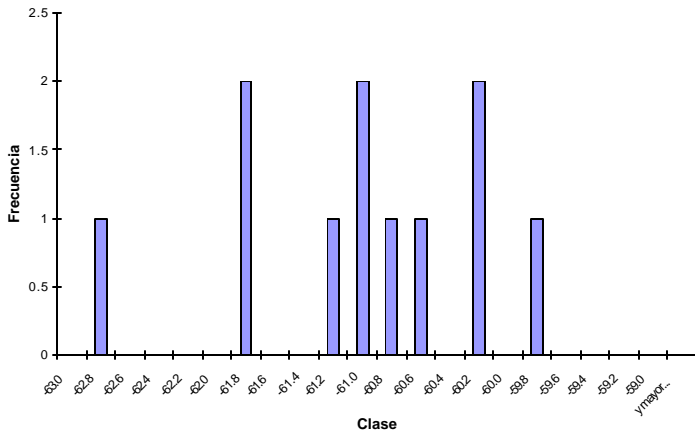
Histograma Terpinen-4-ol



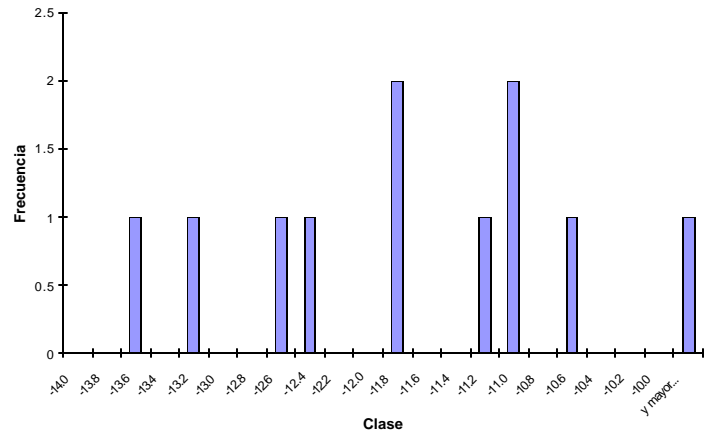
Histograma α -terpineno



Histograma Limoneno

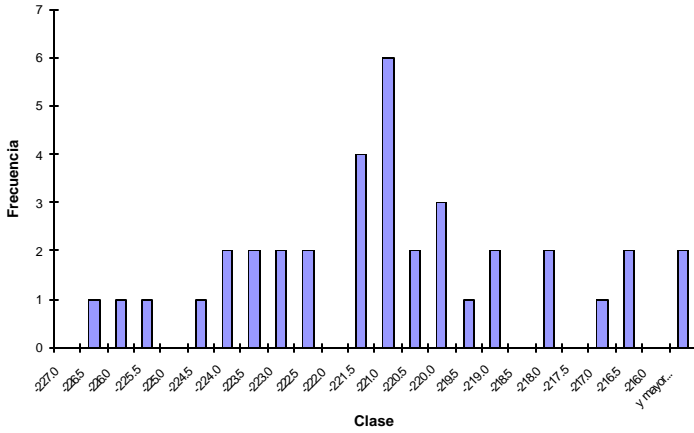


Histograma α -Pineno

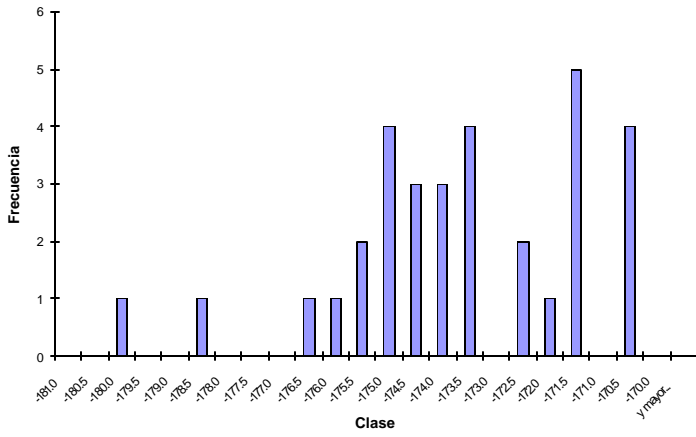


Tercera metodología - Ovillo

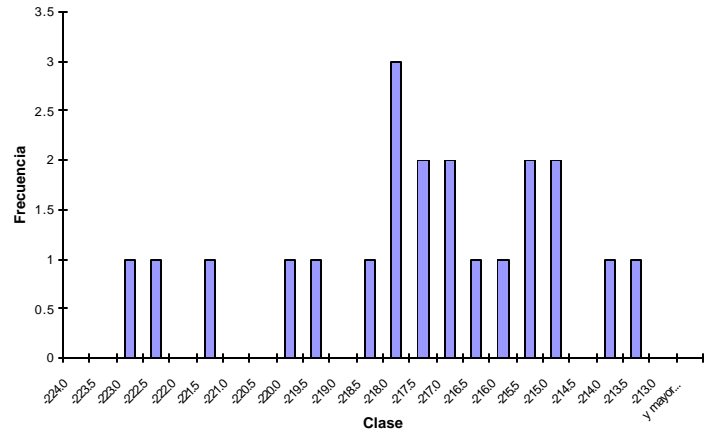
Histograma Geraniol



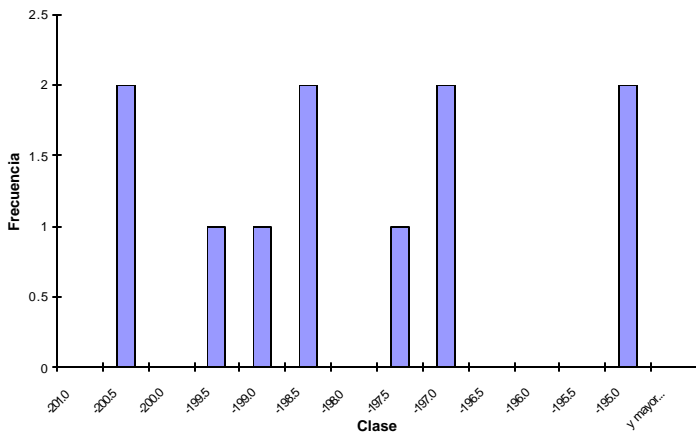
Histograma Cariofileno



Histograma Neral



Histograma Eucalipto



Histograma α -Pino

