

EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE L-CARNITINA EN AGUACATE (*Persea americana*) MEDIANTE TÉCNICAS INSTRUMENTALES Y COMPUTACIONALES

EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF L-CARNITINE
IN AVOCADO (*Persea americana*) THROUGH INSTRUMENTAL
AND COMPUTATIONAL TECHNIQUES

Pamela Carrillo S.¹ & Lorena Meneses O.¹

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

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

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue la extracción y caracterización de L-carnitina en aguacate (*Persea americana*) a través de técnicas instrumentales y computacionales. La cuantificación de L-carnitina de dos variedades de aguacate (Booth 8 y Fuerte) se realizó mediante espectrofotometría UV/Vis. Se encontró que la variedad Booth 8 tiene un contenido de 84 μg de L carnitina/gramo de fruto fresco, mientras que la Fuerte, 82 $\mu\text{g}/\text{g}$. Además, se determinó la cinética de reacción de acetilación de la L-carnitina por medio de espectrofotometría

¹ Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Escuela de Ciencias Químicas, Quito, Ecuador (pccarrillo8314@yahoo.com; lmmeneses@puce.edu.ec).

de infrarrojos. Como resultado se obtuvo una reacción de segundo orden global con una constante de velocidad de 4.45×10^{-4} L/mol·s a 298 ± 2 K. Por último, se realizó el análisis termodinámico de la reacción, se determinó el mecanismo de reacción y el análisis de reactividad y selectividad de las moléculas reactivas mediante técnicas computacionales, con el método B3LYP y el conjunto de bases 6-311G (d,p). La entalpía de reacción fue de -8.2 kcal/mol en fase gaseosa y de -4.1 kcal/mol en fase acuosa. Se estableció que la reacción de acetilación se produce por un ataque nucleofílico del hidrocloruro de L-carnitina al cloruro de acetilo, pasa por la formación de un estado de transición tetraédrico y culmina con la eliminación de ácido clorhídrico. Se determinó que la L-carnitina es una molécula nucleofílica con el oxígeno como sitio activo, mientras que el cloruro de acetilo es el electrófilo y su sitio activo es el carbono carbonílico.

ABSTRACT

The purpose of this study was the extraction and characterization of L-carnitine from avocado (*Persea americana*) with the use of computational and instrumental techniques. L-carnitine was quantified by UV/Vis spectroscopy from two avocado varieties (Fuerte and Booth 8). It was found that the Booth 8 variety contains $84 \mu\text{g}$ of L-carnitine/gram of fresh fruit, while Fuerte has $82 \mu\text{g/g}$. The kinetics of the acetylation reaction was determined with the use of infrared spectroscopy. Therefore, the reaction is second global order with a rate constant of 4.45×10^{-4} L/mol·s at 298 ± 2 K. The thermodynamic analysis of the reaction, the determination of the reaction mechanism and the analysis of the reactivity and selectivity of the reactant molecules through computational techniques with the B3LYP method and the 6-311G (d,p) basis set were executed. The reaction enthalpy in the gas phase was -8.2 kcal/mol and -4.1 kcal/mol in the aqueous phase. It was established that the acetylation reaction is produced by a nucleophilic attack of the hydrochloride L-carnitine to the acetyl chloride, going through a tetrahedral transition state which ends with the elimination of chloride acid. Also, it was determined that the L-carnitine is a nucleophilic molecule with the oxygen as the active site; the acetyl chloride, on the other hand is an electrophile with the carbonyl carbon as the active site.

INTRODUCCIÓN

La L-carnitina (butirato de 3-hidroxi-4-N-trimetilamonio) es un aminoácido trimetilado (Figura 1), sintetizado a partir de la lisina y la metionina. Posee dos estereoisómeros, su forma levo es activa biológicamente mientras que la dextro es inactiva.

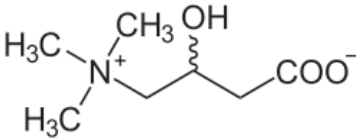


Figura 1. Estructura de la L-carnitina

La L-carnitina permite el transporte de ácidos grasos activados desde el citosol celular a la matriz mitocondrial, donde se produce la β oxidación de las grasas y la regulación de coenzima A libre y acil-coenzima A. Esto se produce cuando los ésteres de la coenzima A (CoA) de los ácidos grasos del citosol se transesterifican con la L-carnitina con la ayuda de la carnitina palmitotransferasa (Vaz & Wanders, 2002). Debido a su papel en procesos metabólicos importantes, se recomienda una dosis diaria de L-carnitina de 0.3-1.9 mg/kg de peso (Demarquoy et. al., 2004), la

cual puede ser adquirida a través de biosíntesis, ingestión en la dieta o reabsorción intestinal. Su deficiencia a largo plazo puede provocar enfermedades cardíacas, desórdenes en el crecimiento y alteraciones neuromusculares (Head, 2005). Además, puede ser usada como suplemento para el tratamiento de varias enfermedades como la anorexia, angina, isquemia e insuficiencia cardíaca.

La principal fuente de L-carnitina son los productos de origen animal, mientras que los de origen vegetal contienen bajas cantidades de L-carnitina y el de mayor contenido es el aguacate (Demarquoy et. al., 2004). La cantidad de L-carnitina en aguacate fue inicialmente determinada por medio de un ensayo enzimático (Panter & Mudd, 1969). Años después se lo realizó con un método radioisotópico (Demarquoy et. al., 2004) y en 1957 con espectrofotometría visible (Friedman, 1958). Actualmente, se han desarrollado técnicas para la determinación de L-carnitina, como cromatografía líquida de alta eficiencia con detector ultravioleta (HPLC/UV por sus siglas en inglés), espec-

troscopía de masa tándem (tándem MS) o HPLC/tándem MS, que no incluyen una determinación en aguacate (Minkler et. al., 2005).

El aguacate pertenece a la familia de las Laureáceas, género *Persea*. Su fruto es altamente nutritivo, ya que posee un alto contenido de proteínas, aminoácidos y ácidos grasos como el oléico, palmitoléico, linoléico y palmítico. Adicionalmente, es una gran fuente de vitaminas A, E, y C, y minerales como potasio, magnesio, y fósforo (Whiley et. al., 2002). El aguacate usa la L-carnitina para el mismo fin que los animales la utilizan: la β - oxidación de las grasas.

Es evidente que el mecanismo de acción en el metabolismo celular de la L-carnitina se produce por reacciones de esterificación. Por lo tanto,

una descripción de su reactividad y selectividad permitirá extraer información importante para comprender su mecanismo de reacción.

A pesar que se ha determinado la cantidad de L-carnitina en aguacate por varias técnicas (Panter & Mudd, 1969; Demarquoy et. al., 2004; Friedman, 1958), se vio la necesidad de reportar la cantidad encontrada en dos de las variedades más consumidas en el país por la técnica UV/Vis. Además, poco se ha explorado en el campo de la descripción fisicoquímica de la molécula, por lo cual el uso de técnicas computacionales e instrumentales, permitió obtener información sobre los sitios reactivos de la molécula y el mecanismo de reacción, en reacciones de esterificación si se toma como ejemplo, en este caso, la de acetilación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestra

Se tomaron dos muestras semanales por cinco semanas, de un kilogramo de dos variedades de aguacate: Booth 8 y Fuerte, en mercados y supermercados. Las muestras fueron analizadas por triplicado.

Extracción de L-carnitina

Se extrajo la L-carnitina con etanol al 95%, y se desproteinizó el extracto con soluciones de hidróxido de bario (0.3N) y sulfato de zinc heptahidratado (5% p/v). Para la purificación se usó cromatografía de columna de in-

tercambio iónico con una columna de Amberlite IRC-50 en la fase de sodio regulada a un pH de 7 (Friedman, 1958).

Cuantificación de L-carnitina

Luego de la purificación, la muestra se la secó a baño maría y posteriormente, se procedió a tratar con etanol absoluto y ácido clorhídrico concentrado (37%). Para la derivatización, se agregó una solución de bromofenol (0.075% p/v en fosfato ácido de potasio al 30%). Se lavó con dicloroetano con un 4% v/v de alcohol isoamílico y se agitó. La fase superior se trasvasó a una celda espectrofotométrica de cuarzo de 1 cm. Se preparó un blanco mediante el procedimiento descrito, pero sin muestra. Se leyó la absorbancia del blanco y de la muestra a 602 nm en un espectrofotómetro Uv-Vis Genesys 10 Vis. Finalmente, se determinó la concentración mediante una curva de calibración realizada con un estándar de L carnitina (Merck) en etanol absoluto (Friedman, 1958).

Determinación de la cinética de acetilación de L-carnitina

Se utilizó hidrocloreuro de L-carnitina 98% (Sigma-Aldrich) y cloruro de acetilo como reactivos, en un medio de ácido acético (Brendel & Bressler, 1967; Ziegler et. al., 1967). Se aplicó el método de las velocidades iniciales para la determinación de la ley de velocidad. Para esto, se ubicaron las bandas características de los reactivos, al correr los espectros infrarrojos de los estándares de los reactivos, del medio reactante y de los productos. Luego, se procedió a realizar curvas de calibración de los reactivos en ácido acético.

Se prepararon varias soluciones de los reactivos en ácido acético glacial, para seguir el método de aislamiento para la determinación de la velocidad inicial (Ecuación 1). Para determinar el orden de reacción del cloruro de acetilo, se mantuvo constante la concentración de hidrocloreuro de L-carnitina (1.0M) y se prepararon cuatro soluciones de cloruro de acetilo en un rango de concentración de 2.81 a 5.77M. En la determinación del orden de reacción del hidrocloreuro de L-carnitina, se

mantuvo constante la concentración de cloruro de acetilo (2.81M) y se prepararon cuatro soluciones de hidrocloreto de L-carnitina en concentraciones de 0.00253 a 0.00506M. Se obtuvieron los órdenes de reacción para cada reactivo por el método gráfico descrito en la Ecuación 2 y la constante de velocidad de la reacción de acuerdo con la Ecuación 3 (Atkins & De Paula, 2010).

$$v_0 = \frac{d[A]}{dt} = \frac{\Delta[A]}{\Delta t} \quad (1)$$

$$\log v_0 = \log k + a \log[A]_0 \quad (2)$$

$$kt = \frac{1}{[B]_0 - [A]_0} \ln \frac{[A]_0([B]_0 - x)}{[B]_0([A]_0 - x)} \quad (3)$$

Modelamiento computacional

Se utilizó el software Gaussian03 (Frisch et. al., 2004) con el cual se optimizaron las geometrías moleculares, se calcularon las energías de single point y los valores de las energías de los orbitales moleculares de frontera. Para la optimización se usó el método B3LYP y la base 6-311G (d,p). Para las estructuras más estables se obtuvo la energía de single point con el método HF y base 6-31G. Con este método, se obtuvieron las energías de los orbitales moleculares de

frontera, para el cálculo de los índices de reactividad como son la nucleofilia a partir de la Ecuación 4 y la electrofilia con la Ecuación 5.

$$N_{(Nu)} = \epsilon_{HOMO(Nu)}(eV) - \epsilon_{LUMO(TCE)}(eV) \quad (4)$$

donde $\epsilon_{HOMO(Nu)}$ es el valor de la energía del orbital HOMO del nucleófilo y $\epsilon_{LUMO(TCE)}$, el valor para el HOMO del tetracianoetileno (TCE) (Domingo et. al., 2008).

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} \quad (5)$$

donde potencial químico es representado por μ y la dureza química por η (Parr et. al., 1999).

Para el estudio de selectividad se usó el comando #SP IOP(3/31=1) SCF=TIGHT POP=FULL, para obtener las funciones de Fukui para la determinación de los índices de nucleofilia y electrofilia locales por medio de las Ecuaciones 6 y 7. Se repitió el procedimiento para la reacción en fase acuosa con el comando SCRF=(solvent=water).

$$\omega = \omega f_k^+ \quad (6)$$

$$N_k = N f_k^- \quad (7)$$

donde f_k^+ es la función electrofílica de Fukui y, f_k^- la función nucleofílica, ω , la electrofilia y N, nucleofilia (Domingo et. al. 2002; Pérez et. al., 2008).

Se realizó el análisis termodinámico en fase gaseosa y acuosa, con el cálculo de la entalpía de la reacción (Δ_rH) por medio de la Ecuación (8) (Atkins & De Paula, 2010):

$$\Delta_rH = \sum \Delta H_{\text{productos}} - \sum \Delta H_{\text{reactivos}} \quad (8)$$

or último, se encontró el estado de transición para la acetilación de L-carnitina, con las mismas especificaciones antes mencionadas y la

inclusión del keyword TS y el comando freq para el cálculo de frecuencias. Al encontrar una frecuencia imaginaria, se determina si se ha encontrado un estado de transición. Se realizó un IRC (coordinada intrínseca de reacción) del estado de transición, para asegurar que se ha encontrado el estado de transición para la reacción estudiada. Se determinó la Energía de Activación (E_a) mediante la diferencia de las energías entre el estado de transición y los reactivos (Ecuación 9) (Atkins & De Paula, 2010):

$$E_a = E_{\text{estado de transición}} - E_{\text{reactivos}} \quad (9)$$

RESULTADOS

Cuantificación de L-carnitina

La L-carnitina cuantificada mediante espectrofotometría UV/Vis fue de 82 $\mu\text{g/g}$ de fruto fresco para la variedad Fuerte, mientras que para la variedad Booth 8 fue de 84 $\mu\text{g/g}$. La precisión fue medida a través de la desviación estándar relativa (sr), al comparar con el valor obtenido mediante métodos radioisotópicos, que reporta un contenido de 81 $\mu\text{g/g}$ (Demarquoy

et. al., 2004). Para la variedad Fuerte la sr fue del 3.0%, mientras que para la de Booth 8 fue de 2.8%.

Determinación de la cinética de reacción de acetilación

Para la determinación de la concentración de los reactivos, se escogieron las siguientes bandas: cloruro de acetilo 1807.02 cm^{-1} , hidrocloreto de L-carnitina 3472.03 cm^{-1} . Se calcularon las velocidades iniciales a

las distintas concentraciones molares y se graficaron sus logaritmos de base 10 (Figuras 2 y 3), para obtener los órdenes de reacción para cada reactivo a partir de la pendiente de la gráfica.

Para cada uno de los reactivos se obtuvo un orden de reacción de uno, la reacción es de orden global dos, con una ley de velocidad definida por:

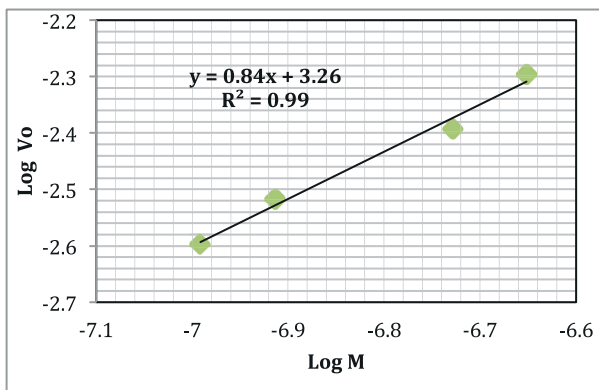
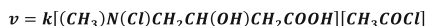


Figura 2. Determinación del orden de reacción para el hidrocloreto de L carnitina

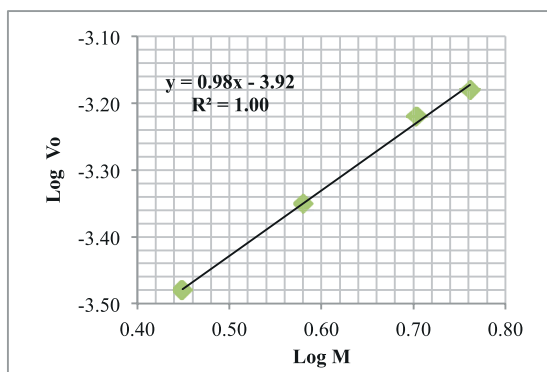


Figura 3. Determinación del orden de reacción para el cloruro de acetilo

Adicionalmente, se calculó la constante de velocidad con la Ecuación 3,

al promediar todos los valores logrados para las diferentes concentracio-

nes de los reactivos, se obtuvo una constante de 4.45×10^{-4} L/mol·s a 298 ± 2 K.

Modelamiento computacional

Al analizar la geometría de la L-carnitina, se pudo confirmar que existen dos conformaciones espaciales (Rosas-García, 1997): una plegada y otra extendida, que se pueden observar en la Tabla 1, con su respectiva energía.

Se obtuvieron los índices de reactividad de las dos conformaciones espaciales, a través de las Ecuaciones 4 y 5, para la nucleofilia y electrofilia, respectivamente.

La L-carnitina de conformación plegada tiene una nucleofilia de 3.4728 eV, mientras que la extendida de 3.4753 eV. Además, la electrofilia de la conformación plegada es de 0.1806 eV y de la extendida es de 0.2495 eV.

Adicionalmente, se calcularon los índices de selectividad de la L-carnitina de conformación plegada con las Ecuaciones 6 y 7, para la electrofilia y nucleofilia locales, respectivamente y se obtuvieron los resultados que se presentan en la Tabla 2.

Tabla 1. Energías para las conformaciones espaciales de la L-carnitina

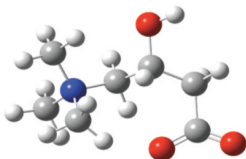
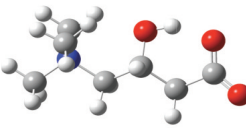
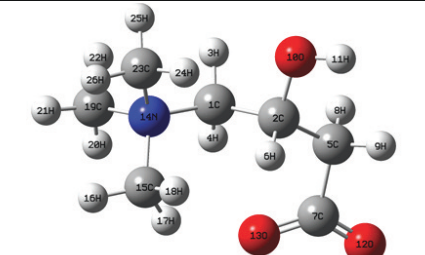
Tipo	Estructura	Energía (kcal)
Plegada		-346716.2
Extendida		-346714.7

Tabla 2. Índices de selectividad para la conformación plegada de la L-carnitina



Átomo número	Nucleofilia Local (eV)	Electrofilia Local (ω_k)(eV)
1 C	0.0076	0.1102
12 O	1.5982	0.0002
13 O	1.8600	0.0002
14 N	0.0000	0.0816

Para el estudio termodinámico de la reacción se realizó un análisis comparativo de las moléculas en fase gaseosa y acuosa (Tabla 3).

Tabla 3. Energías de reactivos y productos de la reacción de acetilación del hidrocloreuro de L-carnitina en fase gaseosa y acuosa

Reactivos	
Hidrocloreuro de L carnitina	Cloruro de acetilo
Fase Gaseosa: -638294.2 kcal	Fase Gaseosa: -384987.6 kcal
Fase Acuosa: -638332.4 kcal	Fase Acuosa: -384993.0 kcal
Productos	
Hidrocloreuro de acetil-O-L-carnitina	Ácido clorhídrico
Fase gaseosa: -734114.4 kcal	Fase gaseosa: -289177.6 kcal
Fase acuosa: -734146.3 kcal	Fase acuosa: -289183.1 kcal

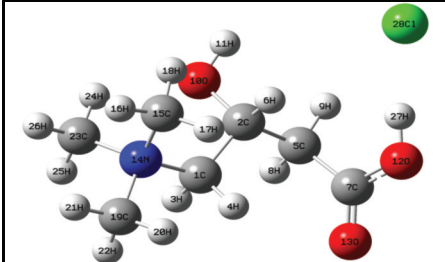
Se calcularon las entalpías de reacción en los dos medios mediante la Ecuación 8 con los datos de la Tabla 3. En fase gaseosa, la reacción tiene una entalpía de -8.2 kcal/mol y en fase acuosa de -4.1 kcal/mol.

Finalmente, se analizaron la reactividad y la selectividad de las moléculas que participan en la reacción de acetilación: hidrocloreuro de L-carnitina y cloruro de acetilo (Tablas 4, 5 y 6).

Tabla 4. Índices de reactividad para el hidrocloreuro de L-carnitina y el cloruro de acetilo

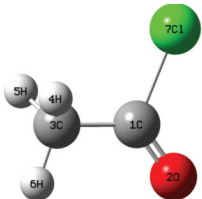
		Fase gaseosa	Fase acuosa
Hidrocloreuro de L-carnitina	Nucleofilia (N) (eV)	0.0325	0.0165
Cloruro de acetilo	Electrofilia (ω) (eV)	0.6676	0.6661

Tabla 5. Nucleofilia local para el hidrocloreuro de L-carnitina



Átomo número	Nucleofilia Local (medio gaseoso) (N_k) (eV)	Nucleofilia Local (medio acuoso) (N_k) (eV)
5 C	3.249E-06	6.584E-06
10 O	2.599E-05	0.000
12 O	3.899E-05	6.584E-06
15 C	1.560E-04	0.000
18 Cl	3.209E-02	1.644E-02

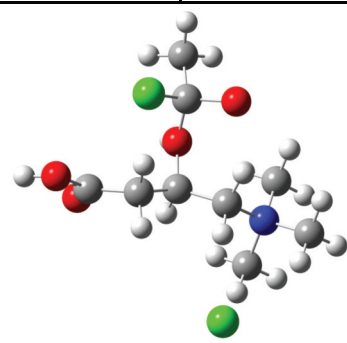
Tabla 6. Electrofilia local para el cloruro de acetilo

		
Átomo número	Nucleofilia Local (medio gaseoso) (N_L) (eV)	Nucleofilia Local (medio acuoso) (N_L) (eV)
1 C	0.3519	0.3511

Se encontró el estado de transición de la reacción en fase gaseosa y acuosa

y se estableció la energía de activación mediante la Ec. 9 (Tabla 7).

Tabla 7. Estructura y energía del estado de transición de la reacción de acetilación en fase gaseosa y acuosa

Fase	Gaseosa	Acuosa
Estructura		
Energía	-1023165.3 Kcal	-1023210.7 Kcal
Energía de activación	118.5 kcal/mol	114.8 kcal/mol

DISCUSIÓN

Extracción y cuantificación de L-carnitina

Es necesaria la desprotenización del extracto alcohólico debido a su alto contenido de histidina (25mg/100g de fruto fresco) (Calabrese, 1992), que produce un complejo coloreado de la misma intensidad que la L-carnitina lo hace con el azul de bromofenol (Friedman, 1958). Adicionalmente, existen otras dos interferencias: la colina y la betaína. La colina se elimina por medio de una columna Amberlite IRC-50 amortiguada a un pH7, donde se da adsorción de la L-carnitina y eliminación de la colina. Para la betaína, se debe respetar y mantener la adición de los reactivos de derivatización (Friedman, 1958).

El complejo coloreado formado entre la L-carnitina y el azul de bromofenol para la medición colorimétrica, se produce cuando el azul de bromofenol actúa como un apareador de iones (el-Ashry, et al., 1994) y la L-carnitina como una sustancia nucleofílica. Juntos forman un ión complejo par, que es extraíble con un solvente no polar.

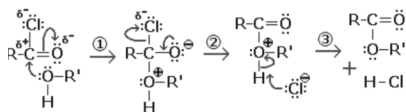
Las diferencias existentes entre los datos obtenidos para la cantidad de L-carnitina en las dos variedades de aguacate con el valor tabulado, se pueden explicar por el tipo de aguacate usado, además de errores inherentes al proceso analítico de carácter aleatorio y sistemático.

Determinación de la cinética de reacción de acetilación de L-carnitina

Una de las dificultades para la acetilación de la L-carnitina es su insolubilidad, por lo cual se requiere siempre de un exceso de agente acilante, el cloruro de acetilo (Brendel & Bressler, 1967). La reactividad del ácido acético es menor comparada a la del cloruro de acetilo. En el cloruro de acetilo, el grupo saliente es el ión cloruro que es una base extremadamente débil, lo cual lo hace un excelente grupo saliente (Strack & Lorenz, 1966). Debido a la mayor polaridad del ácido acético, es el solvente más adecuado para la reacción.

Con respecto a la ley de velocidad de acetilación, el orden de reacción para ambos reactivos es de uno. El re-

sultado concuerda con la reacción de esterificación que usa un cloruro de acetilo y un alcohol (Gennadii, et. al., 2006). También, de acuerdo con el mecanismo de reacción de esterificación propuesto (Esquema 1), los dos reactivos son de orden uno. Se produce un primer paso donde se forma un estado de transición tetraédrico, que es seguido por la eliminación del protón y del ion cloro y por un reordenamiento de los electrones del carbono carbonílico (Brown, 2011; Solomons & Fryhle, 2008).



Esquema 1. Mecanismo de esterificación

Además, no existen estudios comparables para validar el valor de la velocidad de reacción. La misma depende de mecanismos de reacción, polaridad, naturaleza del solvente, temperatura, entre otros factores.

Modelamiento computacional

La estructura espacial más estable de la L-carnitina en fase gaseosa es la pliegada, debido a la atracción cou-

lombica entre el grupo carboxílico negativo y el grupo amino positivo. Esta configuración disminuye el efecto estérico entre los dos grupos funcionales por lo cual es una molécula altamente nucleofílica.

Hay dos lugares que exhiben el mayor valor de electrofilia: los átomos 14N y 1C. El átomo 14N posee una deficiencia de electrones al compartir sus electrones con cuatro carbonos adyacentes. Mientras que el átomo 1C se ve polarizado debido a la existencia de grupos polares a sus extremos. Esta regioselectividad también influye en los lugares de la molécula en donde se concentra la carga, así, en el sitio donde se da la mayor electrofilia, la molécula tiene carga positiva, mientras donde posee la mayor nucleofilia, una carga negativa.

A pesar que en la mayoría de reacciones no se producen diferencias notables entre las reacciones en fase gaseosa y en solución, estas existen si el medio en el cual ocurren experimentalmente es en solución (Moore & Pearson, 1981). Así, las propiedades del solvente son importantes al determinar las energías de los reacti-

vos y productos (Carey & Sundberg, 2007). Las diferencias existentes entre los dos medios de reacción de acetilación se deben a las distintas interacciones. En fase acuosa se debe tomar en cuenta la existencia de fuerzas intermoleculares, mientras que las moléculas que se encuentran en fase gaseosa están en una región de baja energía potencial, como resultado de la baja fuerza de atracción que las moléculas adyacentes producen en ellas. Al analizar las energías de las moléculas participantes de la reacción de acetilación, se puede ver que son más estables en fase acuosa que en gaseosa. Se puede asumir que en solución, las moléculas tienden a estabilizarse debido a las interacciones con el solvente, principalmente, electrostáticas.

Al referirnos a la Tabla 4, se puede observar que en fase acuosa, la nucleofilia del hidrocloreto de L-carnitina disminuye en un 50%, ya que el agua es un solvente polar prótico, que experimenta puentes de hidrógeno con el soluto, por lo cual disminuye la habilidad de donar electrones (Brown, 2011). Al contrario, el cloruro de acetilo usado es un ligando neutro que posee un bajo

nivel de solvatación, por lo cual el efecto que posee el solvente sobre su reactividad es mínimo.

Al analizar la selectividad de la L-carnitina en la Tabla 5, se ve que la mayor nucleofilia se localiza en el átomo de cloro, mas este no forma parte de la molécula debido a que no está unido al esqueleto mediante un enlace químico. Se puede ver que la mayor cantidad de nucleofilia en fase gaseosa se ubica en el átomo 15C, debido a que se encuentra ligado al nitrógeno que es altamente electrófilo, lo cual provoca un fenómeno de polarización. A pesar que este carbono es equivalente al 23 y al 19, el mayor valor de nucleofilia se produce por la menor distancia de enlace entre 15C y 14N. Al analizar el átomo 10O, el participante en la reacción de acetilación, se observa que posee un carácter nucleofílico moderado, debido a la estabilización que le provee el hidrógeno.

En el caso del cloruro de acetilo, se observa en la Tabla 6, que el átomo 1C es el receptor del ataque nucleofílico por lo cual exhibe los mayores valores de electrofilia en los dos medios de reacción. Hay una baja disminu-

ción en la electrofilia local en medio acuoso con respecto al gaseoso.

El mecanismo de esterificación comienza con el ataque nucleofílico al carbono carbonílico; aquí, el nucleófilo posee un par de electrones desapareados en un átomo de oxígeno neutro que corresponde al oxígeno del grupo oxidrilo del hidrocloreto de L-carnitina. En el complejo activado ocurre una rápida transición de protón (H^+) al O^- , por lo cual el carbono carbonílico cambia su hibridación de sp^2 a sp^3 y adopta una configuración tetraédrica momentánea (Brown, 2011). El ataque se favorece por la facilidad estérica del carbono carbonílico y la habilidad del oxígeno carbonílico de reacom-

odar un par de sus electrones ubicados en el enlace doble del carbono-oxígeno. Seguido de esto, se produce la eliminación del ácido clorhídrico, que regenera el doble enlace entre el carbono carbonílico y el oxígeno, y da como resultado un producto de sustitución, el hidrocloreto de acetil O-L-carnitina.

La energía de activación encontrada para la reacción de acetilación en fase gaseosa, es mayor en aproximadamente 4 kcal/mol con relación a la fase acuosa. Esta diferencia concuerda con la estabilización del estado de transición por parte del solvente, principalmente por interacciones electrostáticas.

CONCLUSIONES

Se cuantificó L-carnitina en dos variedades de aguacate, con valores de 84 $\mu\text{g/g}$ para la variedad Booth 8 y 82 $\mu\text{g/g}$ para la Fuerte. El contenido de L-carnitina puede depender de la variedad de aguacate.

La L-carnitina es una molécula nucleofílica que participa en reaccio-

nes de esterificación en el metabolismo de las grasas del aguacate.

La reacción de acetilación del hidrocloreto de L-carnitina con cloruro de acetilo es de orden dos, uno para cada reactivo, con una constante de velocidad a $298 \pm 2\text{K}$ de 4.45×10^{-4} L/mol·s.

Los sitios reactivos tanto del hidrocloreuro de L-carnitina como del cloruro de acetilo coinciden con el conocimiento químico de este tipo de moléculas y está de acuerdo con el mecanismo propuesto para las reacciones de acetilación.

Las entalpías de acetilación calculadas para el hidrocloreuro de L-carnitina en fase gaseosa y acuosa son

–8.2 kcal/mol –4.1 kcal/mol, respectivamente.

Se determinó que la energía de activación de la acetilación del hidrocloreuro de L-carnitina es de 118.5 kcal/mol en fase gaseosa y 114.7 kcal/mol en fase acuosa, al tener como estado de transición una estructura tetraédrica.

LITERATURA CITADA

- Atkins, P. & De Paula, J. (2010). *Physical Chemistry*. (9a.ed.). New York, USA.
- Brendel, K. & Bressler, R. (1967). The Resolution of (\pm)-Carnitine and the Synthesis of Acylcarnitines. *Biochimica et Biophysica Acta*, 137, 98-106.
- Brown, D., Revision Notes PART 10. Summary of organic reaction mechanisms. A mechanistic introduction to organic chemistry and explanations of different types of organic reactions, <http://www.docbrown.info/page06/OrgMechs3.htm#esterification>, 28 de agosto de 2011.
- Calabrese, F. (1992). *El Aguacate*. Madrid, España.
- Carey, F. & Sundberg, R. (2007). *Advanced Organic Chemistry: Structure and mechanisms*. (5a.ed.). New York, USA.
- Demarquoy, J., Georges, B., Rigault, C., Royer, M.C., Clairet, A., Soty, M., Lekounougou, S. & Le Borgne, F. (2004). Radioisotopic determination of L-carnitine content in foods commonly eaten in western countries. *Food Chemistry*, 86, 137-142.
- Domingo, L., Aurell, M., Pérez, P. & Contreras, R. (2002). Quantitative Characterization of the Local Electrophilicity of Organic Molecules. Understanding the Regioselectivity on Diels Alder Reactions. *Journal of Physical Chemistry*, 106 (29), 6871-6875.
- Domingo, L., Chamorro, E. & Pérez, P. (2008). Understanding the Reactivity of Captodative Ethylenes in Polar Cycloaddition Reactions. A Theoretical Study. *Journal of Organic Chemistry*, 73, 4615-4624.
- el-Ashry, SM., Aly, FA. & el-Brashy, AM. (1994). Studies of complex formation between the bromophenol blue and some important aminoquinoline antimalarials. *Archives of Pharmaceutical Research*, 17 (6), 415-419.
- Friedman, S. (1958). Determination of Carnitine in Biological Materials. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 75, 24-30.
- Frisch, M., et al. (2004). Revision D.01, Gaussian Inc., Wallingford CT, USA.
- Gennadii G.E., Kozlov, G.V. & Makitra, R.G. (2006). *Theoretical and prac-*

- tical guide to organic physical chemistry*. New York. USA.
- Head, K. (2005). L-carnitine monograph. *Alternative Medicine Review*, 10 (1), 42-50.
- Minkler, P.E., Ingalls, S.T. & Hoppel C.L. (2005). Strategy for the Isolation, Derivatization, Chromatography Separation, and Detection of Carnitine and Acylcarnitine. *Analytical Chemistry*, 77 (5), 1448-1457.
- Moore, J.W. & Pearson, R.G. (1981). *Kinetics and Mechanism*. (3a.ed.). New York, USA.
- Panter, R.A. & Mudd J.B. (1969). Carnitine Levels in Some Higher Plants. *Febs Letters*, 5 (3), 169-170.
- Parr, R.G., Szentpály, L.v. & Liu, S. (1999). Electrophilicity Index. *Journal of the American Chemical Society*, 121 (9), 1922-1924.
- Pérez, P., Domingo, L.R., Duque-Noreña, M.R. & Chamorro, E. (2008). A condensed-to-atom nucleophilicity index. An application to the director effects on the electrophilic substitutions. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 895, 86-91.
- Rosas-García, V.M. (1997). Towards the Design of Carnitine Acyltransferase
- Inhibitors: Modeling the Conformational Behavior of (R)-Carnitine, (R)-Acetylcarnitine, Morpholinium rings, and 2-Oxo-1,3,6-dioxaphosphacinium rings, Disertación de Doctorado en Química, Virginia Polytechnic Institute and State University, USA.
- Solomons, G. & Fryhle, C. B. (2008). *Organic Chemistry*. (9a.ed.). New Jersey, USA.
- Strack, E. & Lorenz, I. (1966). Zur Darstellung von O-Acyl-Derivaten des Carnitins. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 343, 341-349.
- Vaz, F.M. & Wanders, R.J.A. (2002). Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochemistry Journal*, 361, 417-429.
- Whiley, A.W., Schaffer, B., Schaffer, A. & Wolstenholme, N. (2002). *The avocado: botany production and uses*. Cambridge, Inglaterra.
- Ziegler, H.J., Bruckerman, P. & Binon, D.F. (1967). O-Acylation of dl-Carnitine Chloride. *Journal of Organic Chemistry*, 32 (12), 98-106.

