

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

---



---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
CHIHUAHUA**

**EVALUACIÓN TEÓRICA Y EXPERIMENTAL DE LAS PROPIEDADES  
FISICO-QUÍMICAS DE LOS PIGMENTOS NATIVOS Y  
LIPOFILIZADOS DE LA *HIBISCUS SABDARIFFA* L.**

**POR:**

**M.C. ANA SELENE MÁRQUEZ RODRÍGUEZ**

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE**

**DOCTORADO EN CIENCIAS**

**CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO**

**DICIEMBRE DE 2020.**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
CHIHUAHUA

Chihuahua, Chih., a 7 de diciembre 2020.

Oficio: 72/CA/SIP/20

**Dr. Ildebrando Pérez Reyes**  
**Secretario de Investigación y Posgrado**  
**Facultad de Ciencias Químicas**  
**Universidad Autónoma de Chihuahua**  
**Presente:**

Los integrantes del comité, informamos a Usted que efectuamos la revisión de la tesis intitulada: **Evaluación teórica y experimental de las propiedades físico-químicas de los pigmentos nativos y lipofilizados de la *Hibiscus sabdariffa* L.**, presentada por la **M.C. Ana Selene Márquez Rodríguez**, alumna del Programa de Doctorado de Ciencias.

Después de la revisión, indicamos a la tesista las correcciones que eran necesarias efectuar y habiéndolas realizado, manifestamos que la tesis, de la cual adjuntamos un ejemplar, ha cumplido con los objetivos señalados por el Comité de Tesis, por lo que puede ser considerada como adecuada para que se proceda con los trámites para la presentación de su Examen de Grado.

**Atentamente**  
**"Por la ciencia para bien del hombre"**

**Dra. María Elena Fuentes Montero**  
**Co-directora de tesis**

**Dra. María de Lourdes Ballinas Casarrubias**  
**Asesora de tesis**

**Dra. Nora Aydeé Sánchez Bojorge**  
**Asesora de tesis**

**Dra. Erika Salas Muñoz**  
**Directora de tesis**

**Dr. Ildebrando Pérez Reyes**  
**Secretario de Investigación y Posgrado**

\*\*\*El que suscribe certifica que las firmas que aparecen en esta acta, son auténticas, y las mismas que utilizan los C. Profesores mencionados.



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
Circuito Universitario  
Campus Universitario #2 C.P. 31125  
Tel. +52 (614) 236 6000  
Chihuahua, Chihuahua, México  
<http://www.fcq.uach.mx>

## AGRADECIMIENTOS

*Gracias:*

*A mi familia por todo el apoyo al iniciar este proyecto y por el soporte de siempre.*

*A mis compañeros y amigos, que se han vuelto una segunda familia, por todo su apoyo, por su compañía y el tiempo compartido.*

*A todos los maestros que me dieron su atinada guía durante este proyecto y toda mi carrera.*

*A la Facultad de Ciencias Químicas y a la Universidad Autónoma de Chihuahua por la oportunidad que me dieron de seguir desarrollandome profesional y académicamente en estos cuatro años.*

*A la Faculdade de Ciências da Universidade do Porto y sus integrantes tan especiales, por recibirme, darme el apoyo y la guía para realizar parte de mi trabajo experimental.*

*A CONACyT por el apoyo para el desarrollo de este proyecto.*

*A todos aquellos que han contribuido de una u otra manera en mi desarrollo personal y profesional.*

## **DEDICATORIA**

*A todos aquellos que creyeron en mi y me han apoyado siempre.*





## ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>I</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>II</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>III</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>VII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>XII</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XIX</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>3</b>
<b>POLIFENOLES</b> .....	<b>3</b>
No Flavonoides .....	4
Flavonoides.....	4
<b>ANTOCIANOS</b> .....	<b>4</b>
Propiedades de color de los antocianos.....	6
Saltos de pH.....	7
Equilibrio termodinámico .....	7
Procesos cinéticos .....	8
Procedimiento para determinar la velocidad y las constantes de equilibrio.....	9
<b>APLICACIÓN DE LOS ANTOCIANOS</b> .....	<b>10</b>
<b>LIPOFILIZACIÓN DE ANTOCIANOS</b> .....	<b>10</b>
Lipofilización química de antocianos.....	11
Lipofilización enzimática de antocianos .....	11
<b>LIPASAS</b> .....	<b>12</b>
Lipasa B de <i>Candida antarctica</i> .....	13
Lipofilicidad .....	15



<b>FLOR DE JAMAICA (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)</b> .....	<b>16</b>
Polifenoles de la flor de jamaica.....	18
Minerales en la flor de jamaica.....	20
Aplicaciones y beneficios de la flor de jamaica .....	20
<b>TÉCNICAS ANALÍTICAS</b> .....	<b>21</b>
<b>CROMATOGRAFÍA</b> .....	<b>21</b>
Cromatografía sólido-líquido .....	22
Fase normal.....	22
Fase inversa .....	22
Fraccionamiento con LiChroprep RP-18® .....	22
Extracción de fase sólida .....	22
Fraccionamiento con C18 Sep-Pak® .....	23
Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	23
Cromatografía de ultra alta resolución .....	24
Cromatografía de capa fina.....	24
Cromatografía líquido-líquido .....	25
Cromatografía de contracorriente .....	25
<b>MÉTODOS DE DETECCIÓN Y ANÁLISIS ESTRUCTURAL</b> .....	<b>25</b>
Espectrometría UV-Vis .....	25
Espectrometría de masas .....	26
Resonancia Magnética Nuclear .....	27
<b>ABSORTIVIDAD MOLAR</b> .....	<b>28</b>
<b>QUÍMICA <i>IN SILICO</i></b> .....	<b>34</b>
Métodos semi-empíricos .....	34
Métodos ab initio .....	35
Métodos basados en la Teoría de Hartree-Fock .....	35
Cálculos basados en la Teoría de los Funcionales de la Densidad .....	35
Estudios teóricos realizados a polifenoles.....	36
<b>DOCKING MOLECULAR</b> .....	<b>39</b>
Algoritmos de búsqueda.....	39
Las funciones de puntuación.....	40
<b>DOCKING Y DINÁMICA MOLECULAR EN <i>CaIB</i></b> .....	<b>41</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>45</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>46</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>46</b>
OBJETIVOS PARTICULARES.....	46



<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>47</b>
<b>MATERIALES Y EQUIPOS</b> .....	<b>47</b>
Reactivos .....	47
Equipos y software.....	47
<b>MÉTODOS</b> .....	<b>48</b>
<b>METODOLOGÍA TEÓRICA</b> .....	<b>48</b>
Validación.....	48
Modelación de antocianos.....	49
Reactividad local.....	49
Estados excitados.....	50
Docking rígido .....	52
<b>METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b> .....	<b>53</b>
Extracción .....	53
Cuantificación de antocianos .....	53
Fraccionamiento por extracción de fase sólida .....	53
Fraccionamiento por cromatografía batch.....	54
Lipofilización de la delphinidina 3-O-sambubiósido en tert-butanol.....	55
Lipofilización de la delphinidina 3-O-sambubiósido en 2-metil-2 butanol .....	55
Extracción líquido-líquido .....	56
Cromatografía de capa fina.....	56
Cromatografía flash.....	56
Cromatografía de baja presión.....	57
Análisis en cromatografía de alta resolución.....	57
Perfil fenólico del extracto de jamaica .....	58
Análisis en cromatografía de alta resolución acoplado a espectrometría de masas .....	59
Espectrómetro LCQ.....	59
Espectrómetro LCQ DECA XP MAX.....	59
Absortividad molar $\epsilon$ .....	60
Cinética química.....	61
Resonancia magnética nuclear .....	61
Lipofilicidad .....	62
Parámetros termodinámicos o saltos de pH.....	62
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>64</b>
<b>RESULTADOS TEÓRICOS</b> .....	<b>64</b>
Validación.....	64
Reactividad local.....	65
Modelación de antocianos.....	65
Estados excitados.....	68
Nivel de teoría TD-DFT:B3LYP/6-31++G(d,p).....	68
Nivel de teoría TD-DFT:M06/6-31++G(d,p).....	71



Nivel de teoría DFT:M062X/6-31++G(d,p).....	72
Orbitales moleculares.....	74
Conclusiones del análisis <i>In Silico</i> .....	76
Docking rígido .....	77
Docking ciego .....	77
Docking en sitio uno .....	79
Docking en sitio dos.....	81
Conclusiones del acoplamiento molecular (docking).....	83
<b>RESULTADOS EXPERIMENTALES .....</b>	<b>84</b>
Extracción .....	84
Contenido de antocianos.....	85
Fraccionamiento por extracción de fase sólida .....	86
Conclusiones de fraccionamiento de antocianos .....	89
Lipofilización enzimática de antocianos .....	89
Lipofilización de delphinidina 3-O-sambubiósido con ácido hexanóico en tert-butanol.....	89
Lipofilización de delphinidina 3-O-sambubiósido con ácido octanóico en 2-metil-2-butanol.....	93
Conclusiones de la lipofilización de delphinidina 3-O-sambubiósido .....	99
Separación y purificación de los productos de lipofilización.....	100
Extracción líquido-líquido .....	100
Cromatografía de capa fina.....	100
Purificación del éster delphinidina 3-O-sambubiósido-C8.....	101
Cromatografía de baja presión.....	102
Conclusiones de separación y purificación del éster de delphinidina 3-O-sambubiósido-C8.....	103
Resonancia Magnética nuclear .....	104
Conclusiones de Resonancia Magnética Nuclear .....	106
Lipofilicidad .....	106
Conclusión de lipofilicidad .....	106
Saltos de pH.....	107
Transferencia de protón.....	107
Hidratación y tautomerización .....	107
Isomerización cis-trans. ....	109
Constante de equilibrio ( $K'_a$ ) y constante de pseudo-equilibrio ( $K^{\wedge}_a$ ).....	109
Constante de acidez $K_a$ .....	110
Constante de hidratación $K_h$ .....	111
Distribución de la fracción molar.....	112
Conclusiones de las propiedades termodinámicas.....	113
Absortividad molar $\epsilon$ .....	114
Conclusiones de coeficiente de absorptividad.....	116
Cinética química.....	117
Orden de reacción en base a los equivalentes de malvidina 3-O-glucósido.....	119
Orden de reacción en base a los equivalentes cianidina 3-O-glucósido.....	121
Orden de reacción en base a equivalentes de delphinidina 3-O-sambubiósido. .	124
Conclusiones de la cinética química.....	127



<b>CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	<b>129</b>
<b>CONCLUSIONES TEÓRICAS</b> .....	<b>129</b>
<b>CONCLUSIONES EXPERIMENTALES</b> .....	<b>130</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>131</b>
<b>APÉNDICE DE ENTREGABLES</b> .....	<b>I</b>
<b>Artículo publicado en la revista Molecules</b> .....	<b>I</b>
<b>Presentación oral en el XXIXth International Conference on Polyphenols and 9th Tannin Conference</b> .....	<b>II</b>
<b>Capítulo de libro Advances in Anthocyanin Research 2018</b> .....	<b>III</b>
<b>Presentación oral en el 1st International Food Research Workshop in the Chihuahua Desert Region of North America</b> .....	<b>IV</b>
<b>Artículo publicado en la revista Food Chemistry</b> .....	<b>V</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición proximal de la flor de jamaica ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> L) variedad Criolla de México. Adaptado de Sáyago-Ayerdi <i>et al.</i> (2014).....	18
Tabla 2. Contenido de polifenoles totales en la flor de jamaica ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> L) variedad Criolla de México. Adaptado de Sáyago-Ayerdi <i>et al.</i> (2007).....	19
Tabla 3. Parámetros del acoplamiento molecular rígido entre la lipasa B de <i>Candida antarctica</i> y los antocianos delfinidina 3-O-sambubiósido y malvidina 3-O-glucósido. ....	52
Tabla 4. Gradiente de elución para análisis en HPLC Agilent 1100 series.....	58
Tabla 5. Gradiente de elución para HPLC Hitachi L-7100.....	59
Tabla 6. Distancias interatómicas experimentales* (Ueno, 1977) y teóricas de diferentes metodologías para la aglicona Cianidina. ....	64
Tabla 7. Longitud de onda de absorción vertical ( $\lambda$ ), fuerza del oscilador ( $f$ ) y las principales transiciones electrónicas para la delfinidina 3-O-sambubiósido, calculados con el nivel de teoría DFT:B3LYP/6:31++G(d,p). ....	69



Tabla 8. Longitud de onda de absorción vertical ( $\lambda$ ), fuerza del oscilador ( $f$ ) y las principales transiciones electrónicas para la delfinidina 3-O-sambubiósido, calculados con el nivel de teoría DFT:M06/6:31++G(d,p).....	71
Tabla 9. Longitud de onda de absorción vertical ( $\lambda$ ), fuerza del oscilador ( $f$ ) y las principales transiciones electrónicas para la delfinidina 3-O-sambubiósido, calculados con el nivel de teoría DFT:M06-2X/6:31++G(d,p). ....	73
Tabla 10. Datos de Resonancia Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de la mezcla ésteres de antocianos DpS-C8 y DpG-C8 en DMSO- <i>d</i> 6/TFA (9:1).....	105
Tabla 11. Constantes de equilibrio obtenidas por espectroscopia UV-vis para la delfinidina 3-O-sambubiósido y la delfinidina 3-O-sambubiósido en agua y en SDS. ....	112
Tabla 12. Términos independientes y dependientes de la Ecuación 9. ....	115
Tabla 13. Concentraciones en la reacción de lipofilización a diferentes tiempos, empleando curvas de calibración y método absoluto. ....	118
Tabla 14. Coeficientes de correlación y constantes para las diferentes cinéticas de reacción, empleando la curva de calibración de la malvidina 3-O-glucósido.....	121
Tabla 15. Coeficientes de correlación y constantes para las diferentes cinéticas de reacción, empleando la curva de calibración de la cianidina 3-O-glucósido.....	124
Tabla 16. Coeficientes de correlación y constantes para las diferentes cinéticas de reacción, empleando el coeficiente de absorptividad molar de la delfinidina 3-O-sambubiósido.....	127

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura base de los flavonoides, 2-fenil-benzopirona. ....	4
Figura 2. Estructura de los principales antocianos. ....	5
Figura 3. Equilibrio químico de la de delfinidina 3-O-sambubiósido en solución acuosa a diferente pH. ....	6
Figura 4. Etapas de la transesterificación de flavonoides (De Oliveira et al., 2009). .	14

Figura 5. Estructuras de la A) delfinidina 3-O-sambubiósido y la B) cianidina 3-O-sambubiósido.....	20
Figura 6. Diagrama de la metodología teórica.....	51
Figura 7. Reactividad teórica local de la delfinidina 3-O-sambubiósido.....	65
Figura 8. Espectrometría de masas Full-scan (+) ESI del monoéster E1(a), di-éster E2 (b) y monoéster E3 (c). ....	67
Figura 9. Estructuras finales de la delfinidina 3-O-sambubiósido y los ésteres de antocianos obtenidos por lipofilización química.....	67
Figura 10. Espectro de absorción de la delfinidina 3-O-sambubiósido calculado con el nivel de teoría DFT:B3LYP/6:31++G(d,p): (a) mono-éster E1, (b) di-éster E2, (c) mono-éster E3 (Los insertos muestran la comparación del espectro de absorción UV-vis experimental entre la delfinidina 3-O-sambubiósido y el E1 (a), E2 (b) y E3(c)).....	70
Figura 11. Espectro de absorción de la delfinidina 3-O-sambubiósido calculado con el nivel de teoría DFT:M06/6:31++G(d,p): (a) mono-éster E1, (b) di-éster E2, (c) mono-éster E3 (Los insertos muestran la comparación del espectro de absorción UV-vis experimental entre la delfinidina 3-O-sambubiósido y el E1 (a), E2 (b) y E3(c)).....	72
Figura 12. Espectro de absorción de la delfinidina 3-O-sambubiósido calculado con el nivel de teoría DFT:M06-2X/6:31++G(d,p): (a) mono-éster E1, (b) di-éster E2, (c) mono-éster E3 (Los insertos muestran la comparación del espectro de absorción UV-vis experimental entre la delfinidina 3-O-sambubiósido y el E1 (a), E2 (b) y E3(c)). .	74
Figura 13. Orbitales moleculares y diferencia energética entre HOMO-LUMO a un nivel de teoría de DFT:B3LYP/6-31++G(d,p) para la delfinidina 3-O-sambubiósido y los ésteres E1, E2 y E3.....	76
Figura 14. Representación de la lipasa B de <i>Candida antarctica</i> y el sitio catalítico encerrado en azul, imagen obtenida de Protein Data Bank 4K6G (Xie et al. 2014). .	78
Figura 15. Esquema del docking ciego entre la malvidina 3-O-glucósido y la CalB. .	78
Figura 16. Esquema del docking ciego entre la delfinidina 3-O-sambubiósido y la CalB. ....	79
Figura 17. Esquema del docking entre la malvidina 3-O-glucósido y la CalB en el sitio uno.....	80
Figura 18. Esquema del docking entre la delfinidina 3-O-sambubiósido y la CalB en el sitio uno. ....	81

Figura 19. Esquema del docking entre la malvidina 3-O-glucósido y la CalB en el sitio dos.....	82
Figura 20. Esquema del docking entre la delphinidina 3-O-sambubiósido y la CalB en el sitio dos.....	82
Figura 21. Perfil polifenólico del extracto hidro-alcohólico de la flor de jamaica, con algunos de sus principales compuestos: ácido clorogénico (1), delphinidina 3-O-sambubiósido (2) y cianidina 3-O-sambubiósido (3). Los insertos muestran el barrido espectral UV-vis del ácido clorogénico (a) y de los antocianos (b).....	85
Figura 22. Curva de calibración de la delphinidina 3-O-sambubiósido.....	86
Figura 23. Extracción de fase sólida del extracto de flor de jamaica, delphinidina 3-O-sambubiósido (F2) y cianidina 3-O-sambubiósido (F3). ....	87
Figura 24. Cromatograma de la fracción 2 (F2), delphinidina 3-O-sambubiósido, obtenida del extracto de flor de jamaica y aislada por SPE.....	88
Figura 25. Cromatograma de la fracción 3 (F3), cianidina 3-O-sambubiósido, obtenida del extracto de flor de jamaica y aislada por SPE.....	88
Figura 26. Cromatograma en tiempo cero (T0) de la reacción de lipofilización de delphinidina 3-O-sambubiósido con ácido hexanóico en tert-butanol.....	90
Figura 27. Espectro de masa ESI + en el tiempo cero (T0) de la reacción de lipofilización de delphinidina 3-O-sambubiósido con ácido hexanóico en tert-butanol..	90
Figura 28. Cromatograma a las tres horas (T3) de la reacción de lipofilización de la delphinidina 3-O-sambubiósido con ácido hexanóico en tert-butanol.....	91
Figura 29. Espectro de masa ESI + del pico a los 24 min a las 3 h (T3) de la reacción de lipofilización de la delphinidina 3-O-sambubiósido con ácido octanóico en tert-butanol. ....	92
Figura 30. Cromatograma a las 27 h (T27) de la reacción de lipofilización de la delphinidina 3-O-sambubiósido con ácido octanóico en tert-butanol.....	93
Figura 31. Espectrograma de masas de la reacción de lipofilización de delphinidina 3-O-sambubiósido con ácido octanóico en 2-metil-2-butanol. ....	95
Figura 32. Cromatograma HPLC en columna C18 de la reacción de lipofilización de la delphinidina 3-O-sambubiósido a 535 nm. ....	95
Figura 33. Espectros de absorción de a) la delphinidina 3-O-glucósido y b) el éster de delphinidina 3-O-glucósido-C8.....	97
Figura 34. Espectros de absorción de a) la delphinidina 3-O-sambubiósido y b) el éster de delphinidina 3-O-sambubiósido-C8.....	97





Figura 35. Cromatograma HPLC en columna C18 de la reacción de lipofilización de la delfinidina 3-O-sambubiósido con contraíón formato a 532 nm a las 16 h de reacción. ....	99
Figura 36. Cromatografía de capa fina de la fase hexanóica y la fase metanóica de la reacción de lipofilización de delfinidina 3-O-sambubiósido.....	100
Figura 37. Evolución en la separación de la delfinidina 3-O-sambubiosido y su producto de lipofilización: la delfinidina 3-O-sambubiósido-C8. A) HCl (0.1 M)- metanol (0.1 M de HCl) 80:20 (v/v); b) HCl (0.1 M)- metanol (0.1 M de HCl) 40:60 (v/v). ....	101
Figura 38. Cromatograma de éster delfinidina 3-O-sambubiósido-C8 purificado a 532 nm. Inserto: espectro de aborsión de la delfinidina 3-O-sambubiósido-C8.....	102
Figura 39. Purificación de los productos de lipofilización por cromatografía de baja presión.....	103
Figura 40. Coeficiente de partición de la delfinidina 3-O-sambubiósido (A) y la delfinidina 3-O-sambubiósido-C8 (B) en una mezcla bifásica de octanol-agua (HCl 0.1M). ....	106
Figura 41. (A) Variaciones espectrales del éster DpS-C8 (0.1 mM) en SDS 0.1 M en función del pH en el pseudo-equilibrio, $pK_a=5.83$ . Inserto: Ajuste de la absorbancia a 540 y 600 nm como función del pH. (B) Variaciones e espectrales del éster DpS-C8 (0.1 mM) en SDS 0.1 M en función del pH en el equilibrio el equilibrio final, $pK_a=5.82$ . Inserto: Ajuste de la absorbancia a 540 y 600 nm como función del pH. ....	110
Figura 42. Distribución de la fracción molar en función del pH de (A) DpS 0.1 mM en SDS 0.1 M; (B) DpS-C8 0.1 mM en SDS 0.1 M.....	113
Figura 43. Gráfico y ecuación de la recta de la absorbancia de la calibración de delfinidina 3-O-sambubiósido a diferentes concentraciones, bajo condiciones constantes de flujo.....	116
Figura 44. Esquema simplificado de las reacciones de lipofilización de delfinidina 3-O-sambubiósido y cianidina 3-O-sambubiósido.....	118
Figura 45. Cinética de reacción de orden cero para lipofilización (equivalentes de malvidina 3-O-glucósido).....	119
Figura 46. Cinética de reacción de primer orden para lipofilización (equivalentes de malvidina 3-O-glucósido).....	120
Figura 47. Cinética de reacción de segundo orden para lipofilización (equivalentes de malvidina 3-O-glucósido).....	120



Figura 48. Cinética de reacción de orden cero para lipofilización (equivalentes de cianidina 3-O-glucósido).....	122
Figura 49. Cinética de reacción de primer orden para lipofilización (equivalentes de cianidina 3-O-glucósido).....	123
Figura 50. Cinética de reacción de segundo orden para lipofilización (equivalentes de cianidina 3-O-glucósido).....	124
Figura 51. Cinética de reacción de orden cero para lipofilización (equivalentes de delfinidina 3-O-sambubiósido).....	125
Figura 52. Cinética de reacción de primer orden para lipofilización (equivalentes de delfinidina 3-O-sambubiósido).....	125
Figura 53. Cinética de reacción de segundo orden para lipofilización (equivalentes de delfinidina 3-O-sambubiósido).....	127

## LISTA DE ABREVIATURAS

AM1	Método Amber 1	Por sus siglas del inglés Amber Method
13C	Carbono 13	
1H	Protón	
2D	Dos dimensiones	
AGS	Adenocarcinoma gástrico humano	
ARG	Aminoácido Arginina	
ASN	Aminoácido Asparagina	
ASP	Aminoácido Ácido Aspártico	
C/H	Carbono-Hidrógeno	
Caco-2	Adenocarcinoma colorectal	



CaIB	Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>	Por sus siglas del inglés <i>Candida antarctica</i> Lipase B
CCC	Cromatografía de Contracorriente	Por sus siglas del inglés Counter Current Chromatography
CFR	Código de Regulaciones Federales	Por sus siglas del inglés de Code of Federal Regulations
COSY	Espectroscopia de correlaciones	Por las siglas del inglés Correlation Spectroscopy
$\delta$	Saltos químicos	
DAD	Diarreglo de diodos	Por sus siglas en inglés de Diode-Array Detection
DFT	Teoría del Funcional de la Densidad	Por sus siglas del inglés de Density Functional Theory
DMSO	Dimetil sulfóxido	Por las siglas del inglés Dimethyl sulfoxide
DpG	Delfinidina 3-O-glucósido	
DpG-C8	Delfinidina 3-O-glucósido-C8	
DpS	Delfinidina 3-O-sambubiósido	
DpS-C8	delfinidina 3-O-sambubiósido-C8	
E1	Éster 1	
E2	Éster 2	
E3	Éster 3	



EAG	Equivalente de Ácido Gálico	
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria	Por sus siglas en inglés de European Food Safety Authority
EI	Impacto electrónico	Por sus siglas del inglés de Electronic Impact
ESI	Ionización por electrospray	Por sus siglas en inglés de ElectroSpray Ionization
F1	Fracción 1	
F2	Fracción 2	
F3	Fracción 3	
FDA	Administración de Alimentos y Fármacos	Por sus siglas del inglés de Food and Drug Administration
GGA	Aproximación generalizada del Gradiente	Por sus siglas en inglés de Generalized Gradient Approximation
gHMBC	Coherencia de enlace múltiple heteronuclear seleccionado por gradiente	Por las siglas del inglés gradient- selected Heteronuclear Multiple Bond Coherence
gHSQC	Gradiente - Coherencia cuántica múltiple heteronuclear seleccionada	Por las siglas del inglés gradient-selected Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
GLY	Aminoácido Glicina	
H-0→L+0	Transición de HOMO a LUMO	



Hep3B	Carcinoma hepatocelular	
HepG2	Hepatoblastoma	
HF	Hartree Fock	
HL-60	Leucemia promielocítica humana	
HOMO	Orbital Molecular Ocupado mas Alto	Por sus siglas en inglés de Highest Occupied Molecular Orbital
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	Por sus siglas del inglés High Performance Liquid Chromatography
Hz	Hertz	
IEF	Formalismo de ecuaciones integrales	Por sus siglas del inglés Integral Equation Formalism
$J$	Constante de acoplamiento	
KB	Carcinoma epidermoide oral humano	
LUMO	Orbital Molecular Desocupado mas Bajo	Por sus siglas en inglés de Lowest Unoccupied Molecular Orbital
MALDI	Ionización por desorción laser asistida por matriz	Por sus siglas del inglés Matrix-Asisted Laser Desorption Ionization
MCF-7	Adenocarcinoma	
MHz	Mega Hertz	
MS	Espectrometría de masas	Por sus siglas del inglés Mass Spectrometry



MvG	Malvidina 3-O-glucósido	
NMR	Resonancia magnética nuclear	Por las siglas del inglés Nuclear Magnetic Resonance
PCL	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i>	Por sus siglas del inglés de <i>Pseudomonas cepacia</i> Lipase
PCM	Modelo polarizable continuo	Por sus siglas del inglés de Polarizable Continuum Model
PM3	Método Parametrizado 3	Por sus siglas del inglés de Parametrized Method 3
PM6	Método parametrizado 6	Por sus siglas en inglés de Parametrized Method 6
SDS	Dodecilsulfato sódico	Por las siglas del inglés Nuclear Magnetic Resonance
SPE	Extracción de fase sólida	Por sus siglas del inglés Solid Phase Extraction
T0	Tiempo cero	
T27	Tiempo veintisiete	
T3	Tiempo tres	
TD	Dependiente del tiempo	Por sus siglas en inglés de Time- Depending
TFA	Ácido Trifluoroacético	Por las siglas del inglés TriFluoroAcetic acid



TLC	Cromatografía de capa fina	Por sus del inglés Thin Layer Chromatography
TMS	Tetrametilsilano	Por las siglas del inglés Tetramethylsilane
TOF	Tiempo de vuelo	Por las siglas del inglés Time Of Flight
UE	Unión Europea	
UHPLC	Cromatografía de Líquidos de Utra Alta Resolución	Por sus siglas del inglés Ultra High Performance Liquid Chromatography
USA	Estados Unidos de América	Por sus siglas del inglés United States of America
VAL	Aminoácido Valina	
ZINDO	Omisión Intermedia de Zerner del solapamiento diferencial	Por sus siglas en inglés de Zerner's Intermediate Neglect of Differential Overlap



## RESUMEN

Evaluación teórica y experimental de las propiedades fisico-químicas de los pigmentos nativos y lipofilizados de la *hibiscus sabdariffa* l.

Los antocianos son pigmentos fenólicos que se obtienen de flores y frutos; se caracterizan por cambiar de color dependiendo del pH de la solución acuosa, y por ser hidrosolubles. La baja lipo-solubilidad es un obstáculo para su aplicación en la industria, que se ha superado, recientemente, con la lipofilización química y enzimática. Los productos del primer tipo de reacción, mostraron pérdida del color y dificultad para su purificación. Mientras que los productos de la segunda, conservaron el color, y la facilidad en su purificación permitió su caracterización físico-química. Por estas razones, se buscó una explicación a la pérdida de color de los productos de la lipofilización química, empleando metodologías computacionales (TD-DFT). Además se lipofilizó enzimáticamente a la delfinidina 3-O-sambubiósido (DpS), extraída de la flor de jamaica, y se calcularon las propiedades físico-químicas del nuevo pigmento. La extracción y fraccionamiento de la DpS, se realizó por baño ultrasónico y SPE, respectivamente. Mientras que, la lipofilización enzimática se realizó con CalB y ácido octanóico en 2-metil-2-butanol. La reacción fue seguida por HPLC-DAD/MS, mientras que la elucidación estructural se determinó por RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . Cuyos resultados mostraron la selectividad de la enzima por el hidroxilo primario en la glucosa del antociano. El coeficiente de partición octanol-agua demostró el cambio de solubilidad contrastante entre la DpS y su éster. Las propiedades termodinámicas realizadas por saltos de pH mostraron una estabilización de la base quinoidal del éster del antociano a pH neutro o alcalino. Por otro lado, en los estudios computacionales, la metodología DFT:B3LYP/6-31++G(d,p) mostró la mejor correlación con los datos de difracción de rayos X; mientras que, la metodología TD-DFT:B3LYP/6-31++G(d,p) describió mejor los estados excitados de la moléculas estudiadas. Mostrando que la lipofilización en la glucosa del antociano afecta en menor grado las propiedades colorantes del éster. Así pues, la lipofilización enzimática cambia la solubilidad y propiedades físico-químicas del nuevo pigmento con uso potencialmente mayor.

*Palabras clave: antocianos, lipofilización, TD-DFT*





## ABSTRACT

Theoretical and experimental physical-chemical properties of the native and lipophilized pigments from *Hibiscus sabdariffa* L.

Anthocyanins are phenolic pigments obtained from flowers and fruits, which main characteristics are their changes in structure in function of pH in aqueous solution, and high hydrosolubility. Its low lipophilicity difficult their use as pigments in industry. This obstacle has been recently changed by chemical or enzymatic lipophilization. The products from the chemical reaction lost their color and were not isolated. Meanwhile, the products from the enzymatic reaction mantaned their color and purification was possible for a physical-chemical characterization. For this reasons, this work focusses on searching for TD-DFT methodologies to explain the color loss from the chemical lipophilization products. Also this work objective is to lipophilize enzymatically the delphinidin 3-O-sambubioside (DpS), extracted from hisbiscus flower, and characterize the new anthocyanin-ester physical-chemical properties. Anthocyanin extraction and fractionation were performed by ultrasonic assisted extraction and SPE, respectively. While, the enzymatic lipophilization was carried out with CalB and octanoic acid in 2M2B media. The reaction was followed by HPLC-DAD/MS, while the structural elucidation was done by HPLC/MS and  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  NMR. Which confirmed that selective reaction occurred on the primary alcohol of the glucose moiety. The octanol index proved the change of solubility between DpS and its ester. The new anthocyanin-ester thermochemical propeirties performed by pH jumps shown a quinoidal base stabilization at neutral or alkaline pH; besides a less tendency to hydration. In other way, the computational estudies, the DFT:B3LYP/6-31++G(d,p) theoretical methodology provided the geometric structure which fits better with the X-ray diffraction data. While TD-DFT:B3LYP/6-31++G(d,p) methodology was the one that better explains the excited states in the studied molecules. Displaying that a lipophilization on the sugar moiety has less effect on the anthocyanin-ester chromatic features. Alltogether, the enzymatic lipophilization can change the anthocynin solubiity and its physical-chemical properties to obtain pigments with higher potential use.

*Keywords: anthocyanins, lipophilization, TD-DFT*



## INTRODUCCIÓN

El sentido de la vista tiene gran peso sobre las elecciones que se toman en cualquier aspecto. Se emplea este sentido para evaluar los productos de uso cotidiano, ya que los criterios de aceptación y rechazo de estos se basan, en primera instancia, en el aspecto y el color. Al evaluar el color también se evalúa si un producto posee la calidad requerida, o si esta concuerda con los estándares inconscientes esperados. Así, por ejemplo, una carne de color azul será rechazada de inmediato, ya que esta coloración está fuera de lo preconcebido para la carne en buen estado. Los productos de uso cotidiano pueden ser aceptados o rechazados dependiendo de su color (Burrows, 2009). Los colorantes han sido empleados desde miles de años para mejorar o enmascarar el aspecto de los alimentos, hasta llegar al grado de adulterarlos. Esto llevó a crear leyes que regularan el uso de compuestos tóxicos que alteraran el color de los alimentos. Por otro lado, la producción de colorantes sintéticos pudo reemplazar las sales de metales empleadas y prohibidas por estas leyes, además de proporcionar colorantes más baratos y con más potencia que los colorantes naturales empleados en ese momento.

Los colorantes sintéticos son empleados popularmente debido a su bajo costo, alto poder colorante y estabilidad química. Mientras que los colorantes naturales pueden ser obtenidos de plantas, animales, minerales y microorganismos (Sigurdson, Tang, & Giusti, 2017).

Por décadas gran cantidad de aditivos alimentarios han sido empleados, sin embargo, algunos de estos han sido prohibidos por organizaciones reguladoras como la EFSA (por sus siglas en inglés de European and Food Safety Authority) y la FDA (por sus siglas del inglés de Food and Drug Administration). Estas organizaciones se ocupan de asegurar la calidad y seguridad de los alimentos, como también de promover y proteger la salud humana. Dichas organizaciones han prohibido el uso de algunos aditivos sintéticos y de origen natural (Martins, Roriz, Morales, Barros, & Ferreira, 2016). Por otro lado algunos pigmentos están dejando de ser empleados, debido a que



los consumidores evitan consumir dichos compuestos y están forzando a las empresas a recurrir a nuevos compuestos (Coultate & Blackburn, 2018).

Según la FDA, en el Código de Regulaciones Federales (CFR, por sus siglas del inglés de Code of Federal Regulations), título 21, parte 70, un aditivo colorante es “cualquier material, no exento bajo la sección 201 (t) de la ley, que sea un tinte, pigmento u otra sustancia hecha por un proceso de síntesis o artificio similar, o extraída, aislada o derivada de otro modo, con o sin intermedio o final cambio de identidad, de una fuente vegetal, animal o mineral u otra y que, cuando se agrega o aplica a un alimento, medicamento o cosmético o al cuerpo humano o cualquier parte del mismo, es capaz (solo o mediante reacción con otra sustancia) de impartirle un color (CFR, 2018)”.

La problemática actual en el campo de los pigmentos se plantea encontrar a aquellos que puedan sustituir a los sintéticos, que cada vez cuentan con más restricciones. Esta disminución en los colorantes permitidos para el consumo humano se debe a que algunos de estos se han asociado a toxicidad a corto y mediano plazo. Dentro de las afecciones asociadas se encuentran al deterioro de la salud, posibles efectos carcinogénicos y enfermedades como el cáncer o hiperactividad en niños (Coultate & Blackburn, 2018; Martins et al., 2016). Esto último podría suceder en niños con susceptibilidad a la hiperactividad, lo que podría también elevarse con el consumo de amarillo quinolina WS, amarillo atardecer FCF, carmoisina, ponceau 4R, rojo alura y tartrazina. Con respecto a esta última, trae consigo, por ejemplo, síntomas de eczema y asma en 0.01 a 0.1% de los infantes (Coultate & Blackburn, 2018; McCann et al., 2007). Estos colorantes siguen siendo permitidos en la Unión Europea (UE) y en los Estados Unidos de Norteamérica (USA), ya que la FDA concluyó que “No se ha establecido una relación causal entre la exposición a los aditivos de color y la hiperactividad en niños de la población en general”.

Sin embargo, otros colorantes que han sido inaceptables por el público en la UE, como el azul FD&C No. 1 y No. 2, son usados ampliamente en USA.



Los antocianos son colorantes naturales de bebidas y alimentos y son permitidos en la Unión Europea (E163), Japón, USA y otros países. Además, los datos científicos apoyan que los antocianos no reportan ser nocivos a la salud humana. Por el contrario, el consumo de los antocianos está ligado a beneficios hacia la salud relacionados con efectos anti inflamatorios, anti-cancerígenos y neurodegenerativos. Los antocianos se han visto con un gran potencial como colorantes alimentarios, lo que ha llevado a la búsqueda de flores y plantas comestibles que contengan a estos pigmentos (Coultate & Blackburn, 2018).

## **ANTECEDENTES**

### **POLIFENOLES**

Los polifenoles son compuestos naturales producidos como metabolitos secundarios de las plantas. Se les conoció por mucho tiempo como taninos y se les ha relacionado con el sabor amargo de los vegetales. La definición de polifenoles se refiere a las sustancias que contengan en su estructura monomérica un número grande de mono, di y/o hidroxifenilos. Una forma de clasificar a los polifenoles es en taninos condensados (proantocianidinas), galotaninos y elagitaninos (taninos hidrolizables) y por último en florotaninos (Quideau, Deffieux, Douat-Casassus, & Pouységu, 2011).

Una de las primeras aplicaciones que se les dio a los taninos fue la del encurtido de pieles. Hoy en día se sabe que estos compuestos están presentes en gran cantidad de vegetales y tienen diversas aplicaciones en la actividad humana (Quideau et al., 2011). Algunas de estas aplicaciones van enfocadas al efecto fisiológico en el que algunos grupos de compuestos destacan por sus propiedades antioxidantes, antimutagénicas y/o antitumorales (Othman, Ismail, Abdul Ghani, & Adenan, 2007). Por otro lado, las propiedades antioxidantes y antibacterianas de los polifenoles se emplean en la ciencia y tecnología de alimentos (Higginbotham, Burris, Zivanovic, Davidson, & Stewart, 2014a; Larraín, Krueger, Richards, & Reed, 2008). Mientras que

en el campo de la cosmética, se han aplicado como bloqueadores solares (Cheetham & Banister, 2000).

Además de la clasificación previamente descrita, los polifenoles comúnmente se clasifican en no flavonoides y flavonoides (Cheynier, 2005).

## NO FLAVONOIDES

Este grupo está formado por estilbenos y ácidos fenólicos. El primer subgrupo incluye moléculas derivadas de los estilbenos, como los oligómeros de estilbenos, elagitaninos y ligninas. Por otra parte, el subgrupo de los ácidos fenólicos se divide en ácidos benzoicos y cinámicos (Cheynier, 2005).

## FLAVONOIDES

Los flavonoides poseen una estructura que comparte dos anillos fenólicos y un heterociclo con oxígeno y se dividen en diferentes subfamilias. Estas subfamilias son los flavonoles, los flavanoles y los antocianos, entre otros. En la Figura 1, se observa la estructura base de los flavonoides, 2-fenil-benzopirona (Cheynier, 2005).

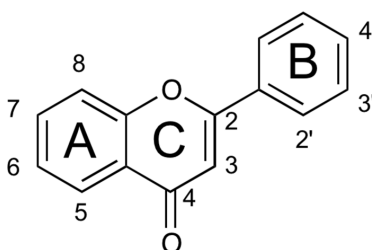
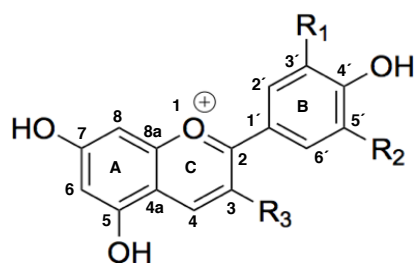


Figura 1. Estructura base de los flavonoides, 2-fenil-benzopirona.

## ANTOCIANOS

Grupo perteneciente a los flavonoides, el cual tiene importancia debido a los colores que confieren estos compuestos a las flores y frutas. Los antocianos son el grupo más

importante de pigmentos naturales. La coloración de los antocianos puede abarcar desde el rosa o rojo intenso hasta el violeta y el azul (Marston & Hostettmann, 2006). Los antocianos tienen una estructura derivada de la sal 2-fenil benzopirilio (flavilio), que en la naturaleza siempre se encuentra glicosilada y, a la vez puede estar polihidroxilada o poli-metoxilada. Además, algunos antocianos presentan acilación con ácidos fenólicos en el grupo glicosilo (Brouillard, 1982). Por lo general, los antocianos están glicosilados en el C3 del anillo C, mientras que los antocianos sin glicosilación en esta posición se les conoce como aglicón, los cuales son más inestables en solución acuosa. Existen seis principales antocianidinas (agliconas), las cuales se diferencian entre sí por el grado de hidroxilación y metoxilación en el anillo B (Figura 2).



Antocianidinas	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Pelargonidina	H	H
Cianidina	H	OH
Delfinidina	OH	OH
Peonidina	OMe	H
Petunidina	OMe	OH
Malvidina	OMe	OMe

Figura 2. Estructura de los principales antocianos.

El grado de hidroxilación o metoxilación afectan el espectro de absorción UV-vis de los antocianos. Es así, que al aumentar el número de sustituciones se obtiene un efecto batocrómico, lo que significa un desplazamiento de color hacia longitudes de onda más altas (Sigurdson, Robbins, Collins, & Giusti, 2018).

Otro grupo menor perteneciente a los antocianos es el de las deoxiantocianinas o 3-deoxiantocianinas. Las cuales no presentan hidroxilación o glicosilación en el C3 del anillo C; por lo que presentan más estabilidad y menos propensión a la hidratación, en comparación con los antocianos comunes (Xiong, 2019).

## PROPIEDADES DE COLOR DE LOS ANTOCIANOS

Los antocianos son compuestos que presentan diferente forma dependiendo del pH de la solución acuosa en la que se encuentren. Cada estructura refleja un color diferente o ninguno. Cada color puede indicar la estructura predominante en el equilibrio químico de dicha solución; a estas transformaciones estructurales se les conoce como equilibrio termodinámico (Figura 3) (Brouillard, 1982; Pina, 1998). Este equilibrio, a pH es menor de 1 se inclinará hacia la protonación del antociano, con lo que se obtendrá una coloración roja (forma flavilio). Cuando el pH se eleva a más de 1, se pueden llevar a cabo dos reacciones. La primera es la desprotonación del antociano para dar lugar a la base quinoidal (color azul), y la segunda es la hidratación del antociano para dar lugar al hemiacetal (incolore). Una vez que se haya formado este último, se puede dar lugar a la apertura del anillo C del antociano, llamada tautomerización, cuyo producto es la *cis*-chalcona de color amarillo. Seguido de la tautomerización se puede dar una isomerización de la estructura, conocida como *trans*-chalcona, lo cual vuelve la reacción de isomerización irreversible. Llegado a este punto, la coloración amarilla de la solución es un efecto de la degradación del antociano (Brouillard, 1982).

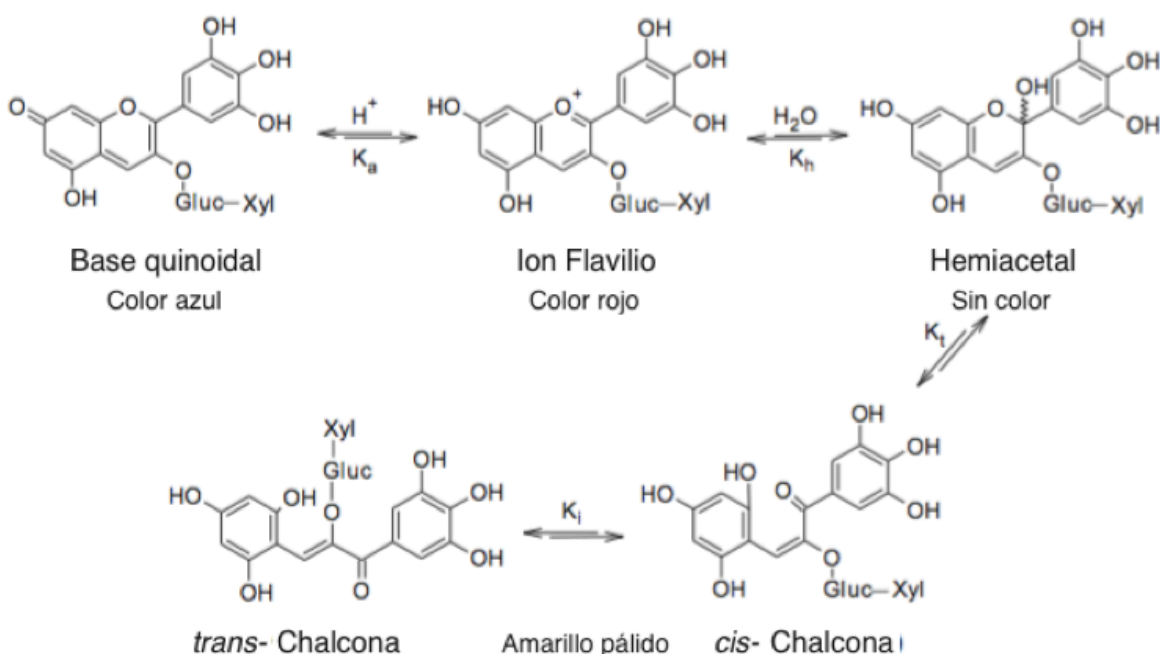


Figura 3. Equilibrio químico de la de delphinidina 3-O-sambubiósido en solución acuosa a diferente pH.



## SALTOS DE PH

La forma mas conveniente de estudiar los equilibrios termodinámicos y las cinéticas de los multiestados de los antocianos es emplear los saltos de pH. Esta metodología fue propuesta por Brouillard y Delaporte en 1978, en el que se establece que el "método se basa en la evaluación teórica de las amplitudes de relajación inducidas por saltos apropiados de pH y sobre su medición mediante un espectrofotómetro trabajando en el rango visible" (Brouillard, Delaporte, & Dubois, 1978). Entendiendo la amplitud, como la variación que existe en una magnitud que cambia en el tiempo; mientras que relajación química, es el reajuste de un equilibrio después de una perturbación repentina, por ejemplo el cambio de pH o de temperatura (IUPAC, 2008).

Para efectuar las mediciones se toman soluciones del catión flavilio en equilibrio a un  $\text{pH} < 1$  y se le adiciona una base, este procedimiento se conoce como saltos de pH directos. Mientras que los saltos de pH reversos se comienza con una solución en equilibrio a pH cercano al neutro a las que se les adiciona ácido. Para determinar las constantes de reacción y velocidades en los cambios estructurales de los antocianos es necesario conocer su equilibrio termodinámico y los procesos en las cinéticas de reacción (Brouillard et al., 1978).

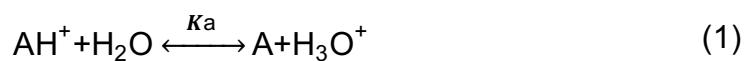
## EQUILIBRIO TERMODINÁMICO

Los cálculos para determinar las constantes de reacción y velocidad se deducen de las ecuaciones de equilibrio termodinámico que intervienen en los cambios estructurales de los antocianos en solución acuosa (Ecuaciones 1-4).

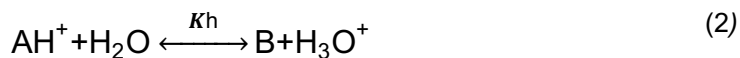




## Transferencia del protón



## Hidratación



## Tautomerización



## Isomerización



Las concentraciones de  $\text{AH}^+$  (ion flavilio), A (base quinoidal), B (hemiacetal) y C (Chalcona), se pueden expresar por medio de las constantes de equilibrio. Estas son la constante de acidez ( $K_a$ ), hidratación ( $K_h$ ), tautomerización ( $K_t$ ) e isomerización ( $K_i$ ) (Pina, 1998).

## PROCESOS CINÉTICOS

En los antocianos el proceso en el cambio de estructura sucede a diferentes escalas de tiempo. El primer paso es la transferencia del protón, el cual es la etapa más



rápida de la cinética; sucede en una escala de tiempo de microsegundos. El segundo paso es la hidratación y tautomerización, las cuales ocurren en un lapso de segundos a minutos; la primera es una reacción más lenta que la segunda a pH mayor de 1. Por último, la isomerización es la etapa más lenta de la cinética, la cual ocurre en horas (Pina, 1998).

### **Procedimiento para determinar la velocidad y las constantes de equilibrio**

Las siguientes etapas fueron descritas por Pina (1998) (Pina, 1998), dependiendo del equipo disponible para la determinación.

1. Determinación de la constante  $K'_a$ .

Esta se obtiene al grabar el espectro de absorción en soluciones en equilibrio, ajustando los cálculos a un equilibrio ácido-base.

2. Determinación de la constante de equilibrio  $K_a$ .

Esta constante debe de ser obtenida de espectros de absorción de saltos de pH, monitoreada preferentemente por un equipo de "Stop flow". La constante  $K_a$  puede ser obtenida por saltos de temperatura (Brouillard et al., 1978; Pina, 2014).

3. Determinación de la constante de equilibrio  $K_t$  y de velocidad de tautomerización.

Esta determinación requiere realizar saltos de pH reversos; en donde se emplean soluciones equilibradas o pseudo-equilibradas a un pH menor de 1. El resultado puede mostrar error debido a la baja cantidad de  $C_{cis}$  en el equilibrio. Aunque este proceso es lento, permite obtener la  $K_t$ .

4. Determinación de la constante  $K_h$  y velocidad de hidratación.

Requiere de saltos de pH directos y reversos ajustando las velocidades de reacción y constantes de equilibrio.

5. Determinación de la constante  $K_i$  y velocidad de isomerización.

Se obtiene después de haber obtenido las constantes anteriores a partir de la  $K'_a$ .

6. Verificación de los datos.



La relación de las constantes de velocidad debe de ser consistente con sus respectivas constantes en el equilibrio, dentro del error experimental.

## **APLICACIÓN DE LOS ANTOCIANOS**

La aplicación de los antocianos como colorantes esta limitada a la poca estabilidad que muestran a la luz, calor, oxígeno y pH. Por lo que se han explorado diversas formas de mejorar la estabilidad de los antocianos (Sigurdson et al., 2017).

Los antocianos son pigmentos altamente solubles en agua. Esta alta polaridad limita su solubilidad en matrices lipídicas y por lo tanto su aplicación en diversas industrias (Cruz, Fernandes, Guimarães, de Freitas, & Mateus, 2016). La solubilidad en matrices lipídicas de los antocianos puede ser mejorada con una lipofilización química o enzimática, como se ha hecho con diversos compuestos fenólicos (Cruz et al., 2016; Figueroa-Espinoza & Villeneuve, 2005; Grajeda-Iglesias, Salas, Barouh, Baréa, & Figueroa-Espinoza, 2017; López Giraldo et al., 2007; Zhu et al., 2014).

## **LIPOFILIZACIÓN DE ANTOCIANOS**

La lipofilización consiste en modificar la polaridad de un compuesto, al agregarle una cadena alifática a su estructura. En sí, la lipofilización es una reacción de esterificación en la que el grupo funcional de un ácido carboxílico se une a un alcohol para dar lugar a una molécula con características anfífilicas (Figueroa-Espinoza & Villeneuve, 2005).

Debido a las características de carga de las antocianos en forma flavilio, su alta solubilidad en agua y la inestabilidad de los mismos, existe poca información acerca de su esterificación. Se ha encontrado en la literatura información sobre la lipofilización de los antocianos, ya que hasta el momento solo se han lipofilizado los obtenidos de la jaborcaba, del vino, de la grosella negra y de la flor de jamaica. Estas



esterificaciones han sido llevadas a cabo mediante reacciones químicas y enzimáticas (Cruz et al., 2018; Cruz et al., 2016; de Castro, da Silva, de Oliveira, Desobry, & Humeau, 2014; Grajeda-Iglesias et al., 2017).

## LIPOFILIZACIÓN QUÍMICA DE ANTOCIANOS

Este tipo de esterificación se ha realizado en la malvidina 3-O-glucósido, obtenida de orujo de uva, y en la delphinidina 3-O-sambubiósido y cianidina 3-O-sambubiósido, purificadas a partir de la flor de jamaica.

En el caso de la malvidina 3-O-glucósido la lipofilización se realizó empleando cloruro de estearoil. Sin embargo, la reacción no fue regioselectiva y se obtuvieron antocianos mono, di y tri ésteres, los cuales no se lograron aislar (Cruz, Fernandes, Araújo, Mateus, & De Freitas, 2015). Por otro lado, los antocianos de la flor de jamaica fueron lipofilizados empleando cloruro de octanoilo. Que al igual que en el caso de la malvidina 3-O-glucósido, también se obtuvieron mono, di y tri ésteres, que no pudieron ser aislados. Sin embargo, se presentó un efecto hipocrómico en los antocianos cuando estos fueron lipofilizados en el cuerpo del flavilio. Este efecto provocó que se perdiera el color en los nuevos antocianos esterificados (Grajeda-Iglesias et al., 2017).

## LIPOFILIZACIÓN ENZIMÁTICA DE ANTOCIANOS

La lipofilización enzimática presenta las ventajas de ser regioselectiva, y por lo tanto con ella se evita la formación de reacciones secundarias y sub-productos. La esterificación enzimática de polifenoles se ha llevado a cabo con diferentes enzimas en medios no acuosos (Figuroa-Espinoza & Villeneuve, 2005). Por ejemplo, se ha esterificado ácido cinámico empleando las lipasas de *Candida antarctica* y *Rhizomucor miehei* (Stamatis, Sereti, & Kolisis, 1999). Además de las lipasas antes mencionadas, también se han empleado esterasas de *F. Oxysporum* y *Aspergillus niger* (Figuroa-Espinoza & Villeneuve, 2005).



En la lipofilización de antocianos por vía enzimática se ha empleado únicamente la lipasa B de *Candida antarctica* (CalB, del inglés *Candida antarctica* lipase B) (Cruz et al., 2018; Cruz et al., 2016; de Castro et al., 2014; Yang, Kortensniemi, Ma, Zheng, & Yang, 2019; Yang, Kortensniemi, Yang, & Zheng, 2018).

Esta enzima ha mostrado selectividad en el alcohol primario de los azúcares de los antocianos. Además, esta lipofilización no afecta el color atractivo de los ésteres de antocianos producidos (Cruz et al., 2017). Otro aspecto importante, es que, al ser una reacción regioselectiva, se obtiene un solo producto. Por este motivo, los productos obtenidos por estas reacciones lograron ser purificados y su estructura determinada por medio HPLC/MS y RMN. Asimismo, también fueron analizadas las propiedades antioxidantes y constantes de equilibrio de los nuevos ésteres de antocino (Cruz et al., 2018, 2017; Cruz et al., 2015; Yang et al., 2019, 2018).

A pesar de que se ha reportado la selectividad de la enzima CalB por los hidroxilos primarios, presentes en los azúcares de los antociano, se ha reportado la lipofilización de antocianos y otros flavonoides. Dichas lipofilizaciones se llevaron a cabo en hidroxilos diferentes a los primarios (Saik, Lim, Stanlas, & Choo, 2017a; Yang et al., 2019).

## LIPASAS

Las lipasas (EC 3.1.1.3) son enzimas del grupo de las hidrolasas, las cuales catalizan la hidrólisis de enlaces éster-glicérido en una interfase lípido-agua. La mayoría son glicoproteínas extracelulares ácidas de peso molecular de 20 a 60 kDa, las cuales pueden contener hasta de un 2 a 15% de carbohidratos cuando son purificadas (Hari Krishna & Karanth, 2002).

Una gran cantidad de lipasas han sido caracterizadas, las cuales han mostrado variedad en su eficiencia y especificidad por el sustrato. En un solvente orgánico las



lipasas puede ser usadas para trans-esterificar o crear nuevos lípidos (Uppenberg Jonas, Morgens, Shamkant, & Alwyn, 1994).

Basado en el sitio activo de las lipasas, estas se han clasificado como serina hidrolasas. Las características estructurales incluyen un pliegue hidrolasa alfa/beta y una triada catalítica que consiste en un residuo de serina nucleofílica y un aspartato, o glutamato, unido por puente de hidrógeno a una histidina (Hari Krishna & Karanth, 2002). La mayoría de las lipasas poseen una cubierta móvil que cubre el sitio catalítico cuando la enzima se encuentra inactiva (Uppenberg Jonas et al., 1994).

La levadura de *Candida antarctica* ha mostrado una actividad de lipasa no específica en altas temperaturas sobre triglicéridos. De esta levadura se han aislado dos lipasas diferentes; se les nombra como lipasa A y B. La primera es más termoestable, pero no es específica, tiene un peso molecular de 45 kDa. Por otro lado la lipasa B muestra alta especificidad al hidrolizar o sintetizar lípidos, por lo que tiene un alto potencial para sintetizar glicolípidos (Uppenberg Jonas et al., 1994).

### **LIPASA B DE *CANDIDA ANTARCTICA***

Se le conoce como CalB (De sus siglas en inglés de *Candida antarctica* lipase B) es una proteína globular  $\alpha/\beta$  con dimensiones con un peso molecular de 33 kDa y un punto isoeléctrico de 6.0. La secuencia de la CalB fue resuelta por Uppenberg y colaboradores (1994), quienes propusieron la estructura del sitio activo de la enzima como “abierta”. El sitio activo de la CalB se encuentra en la triada catalítica serina 105, ácido aspártico 187 e histidina 224, en el grupo carboxi terminal de la hoja  $\beta$ ; este sitio y los amino ácidos cercanos tienen una naturaleza polar. El sitio es accesible al solvente a través de un estrecho túnel hidrofóbico, de aproximadamente 10 Å x 4 Å x por 12 Å de profundidad. La CalB tiene aproximadamente una superficie hidrofóbica de 450 Å<sup>2</sup>, que rodea la entrada a su sitio activo. Esta conformación probablemente le da a la enzima su estéreo-especificidad (Uppenberg Jonas et al., 1994).

La reacción de lipofilización se lleva a cabo en cuatro etapas basadas en el mecanismo de transesterificación bi-bi ping pong de las lipasas. El mecanismo se basa en la acilación y des-acilación de la Ser 105, en el que se involucra la formación de dos tetrahedros intermedios (Figura 4) (De Oliveira et al., 2009). Este proceso ocurre primero como un complejo no covalente entre la enzima y el sustrato (Complejo de Michaelis); y después como un tetraedro intermedio (Escorcía, Daza, & Doerr, 2014).

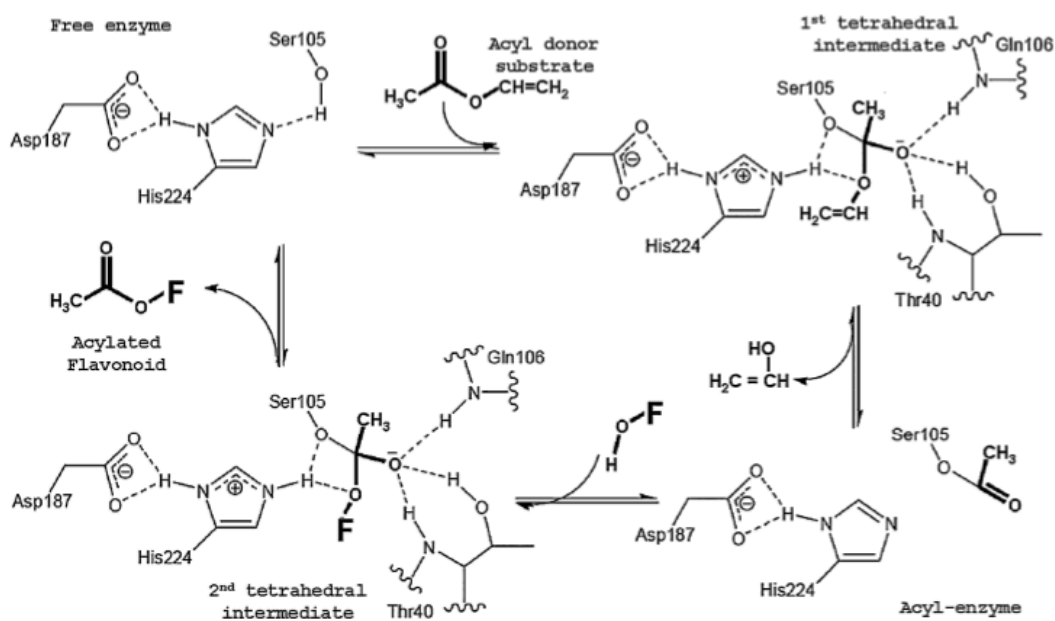


Figura 4. Etapas de la transesterificación de flavonoides (De Oliveira et al., 2009).

En este mecanismo, el primer paso es la unión del ácido graso y la lipasa, que se conoce como primer tetraedro intermedio. Esto resulta del ataque nucleofílico de la Serina 105 al sustrato con un grupo acilo (ácido graso). Lo que da origen a un complejo acil-enzima, en el que se libera agua o alcohol, en el caso de una trans-esterificación (De Oliveira et al., 2009; Ghanem, 2007). A este proceso le sigue la formación del segundo tetraedro intermedio. Que sucede cuando el sustrato aceptor del grupo acilo o portador de los hidroxilos primarios ataca nucleofílicamente al complejo acil-enzima; para luego liberar al éster formado y regenerar a la enzima (De Oliveira et al., 2009; Ghanem, 2007).



La CalB ha sido empleada para acilar una gran cantidad de sustratos, incluyendo sustratos naturales como oligosacáridos, diterpenos, flavonoides, saponinas esteroides, saponinas triterpenos y antocianos (Chebil et al., 2007; Cruz et al., 2016; Figueroa-Espinoza & Villeneuve, 2005; Saik, Lim, Stanslas, & Choo, 2016; Teng et al., 2005; Yang et al., 2019). En la mayoría de los casos, la esterificación ha ocurrido en los alcoholes primarios de la parte glucósida de los compuestos.

Las modificaciones estructurales de los flavonoides que han sido esterificados con diferentes ácidos alifáticos o aromáticos han alterado también sus propiedades físico-químicas. Estas transformaciones han cambiado la biodisponibilidad y las propiedades biológicas de los nuevos compuestos, ya que estas son diferentes a las de los compuestos que les dieron origen (Melo Branco de Araújo et al., 2017).

## **LIPOFILICIDAD**

Generalmente al adicionar una cadena de ácidos grasos a compuestos hidrosolubles para cambiar la lipofiliidad, las aplicaciones de estos se expanden a medios liposolubles (Antonopoulou et al., 2016; Zhong & Shahidi, 2011).

Esta lipofiliidad por lo general se determina con el coeficiente de partición octanol-agua ( $P$ ) (Zhong & Shahidi, 2011). El coeficiente de partición octanol-agua se define como el logaritmo de la relación de la concentración de solutos en la fase de octanol sobre la concentración de solutos en la fase acuosa a una temperatura definida (Rothwell, Day, & Morgan, 2005).

Es el parámetro más usado en los modelos de relación de estructura-actividad en el desarrollo de drogas (Cruz et al., 2017). Adicionalmente, es el modelo más adecuado para evaluar el grado de permeabilidad de las drogas en membranas biológicas lipídicas (Pagliara, Reist, Geinoz, Carrupt, & Testa, 1999).



## FLOR DE JAMAICA (*HIBISCUS SABDARIFFA* L.)

La flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* Linn) es un arbusto de la familia de las malváceas que crece en climas tropicales y sub tropicales. Se cree que su origen es asiático, de donde pudo ser llevada a África y de ahí a América en la época colonial. En el mundo se le conoce por sus diferentes nombres como sorrel, roselle, hibiscus, karkadé o jamaica. Los principales países productores de la flor de jamaica son China, India, Malasia, Sudán y México (Cid-Ortega & Guerrero-Beltrán, 2015; Da-Costa-Rocha, Bonnlaender, Sievers, Pischel, & Heinrich, 2014). En este último, el estado de Guerrero el que cuenta con mayor producción, con 5,810 ton, con un valor de 164,121 miles de pesos (SIAP, 2019). A lo largo del mundo, la flor de jamaica se consume de diversas maneras. Sus hojas, por ejemplo, son usadas como forraje o para la elaboración de ensaladas, mientras que las flores se emplean para la preparación de bebidas refrescantes, bebidas fermentadas, mermeladas, gelatinas y repostería. Además del consumo que se ha mencionado, la infusión de flor de jamaica también se emplea como remedio en la medicina tradicional como antipirético, diurético y digestivo. Un empleo adicional es el que se le da a la extracción de sus pigmentos para ser utilizados como colorante natural (Da-Costa-Rocha et al., 2014).

La flor de jamaica con mayor calidad es la de Sudán y Tailandia, sin embargo, el producto más comercializado es el de Tailandia y China. Siendo este último el principal proveedor de USA, quien es junto con Alemania uno de los mayores mercados de la jamaica seca (Plotto, 2004).

Las propiedades relacionadas con los beneficios a la salud de la flor de jamaica se deben a la composición de la misma. La flor de jamaica se compone principalmente de fibra dietética, con un contenido total de 389.2 g/Kg (base seca) (Tabla 1) (Sáyago-Ayerdi, Velázquez-López, Montalvo-González, & Goñi, 2014). Otro estudio, realizado por Jabeur y colaboradores, reporta a los azúcares como el principal macronutriente



de la flor de jamaica, seguido de ceniza, proteína y lípidos. El principal azúcar que encontraron fue la glucosa (6.5%), seguido de la fructosa (4.5%).

Los resultados anteriores sobre los macronutrientes, concuerdan a los de Ismail y colaboradores (2008), con ligeras diferencias. Estos investigadores reportan como principal macronutriente a los azúcares, seguido de proteínas y lípidos. También azúcares, tocoferoles, ácidos grasos, ácidos orgánicos, pectinas, carotenos y compuestos fenólicos (Jabeur et al., 2017; Piovesana, Rodrigues, & Noreña, 2019).

Los ácidos orgánicos que han sido encontrados en la flor de jamaica son el ácido málico (9.1%), oxálico (1.81%), shikímico (0.356%) y fumárico (0.043%) (Jabeur et al., 2017). Además de estos ácidos reportados también se han reportado el ácido cítrico, hidroxícítrico, hibiscus, tartárico y ascórbico (Da-Costa-Rocha et al., 2014).

Además de la vitamina C, también contiene tiamina (vitamina B<sub>1</sub>) y riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>) (Carvajal-Zarrabal et al., 2012). En el hibiscus, Jabeur y colaboradores en 2017, han detectado e identificado tocoferoles y ácidos grasos. Los primeros corresponden al  $\alpha$  y  $\beta$  tocoferol en cantidades de 39.19 y 0.76 mg/100g (base seca), respectivamente. Mientras que los ácidos grasos identificados son 18, en el cual destaca el ácido linoleico por ser un ácido graso insaturado y el más abundante presente en la hibiscus, comprendiendo un 32.65% del total de los ácidos grasos (Jabeur et al., 2017).

En cuanto a los carotenos presentes en la flor de jamaica, fue por Piovesana y colaboradores (2019) quienes mostraron la composición de algunos de estos. Los carotenos separados por HPLC en dicho estudio fueron 21. Sin embargo solo 15 fueron identificados total o parcialmente, de acuerdo al tiempo de elución, el espectro UV-vis y/o las características de su espectro de masas. Los principales carotenos encontrados en la flor de jamaica fueron trans-luteína, trans-beta-caroteno y fitoeno. Según este estudio el contenido de estos compuestos en el hibiscus se puede considerar alto, al presentar 641  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  (peso fresco) (Piovesana et al., 2019).

Tabla 1. Composición proximal de la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L) variedad Criolla de México. Adaptado de Sáyago-Ayerdi *et al.* (2014).

	Contenido (g/ Kg de materia seca)
Humedad	103.3 ± 1.5
Proteína <sup>a</sup>	129.2 ± 0.2
Grasa	9.9 ± 0.5
Carbohidratos solubles	110.2 ± 2.1
Fibra dietética total	389.2 ± 12.8
Fibra dietética insoluble <sup>b</sup>	161.4 ± 13.0
Fibra dietética soluble <sup>b</sup>	80.3 ± 3.2
Cenizas	84.4 ± 2.1

Nota. <sup>a</sup> N x 5.6; <sup>b</sup> Polisacáridos sin almidón; los valores son la media ± la desviación media estándar (n≥6).

Debido a los beneficios asociados a la salud y las propiedades de la flor de jamaica hacen que esta y sus componentes puedan ser vistos como ingredientes multifuncionales en diversas industrias (Jabeur *et al.*, 2017).

## POLIFENOLES DE LA FLOR DE JAMAICA.

Los compuestos fenólicos en el hibiscus son principalmente ácidos fenólicos, antocianos y algunos flavonoles. En la Tabla 2 se pueden apreciar los principales grupos de polifenoles de la flor de jamaica reportados por Sayago-Ayerdi y colaboradores (2007). En dicha tabla se puede observar que de los 2.17 g en equivalentes de ácido gálico (EAG) de los polifenoles extraíbles, el 5.87% corresponde a los flavonoles, el 32.6% corresponde a los ácidos hidroxibenzoicos, el 30.6% a los ácidos hidroxicinámicos y el 30.8 % a los antocianos (Sáyago-Ayerdi, Arranz, Serrano, & Goñi, 2007).

Tabla 2. Contenido de polifenoles totales en la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L) variedad Criolla de México. Adaptado de Sáyago-Ayerdi *et al.* (2007)

	Contenido (g EAG <sup>a</sup> / 100 g)
Polifenoles extraíbles	2.17 ± 0.04
Polifenoles no extraíbles	
Proantocianidinas	3.38 ± 0.06
Polifenoles hidrolizables	0.58 ± 0.03

Nota. <sup>a</sup> Equivalentes de ácido gálico (EAG); los valores son la media ± la desviación media estándar (n≥9).

Los ácidos fenólicos encontrados en la flor de jamaica son el protocatechuico, eugenol y ácido clorogénico (Jabeur *et al.*, 2017; Zhen *et al.*, 2016).

En el hibiscus se han detectado los flavonoles quercetina 3-O-rutinósido, quercetina 3-O-glucósido, miricetina pentosilhexósido (disacárido) y el Kampferol 3-O-rutinósido (Carvajal-Zarrabal *et al.*, 2012; Jabeur *et al.*, 2017).

También se ha detectado el 5- hidroximetil furfural (5-HMF) entre los compuestos fenólicos mayoritarios de la flor de jamaica, en una concentración de 5.75 mg/g de extracto hidroalcohólico. Este compuesto ha sido descrito como un compuesto bioactivo por sus propiedades antioxidantes, anti-isquémicas y coadyuvantes en la reología sanguínea (Jabeur *et al.*, 2017). Por otra parte, Zhen y colaboradores (2016) detectaron por primera vez al 5-HMF en hojas de hibiscus, sin embargo, atribuyen una correlación entre la concentración del compuesto y la disminución de la capacidad antioxidante y antiinflamatoria (Zhen *et al.*, 2016).

Los antocianos encontrados en la flor de jamaica son principalmente la delfinidina 3-O-sambubiósido y la cianidina 3-O-sambubiósido (Figura 5), aunque también se ha reportado la presencia de delfinidina 3-O-glucósido y cianidina 3-O-glucósido. Por lo general se reporta a la delfinidina como uno de los compuestos fenólicos mayoritarios

de la flor de jamaica, la cual forma parte del 70% del contenido total de antocianos. Por otro lado, la cianidina corresponde alrededor del 30% de antocianos totales. Mientras que el resto de los antocianos reportados podrían alcanzar alrededor del 4% de los pigmentos (Borrás-Linares et al., 2015; Jabeur et al., 2017; Sinela et al., 2017). Además de estos antocianos, Grajeda-Iglesias y colaboradores (2016) reportaron la presencia de cianidina glicosilada con tres, cuatro y hasta cinco azúcares (Grajeda-Iglesias et al., 2016).

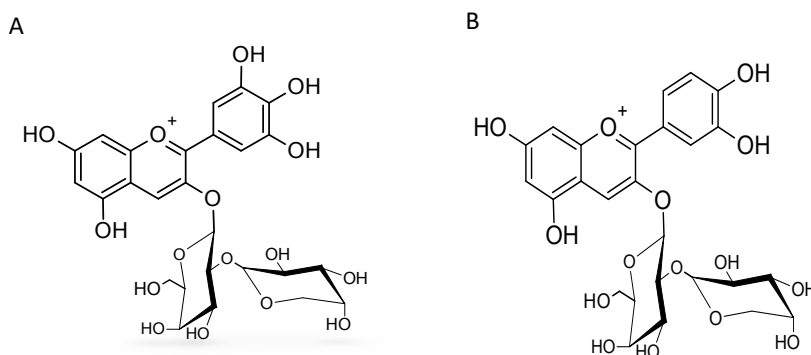


Figura 5. Estructuras de la A) delphinidina 3-O-sambubiósido y la B) cianidina 3-O-sambubiósido.

## MINERALES EN LA FLOR DE JAMAICA

El valor de ceniza o minerales puede variar dentro de la misma especie, ya que el tipo de suelo donde la planta crece afecta este contenido, de manera que han sido reportados diferentes valores de calcio, fierro o magnesio (Carvajal-Zarrabal et al., 2012).

## APLICACIONES Y BENEFICIOS DE LA FLOR DE JAMAICA

El uso que se le da a la flor de jamaica a lo largo del mundo incluye la preparación de bebidas frescas y fermentadas, jaleas, como ingrediente en confitería y repostería, así como saborizante y colorante natural. La preparación de infusiones con la flor son empleadas como medicina natural, por sus efectos diuréticos, colorético, antipirético e



hipotensivo. En el norte de África se ha llegado a usar para tratar dolor de garganta, tos y tratar problemas genitales (Da-Costa-Rocha et al., 2014).

El empleo de la flor de jamaica se ha llevado a investigaciones sobre su capacidad antioxidante, antiinflamatoria y antibacterial (Al-Hashimi, 2012; Christian, Nair, & Jackson, 2006; Higginbotham, Burris, Zivanovic, Davidson, & Stewart, 2014b; Jaroni & Ravishankar, 2012; Márquez-Rodríguez et al., 2020) Otras investigaciones también han incluido estudios sobre el efecto del extracto de hibiscus contra células cancerígenas de adenocarcinoma gástrico humano (AGS), leucemia promielocítica humana (HL-60), carcinoma hepatocelular (Hep3B), adenocarcinoma colorectal (Caco-2), hepatoblastoma (HepG2), adenocarcinoma (MCF-7) y carcinoma epidermoide oral humano (KB) (Carvajal-Zarrabal et al., 2012). También, debido a las propiedades óxido/reductoras del extracto de flor de jamaica, este se ha empleado para sintetizar nanopartículas de CdO (Thovhogi, Park, Manikandan, Maaza, & Gurib-Fakim, 2016).

## TÉCNICAS ANALÍTICAS

### CROMATOGRAFÍA

Después de una extracción de compuestos de interés de una matriz biológica, es necesario el fraccionamiento y la purificación de los compuestos, por lo que generalmente se recurre a la cromatografía. El nombre de cromatografía significa escribir con color, y proviene del griego *graphein*, escribir y del *khroma*, color. El descubrimiento de la cromatografía se acredita generalmente al botánico ruso Tswett; que la empleo separar pigmentos de hojas verdes en series de bandas coloreadas percoladas con solvente a través una capa de carbonato de calcio (Poole, 2003).

La cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes de una muestra se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra es



móvil (Poole, 2003). Las metodologías de fraccionamiento y purificación pueden seguir procedimientos de separación líquido-sólido y/o líquido-líquido (Grajeda-Iglesias, 2016).

## **CROMATOGRAFÍA SÓLIDO-LÍQUIDO**

En la cromatografía existen dos métodos para separar compuestos en base a la polaridad de la fase estacionaria y se conoce como fase normal o fase inversa (Sankar, Snehalatha, Firdose, & Babu, 2019).

### **Fase normal**

La fase estacionaria polar emplea fase móvil no polar; generalmente la primera esta hecha a base de sílica y la segunda emplea hexano, cloruro de metileno, cloroformo, entre otros (Sankar et al., 2019).

### **Fase inversa**

La fase estacionaria no polar (hidrofóbica) emplea fase móvil polar, como agua metanol, acetonitrilo, etc (Sankar et al., 2019).

#### *Fraccionamiento con LiChroprep RP-18®*

El LiChroprep RP-18®, es un gel de fase inversa que se emplea para el fraccionamiento y purificación de moléculas orgánicas, polipéptidos y biomoléculas; por ejemplo antibióticos, esteroides y productos naturales (Millipore, 2017a, 2017b). Este gel ha sido empleado para purificar catequina y procianidinas oligoméricas y poliméricas de extracto bruto de uva (Xia, Deng, Guo, & Li, 2010).

#### **Extracción de fase sólida**

La extracción de fase sólida (Por sus siglas del inglés Solid Phase Extraction) se puede emplear para fraccionar los extractos antes de inyectar en HPLC y obtener mejores



perfiles cromatográficos (Xia et al., 2010). Con la SPE se pueden purificar compuestos de un extracto entero (Traversier, Gaslondes, Milesi, Michel, & Delannay, 2018). Es muy usada para separar compuestos fenólicos, como los antocianos, en el que se pueden emplear diferentes tipos de sorbentes (fase estacionaria); como el intercambio de cationes fuertes y C18. Sin embargo, al emplear un sorbente como el primero, se debe eliminar las sales de las fracciones resultantes, por lo que posteriormente se debería utilizar una columna de SPE empacada con C18 (Ahmadiani, Sigurdson, Robbins, Collins, & Giusti, 2019). Esta última es un sorbente muy empleado para el fraccionamiento, purificación y análisis de polifenoles y antocianos (Grajeda-Iglesias et al., 2016; Marston & Hostettmann, 2006; Sun, Leandro, Ricardo Da Silva, & Spranger, 1998).

#### *Fraccionamiento con C18 Sep-Pak®*

El C18 Sep-Pak®, es una fase sólida a base de sílice (funcionalizada con C18) que posee una fuerte hidrofobicidad y se utiliza para adsorber compuestos de hidrofobicidad débil. Las aplicaciones típicas incluyen la extracción de drogas y sus metabolitos de suero, plasma u orina; aislar trazas de compuestos orgánicos de muestras de agua (Waters, 2020). También es ampliamente usado para separar antocianos de otros polifenoles, ácidos, azúcares y demás compuestos hidro-solubles (Sun et al., 1998).

#### Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

La Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, del inglés High Performance Liquid Chromatography) es un método de cromatografía muy popular, que permite emplear los modos cromatografía de fase normal y fase inversa (Traversier et al., 2018). La mayoría de las aplicaciones que emplean HPLC recurren a fases estacionarias de octadecilsilano (Marston & Hostettmann, 2006). Las aplicaciones en la industria van desde las farmacéuticas, alimentarias, ambientales, forense o clínicas (Sankar et al., 2019). Este tipo de cromatografía es ampliamente usada en la separación, identificación y cuantificación de compuestos fenólicos. Debido a su precisión y versatilidad se puede emplear en escalas analíticas o preparativas (Marston





& Hostettmann, 2006). Una gran cantidad de investigación sobre polifenoles y antocianos se realiza empleando HPLC en fase inversa con fase móvil acidificada. En la cromatografía de líquidos se emplean diferentes tipos de detectores, en especial el arreglo de diodos, ya que los polifenoles poseen un rango de absorbancia en el UV-vis (Grajeda-Iglesias, 2016).

#### Cromatografía de ultra alta resolución

En la cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (UHPLC, del inglés Ultra High Performance Liquid Chromatography) la fase estacionaria posee partículas más pequeñas que en un HPLC y puede aplicar presión de hasta 1200 bars, lo que permite un flujo rápido de la fase móvil, en columnas pequeñas, sin perder resolución (Traversier et al., 2018).

#### Cromatografía de capa fina

La cromatografía de capa fina (TLC, del inglés Thin Layer Chromatography) es una herramienta rápida, económica, flexible y portátil para monitorear reacciones de síntesis o aplicaciones similares. La TLC se basa en colocar una pequeña gota de muestra sobre una capa fina de sorbente por la que pasa el solvente eluyente (Poole, 2003).

La TLC ha evolucionado para convertirse en una técnica que se caracteriza por obtener separaciones eficientes y rápidas, además de ser considerado un método cualitativo o semi-cuantitativo, aunque los sorbentes actuales son más caros que con los que inició la técnica (Poole, 2003). Se ha empleado para el análisis cualitativo en el seguimiento de reacciones de lipofización de flavonoides y antocianos (Gayot, Santarelli, & Coulon, 2003; Grajeda-Iglesias et al., 2017; Guimarães, Mateus, De Freitas, & Cruz, 2018).



## **CROMATOGRAFÍA LÍQUIDO-LÍQUIDO**

En este tipo de cromatografía los componentes de la muestra son separados por partición entre dos líquidos inmiscibles, en el cual uno de ellos se inmoviliza mediante un recubrimiento con un sorbente poroso (Poole, 2003).

### **Cromatografía de contracorriente**

La cromatografía de contracorriente (CCC, del inglés Counter Current Chromatography) es una técnica que emplea una fase estacionaria líquida que es sostenida por la fuerza centrífuga y es usada para separar los componentes químicos de la muestra. Esta muestra es disuelta en un sistema de solvente de dos fases, donde los compuestos irán a una de las dos fases de acuerdo a su solubilidad en estos. LA CCC es usada principalmente con fines preparativos, y para purificar esfingolípidos, fosfolípidos y ácidos grasos (Traversier et al., 2018), además de ser una excelente herramienta para el fraccionamiento y la purificación a gran escala de antocianos (Schwarz, Hillebrand, Habben, Degenhardt, & Winterhalter, 2003). Esta metodología ha sido empleada para separar y aislar antocianos de una mezcla compleja obtenida de orujo de uva (Veličkovska & Mirhosseini, 2013). De la misma forma ha sido empleada para separar y aislar los antocianos de la flor de jamaica y el ácido *p*-coumárico del arándano (Wei, Sardar, Sutherland, & Fisher, 2011).

## **MÉTODOS DE DETECCIÓN Y ANÁLISIS ESTRUCTURAL**

### **ESPECTROMETRÍA UV-VIS**

El detector de arreglo de diodos (DAD, del inglés Diode Array Detector) es el más comúnmente usado en cromatografía de líquidos y se usa para registrar el espectro de absorción UV-vis de los compuestos que son separados en un HPLC. Este detector



tiene aplicaciones en la rama farmacéutica, biología, química petroquímica o agricultura, entre muchas otras (Biocompare, 2020).

Comunmente el DAD se acopla a la espectrometría de masas (HPLC-DAD-MS) con lo que se puede identificar de forma rápida los componentes de una mezcla (Grajeda-Iglesias, 2016).

## ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas (MS, del inglés Mass Spectrometry) es una herramienta muy útil en el control de calidad que posee la capacidad analítica para estudiar estructuras moleculares (Grajeda-Iglesias, 2016).

El proceso para realizar la MS comienza cuando el solvente de la muestra es evaporado y los compuestos son ionizados para después ser separados de acuerdo a sus relación masa/carga ( $m/z$ ). La ionización puede llevarse a cabo por diferentes metodologías, como el impacto electrónico (EI, del inglés electronic impact), ionización por asperción electrónica (ESI, del inglés Electro-Spray Ionization) y ionización por desorción laser asistida por matriz (MALDI, del inglés Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization). La ionización por EI es generalmente usado en cromatografía de gases, mientras que el ESI es comunmente usado en acoplamiento con el HPLC. Por otro lado, la ionización con MALDI se puede emplear en placas de cromatografía de capa fina, además de que se puede acoplar a un espectrómetro tiempo de vuelo (TOF, del inglés Time Of Flight) (Traversier et al., 2018). Dependiendo del método de ionización empleado se puede obtener diversa cantidad de información estructural. La información que se puede obtener de los flavonoides, además de la masa molecular de los iones y los patrones de fragmentación, puede ser la información estructural acerca de la naturaleza de la aglicona o de sus sustituyentes, como de las uniones interglucosídicas e incluso algo de información estereoquímica (Fossen & Andersen, 2006).



En el análisis de compuestos extraídos de fuentes naturales se puede emplear la ionización en modo negativo o positivo.

La ionización negativa se emplea principalmente en flavanoles, flavonoles y flavonas como la catequina, quercetina y luteolina, respectivamente (Fossen & Andersen, 2006; Saik et al., 2016; Saik, Lim, Stanslas, & Choo, 2017b). Se ha encontrado que el ESI en modo negativo ha sido más efectivo que el modo positivo para la identificación de los polifenoles del bagazo de la manzana (Grigoras, Destandau, Fougère, & Elfakir, 2013). La ionización negativa se usó también en la identificación de ácido elálgico de una muestra hidrolizada de jugo de frambuesa roja (Vrhovsek et al., 2006).

Para el análisis de los polifenoles de la flor de jamaica se ha empleado el modo positivo en la ionización (Sindi, Marshall, & Morgan, 2014); aunque para el análisis de los polifenoles de las hojas de jamaica se ha realizado en modos positivo y negativo (Zhen et al., 2016). Sin embargo, para el análisis y caracterización de antocianos se ha observado que la ionización en modo positivo proporciona los mejores resultados, debido a que los antocianos son cationes naturales (Giusti, Rodríguez-saona, Griffin, & Wrolstad, 1999).

## **RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR**

La resonancia magnética nuclear (NMR, del inglés Nuclear Magnetic Resonance) es una técnica espectrométrica que se basa en la capacidad de las moléculas de absorber la radiación electromagnética en la región de radiofrecuencia (Silverstein, Webster, & Kiemble, 2005). Es empleada por su utilidad en el análisis estructural de compuestos de bajo peso molecular en productos alimenticios y farmacéuticos (Fossen & Andersen, 2006).



En la actualidad se puede asignar la posición de protones y carbonos, lo cual se puede realizar basados en las constantes de acoplamiento ( $J$ ) obtenidas de espectros combinados de 1D  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  con correlaciones experimentales homo y heteronuclear de NMR 2D (Fossen & Andersen, 2006).

La NMR es una herramienta sumamente útil para determinar la estructura de flavonoides, aunque tiene la limitante de baja sensibilidad en el análisis de mezclas de compuestos. Aunque es posible determinar la estructura de los flavonoides con tan solo un miligramo de muestra de un compuesto aislado (Fossen & Andersen, 2006).

La obtención de la estructura de antocianos como la delfinidina 3-O-sambubiósido y delfinidina 3-O-glucósido por medio de NMR se ha realizado en varios estudios (Cabrita & Andersen, 1999; Grajeda-Iglesias et al., 2016; Košir & Kidrič, 2002; Kouakou et al., 2014; Veličkovska & Mirhosseini, 2013). También se ha empleado esta técnica para la obtención de la estructura molecular de productos de síntesis química y enzimática (Chassaing et al., 2010; Cruz et al., 2016; Zhong & Shahidi, 2011).

### **ABSORTIVIDAD MOLAR**

La absorptividad molar es la medida de la probabilidad de una transición electrónica. Y depende del número y tipo de cromóforo del compuesto. Se puede considerar también como una medida de la absorción electrónica a determinada longitud de onda, en un solvente dado. Ya que, dependiendo del solvente, se podrán observar efectos batocrómicos, hipsocrómicos, hipocrómicos o hiperocrómicos (Pelillo et al., 2004).

La absorptividad molar en antocianos indica con qué intensidad la luz es absorbida a determinada longitud de onda en un solvente con un pH determinado. Estos valores han sido reportados en la literatura, aunque existen diversas diferencias en los valores mostrados (Ahmadiani, Robbins, Collins, & Giusti, 2016).



La ley de Lambert-Beer nos permite relacionar la absorbancia con la absorptividad molar (L/mol.cm) a una concentración dada, medida en la longitud de onda máxima a través de una trayectoria óptica de 1 cm (Giusti & Wrolstad, 2001; Pelillo et al., 2004).

Esta relación se muestra en la Ecuación 5.

$$A = \varepsilon * b * c \quad (5)$$

Donde:

A.- Absorbancia (adimensional)

$\varepsilon$ .- coeficiente de absorptividad molar (L/mol.cm)

b.- espesor de la celda (cm)

c.- concentración (mol/L)

El principal uso que se da a la ley de Lambert-Beer es la del cálculo de concentraciones por medio de curvas de calibración, sin embargo puede emplearse también cuando se conoce el valor de  $\varepsilon$ . Estos métodos pueden ser costosos y no siempre se cuenta con los compuestos para realizar las calibraciones (Versari, Parpinello, & Fabiani, 2007). De esta manera la ley de Lambert-Beer puede ser útil para la cuantificación de sustancias cuando se emplean estándares con pocas impurezas y donde el valor de  $\varepsilon$  se vería poco afectado por esa interferencia. Este tipo de cuantificación se conoce como análisis sin estándar y se aplica cuando los estándares puros no están disponibles, pero la cantidad del compuesto se pueda determinar con precisión por medio de métodos analíticos independientes (Locatelli, Carlucci, Genovese, Curini, & Epifano, 2011). De este modo, se han desarrollado métodos sin estándar para validarse al lado del método convencional de cuantificación por medio de calibración con estándares (Versari et al., 2007).

Giusti y colaboradores (Giusti & Wrolstad, 2001) describieron la Ecuación 6, con la que es posible determinar la cantidad de antocianos monoméricos al emplear el coeficiente de absorptividad de los antocianos. El método se conoce como método diferencial de



pH, y se basa en el equilibrio de estructuras de los antocianos en solución acuosa a diferente pH. Donde a pH 1 predomina la forma flavilio, mientras que a pH 4 predomina la forma hemiacetal.

Por otro lado,  $\epsilon$  no es conocido para todos los antocianos, y aunque se conozca se debe tener en cuenta si se requiere determinar el contenido total de antocianos o solo alguno. Esto con el fin de decidir cual coeficiente es más conveniente emplear. Al emplear el coeficiente de absorptividad para algún cálculo se debe tener en cuenta el solvente en el que se realizó la determinación y el solvente en que se realizará el análisis. Estas variables deberían ser los mas similares para asegurar la exactitud de la cuantificación.

$$\text{Antocianos monoméricos } \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{A * PM * FD * 1000}{(\epsilon * 1)} \quad (6)$$

A.- Absorbancia

PM.- Peso molecular del antociano (g/mol)

FD.- Factor de dilución

$\epsilon$ .- Coeficiente de absorptividad molar (L/mol.cm)

Para mantener la coherencia entre la unidades se multiplica por 1000 debido al cambio de litros a centímetros cúbicos (Versari et al., 2007).

Por otro lado Torsi y colaboradores (1990) (Torsi, Chiavari, Laghi, & Asmundsdottir, 1990) desarrollaron un método sin estándar al derivar la ley de Lambert-Beer; debido a la facilidad del empleo de los detectores UV-vis de los cromatógrafos de líquidos. Los métodos sin estándar son de gran utilidad ya que existen compuestos naturales de los cuales sería importante conocer su concentración, sin embargo muchas veces no es posible obtenerla por medio de los métodos que emplean calibración con estándares puros (Locatelli et al., 2011).



Para realizar las determinaciones en detector UV-vis de HPLC, sin emplear previamente un estándar del antociano, se requiere conocer de las variables empleadas en el análisis. Estas son el ancho de la celda, la absorptividad molar del antociano, el flujo del cromatógrafo y la absorbancia detectada del antociano (Versari et al., 2007).

La ecuación modificada por Torsi y colaboradores de la ley de Lambert-Beer se puede observar en la Ecuación 7.

$$\text{Área} * F = 10^3 * \epsilon * b * N_0 \quad (7)$$

Donde:

Área.- Es el área bajo la curva del pico (UA.min)

F.- Flujo de la fase móvil (cm<sup>3</sup>/min)

b.- espesor de la celda (cm)

N<sub>0</sub>.- Son los moles inyectados en el cromatógrafo

10<sup>3</sup>.- Coherencia dimensional (mL/L)

Los valores de  $\epsilon$  son la primer consideración en el análisis sin calibración, donde los valores de absorbancia estén dentro de la linealidad de la curva de acuerdo a la ley de Lambert-Beer (Torsi et al., 1990).

Posteriormente Pelillo y colaboradores en 2004 (Pelillo et al., 2004), formularon que  $\epsilon$  debe ser una función de los parámetros experimentales, tomando en cuenta las unidades del instrumento empleado. Lo que llevó al desarrollo la Ecuación 8.

$$A = \frac{0.06 * l * \epsilon}{M * F} * ng \quad (8)$$





Donde:

A.- Es el área bajo la curva (UmA)

F.- Flujo de la fase móvil, cuyas unidades no se especifican en la literatura

l.- espesor de la celda (cm)

M.- Peso molecular (g/mol)

ng,- nanogramos

La Ecuación 8 puede ser empleada tanto para determinar la cantidad de compuesto de acuerdo al área bajo la curva de los picos cromatográficos, conociendo el coeficiente de absortividad molar del compuesto. Esto sería la aplicación del método sin estándar que describió Torsi y colaboradores (1990) (Torsi et al., 1990), conocido como “método absoluto de análisis”. También se puede emplear la Ecuación 8 para obtener este último empleando las áreas bajo la curva de una curva de calibración; lo cual sería una forma alternativa al método del espectrofotómetro para determinar  $\varepsilon$  (Pelillo et al., 2004). De esta manera se puede obtener el coeficiente de absortividad molar de las áreas bajo la curva de los picos inyectados en un HPLC, cuando se conoce la cantidad inyectada (Locatelli et al., 2011).

Por otra parte, se define que  $\varepsilon$  es la pendiente de la regresión de una línea recta construida empleando la masa inyectada y sus áreas bajo la curva correspondientes. Por lo que la ecuación anterior se puede reescribir en la Ecuación 9.

$$\text{Área} = \varepsilon * \frac{0.06 * b * m_0}{F * PM} \quad (9)$$

Donde:

Área.- Es el área bajo la curva del pico (U $\mu$ A.seg)

F.- Flujo de la fase móvil (mL/seg)

b.- espesor de la celda (cm)

PM.- Peso molecular (g/mol)

m<sub>0</sub>.- masa inyectada en el cromatógrafo (ng)



De la Ecuación 9 se puede deducir las Ecuaciones 10 y 11. De esta manera se puede deducir el coeficiente de absortividad molar, como la pendiente de la ecuación obtenida de graficar los resultados de las ecuaciones anteriores.

$$y = \text{Área bajo la curva} \quad (10)$$

$$x = \frac{0.06 * b * m_0}{F * PM} \quad (11)$$

Según Locatelli y colaboradores (2011) (Locatelli et al., 2011), esta metodología podría ser muy útil para obtener el coeficiente de absortividad molar de una muestra en la que no se conoce la pureza. Además, estos investigadores, mostraron una alternativa al método clásico para la obtención de  $\epsilon$ , cuando la cantidad o purezas de los estándares es poca o cuando la absorción de los compuestos se sobreponen.



## QUÍMICA *IN SILICO*

Existen diversos tipos de cálculos teóricos, dependiendo de las ecuaciones y teorías en las que se fundamenten. Estos métodos, en sus diferentes aproximaciones, pueden generar información sobre la estructura molecular, la reactividad, los estados excitados, la estructura de compuestos intermedios, sus superficies de energía potencial y la distribución de la densidad electrónica de las moléculas (A. a Freitas, Shimizu, & Quina, 2007; Nakajima, Sato, Hoshino, Yamazaki, & Saito, 2006). Dichos cálculos cuánticos se han utilizado desde hace aproximadamente dos décadas para comprender los fenómenos que ocurren a nivel molecular en los polifenoles (Bertran Rusca, Branchadell Gallo, Moreno Ferrer, & Sodupe Roure, 2002; Trouillas et al., 2015).

Algunos estudios teóricos sobre polifenoles han abarcado desde el análisis geométrico estructural, las interacciones moleculares, propiedades antioxidantes, hasta los efectos de solvatación y las propiedades ópticas (Chassaing et al., 2010; Di Meo, Sancho Garcia, Dangles, & Trouillas, 2012; Sakata, Saito, & Honda, 2006). Específicamente estas últimas, han sido calculadas por medio de métodos semi-empíricos (Kurtin & Song, 1968) y *ab initio*.

### MÉTODOS SEMI-EMPÍRICOS

Los métodos semi-empíricos se basan principalmente en las interacciones entre los electrones de valencia, sin tomar en cuenta a los electrones de capas internas de los átomos. En términos de tiempo, los métodos semi-empíricos son métodos más económicos que los *ab initio*, los cuales se explicarán más adelante (Bertran Rusca et al., 2002). Ambos formalismos usan el método variacional para resolver la ecuación de Schrödinger (Ecuación 12) y llegar a una descripción adecuada de propiedades electrónicas.

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (12)$$



Donde  $\hat{H}$  es el operador Hamiltoniano,  $\Psi$  es la función de onda y  $E$  la energía del sistema.

## MÉTODOS AB INITIO

La palabra *ab initio*, proviene del latín “desde el principio” y se emplea para nombrar a los métodos que se basan en resolver la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo sin agregar ninguna referencia experimental. Las metodologías Hartree-Fock (HF) y de DFT son considerados *ab initio* (Jensen, 2007).

## MÉTODOS BASADOS EN LA TEORÍA DE HARTREE-FOCK

El método de Hartree-Fock (HF) (Roothaan, 1951), también se sustenta en el método variacional y, en él se deduce la energía de una molécula con base únicamente en constantes universales tales como la carga y la masa de las partículas elementales, y la constante de Planck. Algunos autores le dan el nombre de método del campo autoconsistente o SCF (Self Consistent Field por sus siglas en inglés) (Bertran Rusca et al., 2002).

## CÁLCULOS BASADOS EN LA TEORÍA DE LOS FUNCIONALES DE LA DENSIDAD

Los métodos de la teoría del funcional de la densidad (DFT, por sus siglas en inglés de Density Functional Theory), tienen en cuenta la correlación electrónica mediante un proceso alternativo a los métodos HF y por ello, sin perder de vista el compromiso entre tiempo de cálculo y exactitud, es considerado una mejora (Jensen 2007).

La teoría de los funcionales de la densidad desarrollada por Hohenberg y Kohn (Hohenberg & Kohn, 1964) establece que se puede determinar la energía de un sistema conociendo la densidad electrónica de este. Por otro lado, en algunos



sistemas los funcionales puros de DFT o HF hacen aproximaciones muy pobres. Por ello, se han creado los funcionales híbridos que toman la energía exacta HF más la correlación de intercambio de DFT (Bertran Rusca et al. 2002).

## ESTUDIOS TEÓRICOS REALIZADOS A POLIFENOLES

Entre los cálculos semiempíricos realizados, destaca el de Nino y colaboradores (2000), que reportan las características estructurales y electrónicas del flavanol quercetina (Nino, Toscano, & Uccella, 2000). En este estudio se empleó el Método Amber 1 (AM1, por sus siglas en inglés de Amber Method) (Dewar, Zoebisch, Healy, & Stewart, 1985) y el Método Parametrizado 3 (PM3, por sus siglas en inglés de parametrized method 3). Además de este estudio, Justino y Vieira (2010), determinaron las estructuras electrónicas y el mecanismo de acción antioxidante de la miricitina y sus radicales derivados por medio de los métodos AM1, PM3 y PM6 (Método parametrizado 6, por sus siglas en inglés de parametrized method 6). Sobre este último método se observó que presentaba buenos resultados generales sobre la planaridad de la molécula. Además, se observó que los métodos semi-empíricos sobreestiman la energía de los aniones, como también subestiman la energía de los radicales, al compararlos con otras metodologías (Justino & Vieira, 2010).

A pesar de que en el área de los polifenoles los métodos semi-empíricos fueron los primeros para hacer cálculos teóricos, estos se han sustituido por los métodos DFT. En la actualidad solo el método semiempírico ZINDO (Por sus siglas en inglés de Zerner's Intermediate Neglect of Differential Overlap) (Ridley & Zerner, 1973), tiene importancia, ya que conserva la habilidad para manejar grupos moleculares grandes (Trouillas et al., 2015); sin embargo, como otros métodos de interacción electrónica, ha fallado para predecir las propiedades espectrales en sistemas donde existe transferencia de carga intermolecular, como ocurre en la copigmentación de antocianos (Trouillas et al., 2016).



Los métodos híbridos se han empleado ampliamente en el análisis de polifenoles. Estos métodos han sido empleados para determinar la geometría de flavonoides como la quercetina y los antocianos; para los que se emplearon los funcionales híbridos B3LYP y bases como la 3-21G(d,p), 6-31G(d,p), 6-31+G(d,p) y 6-311++G(d,p) (Botten, Fugallo, Fraternali, & Molteni, 2015; Domagała, Munshi, Ahmed, Guillot, & Jelsch, 2011; Estévez & Mosquera, 2007; Mazzone, Malaj, Russo, & Toscano, 2013; Nakajima et al., 2006).

Vallverdú y colaboradores en 2016, emplearon el TD-DFT dependiente del tiempo (TD, por sus siglas en inglés de Time Dependent) para calcular los estados excitados, tales como el orbital molecular ocupado de más alta energía (HOMO) y el orbital molecular desocupado de más baja energía (LUMO). Además, los espectros de absorción teóricos, se emplearon para el estudio de propiedades colorantes asociadas con el color de los vinos, y las interacciones entre sus pigmentos (Vallverdú-Queralt et al., 2016).

Entre las investigaciones realizadas que involucra el TD-DFT, se encuentra el de Mazzone y colaboradores (2013), en el que calculan las excitaciones electrónicas o espectro UV-vis teórico de análogos de resveratrol. En dicho estudio se aplicaron los funcionales B3LYP, PBE0 y wB77XD, siendo este último el que mostró mejor correlación con los datos experimentales. Además, la simulación de estos espectros brindó información importante sobre la energía de excitación, cubriendo los huecos experimentales. Además concluyeron, que este tipo de caracterizaciones en los mecanismos de acción de antioxidantes podrían ser de gran importancia en estudios de bioquímica y farmacología (Mazzone et al., 2013).

Otras comparaciones entre datos experimentales y teóricos en los polifenoles es el realizado a 33 compuestos, en el que se destaca la recomendación por usar el funcional híbrido B3P86 con la base 6-311+G(d,p). Gracias a esta metodología lograron correlacionar los factores estructurales de las moléculas con las transiciones ópticas (Anouar, Gierschner, Duroux, & Trouillas, 2012).



Adicionalmente a los funcionales antes citados, existen otros funcionales híbridos en los que se varía la contribución del término de intercambio HF en combinación con otros. Es decir, para estos métodos se consideran en la dependencia del funcional la densidad electrónica y su gradiente, así como la densidad de la energía cinética. Estos funcionales son conocidos como funcionales híbridos Meta GGA (Generalized Gradient Approximation). Sanchez-Bojorge y colaboradores en 2015, emplearon los funcionales híbridos M06-L, M06, M06-2X, M06-HF y M11 con PBE0 y B3LYP para modelar la cianidina y el cloruro de cianidina. Con la comparación de estas metodologías encontraron que los funcionales con menor intercambio HF tuvieron mejor correlación con los datos experimentales obtenidos en difracción de rayos X (Sanchez-Bojorge, Rodriguez-Valdez, Glossman-Mitnik, & Flores-Holguin, 2015).

Por otro lado, propiedades como la solvatación, generalmente se calculan con el modelo polarizable continuo (PCM, por sus siglas en inglés de Polarizable Continuum Model) utilizando el mismo nivel de teoría que se utiliza en la optimización geométrica. El PCM es un método en el que el soluto es embebido en una cavidad de un medio continuo caracterizado por su constante dieléctrica. En un estudio sobre propiedades antioxidantes de antocianidinas se utilizó el funcional híbrido B3LYP con la base 6-31++G(d,p), mientras que en otros se han utilizado el IEFPCM con la metodología  $\omega$ B97XD/6-31+G(d,p) (Mosquera, Estévez, & García Bugarín, 2015; Vallverdú-Queralt et al., 2016).

Las constantes químicas también se han analizado al calcular las energías libres de la termodinámica clásica. Para obtener estos valores teóricos se ha recomendado emplear funcionales híbridos, ya que los funcionales DFT fallan. La aplicación que se le ha dado es calcular los  $pK_a$  y  $pK_h$  en antocianos, en especial los del vino. Ya que, al conocer dichas constantes se puede entender mejor sobre la coloración de los antocianos, debido a que esta depende del pH de la solución. Para estos análisis se han utilizado las bases mPWP1PW91 con la base 6-31+G(d,p) (Trouillas et al., 2015).



## DOCKING MOLECULAR

Para el entendimiento y la predicción de propiedades físico-químicas de los antocianos los cálculos teóricos han llegado a ser una herramienta muy importante (Sinopoli, Calogero, & Bartolotta, 2019). Pero además de los métodos antes mencionados de DFT y *ab initio*, se ha recurrido a otras metodologías de modelación que se emplean principalmente para el desarrollo de fármacos y el análisis del metabolismo de estos. Una de estas metodologías se conoce como acoplamiento molecular, del inglés “molecular docking” (Kitchen, Decornez, Furr, & Bajorath, 2004).

El docking es el proceso de modelación del alineamiento entre dos moléculas diferentes, en el que la molécula pequeña (ligando) se ajusta a una molécula proteica de mayor tamaño (Jensen, 2007). En la actualidad, esta es una herramienta para el descubrimiento de nuevos fármacos (Meng, Zhang, Mezei, & Cui, 2011); y ha sido útil para identificar dentro de una extensa base de datos a las moléculas que son afines a los sitios activos de diversas enzimas (Taylor, Jewsbury, & Essex, 2002).

El primer paso para realizar el docking es obtener de una base de datos la estructura proteica, obtenida generalmente por cristalografía de rayos X. Luego la estructura y los posibles ligandos se emplean como entradas en el programa de docking (Mukesh & Rakesh, 2011). Los protocolos para docking pueden describirse como la combinación de una estrategia de búsqueda y una función de puntuación. Este método parece ser eficiente para predecir las preferencias y la forma de orientación de los sustratos dentro del saco catalítico. Donde se analizan las interacciones y las posiciones entre el sitio catalítico y el ligando (Dettori et al., 2018).

## ALGORITMOS DE BÚSQUEDA

Los algoritmos de búsqueda son aquellos conjuntos de operaciones sistemáticas que deben elucidar todas las posibles formas de enlace entre la enzima y el ligando. Estos





algoritmos analizan los seis grados de libertad de rotación y traslación del ligando, más los grados de libertad conformacional interna de la proteína. Sin embargo, este análisis llevaría muchos años de tiempo computacional, por lo que en la práctica el gasto computacional se limita a aplicar las restricciones y limitaciones, que permitan localizar el mínimo de energía global de una manera mas eficiente. Una aproximación de los primeros algoritmos de acoplamiento fue el tratar al ligando y enzima como cuerpos rígidos, con solo seis grados de libertad de rotación y traslación (Taylor et al., 2002).

Con el algoritmo de búsqueda se generan configuraciones que deberían incluir el modo de enlace determinado experimentalmente entre el ligando y la enzima (Taylor et al., 2002).

## **LAS FUNCIONES DE PUNTUACIÓN**

La clasificación de las posiciones generadas por los algoritmos de búsqueda son después clasificadas de acuerdo a funciones de puntuación, que se basan en la afinidad de los enlaces (Dettori et al., 2018). Esta clasificación debe ser realizada de una manera precisa y eficiente, la cual debe de distinguir las formas de enlace experimental de los modos de enlace que presenta el algoritmo de búsqueda. Además, la función de puntuación debe presentar un equilibrio entre el costo computacional y la falta de precisión que otorgan las funciones complejas (Taylor et al., 2002).

Los métodos de puntuación se pueden basar en campos de fuerza de mecánica molecular (AMBER, OPLS, CHARMM) y funciones empíricas de energía libre, entre otras. Estas funciones empíricas estiman la energía de las posiciones, en las que una energía negativa mostraría la estabilidad del sistema y con esto una mayor probabilidad de enlace (Mukesh & Rakesh, 2011; Taylor et al., 2002).

Otra forma de emplear las funciones de puntuación es realizar una puntuación de dos vías, en donde las funciones primero evalúan a la proteína y luego se emplea el



sistema de búsqueda para modificar el sistema. Para al final emplear de nuevo las funciones de puntuación y clasificar de nuevo a las estructuras (Taylor et al., 2002).

Las funciones de puntuación pueden detener deficiencias que se pueden unir a una baja resolución cristalográfica. Por último, todos los factores que ocurren en un acoplamiento molecular son complejos y existe gran dificultad en la simulación computacional (Kitchen et al., 2004).

En resumen, el proceso para efectuar el acoplamiento incluye la conformación y orientación del ligando dentro de un sitio específico de unión en la proteína. El primer paso del estudio es la aplicación de algoritmos de acoplamiento que colocan los ligandos en el sitio activo de la enzima. En esta etapa se evalúan las diferentes conformaciones y orientaciones del ligando en el sitio activo, lo cual ofrece una gran cantidad de resultados posibles. El muestreo de los grados de libertad del ligando se debe de realizar con alta precisión para determinar cual es la conformación que mejor encaja con la enzima. Los algoritmos se complementan con funciones de puntuación, con las cuales se evalúan las interacciones ligando-enzima (Kitchen et al., 2004).

El Autodock es un software gratuito, que es un buen punto de partida para observar el acoplamiento molecular. Este software emplea el simulador Monte Carlo y se basa en un algoritmo genético lamarckiano que explora el espacio conformacional de ligandos y ofrece una librería de candidatos en corto tiempo y costo computacional razonable (J. Gu, Liu, & Yu, 2011; Mukesh & Rakesh, 2011). Las orientaciones posibles se evalúan con el campo de fuerza AMBER junto con funciones de puntuación de energía libre (Mukesh & Rakesh, 2011).

## **DOCKING Y DINÁMICA MOLECULAR EN CALB**

La CalB es una de las hidrolasas más empleadas en la industria, por lo que también se ha estudiado su comportamiento por medio del docking molecular y otros modelos



de dinámica molecular. Estos estudios han abarcado desde la selectividad de la enzima hasta los complejos sustrato-enzima para probar la relación estructura-función de la enzima (Kumaresan, Kothai, & Lakshmi, 2011). Para el docking molecular, la CalB presenta una dificultad, debido a que el sitio activo es grande y mayormente hidrofóbico. Que el sitio activo sea grande implica que el muestreo espacial también será mayor para identificar la orientación más favorable ligando-proteína. A pesar de la dificultad que pueda resultar el estudio de la CalB por medio de docking, esta enzima es parte de diferentes investigaciones. Las cuales pueden emplear solo el docking o acompañado de la dinámica molecular, como se mencionó anteriormente (University of Groningen, 2020).

Una de estas investigación es la de Kumerasan y colaboradores en 2011, que se dedicó a estudiar el rol que tienen las hélices de la enzima, ya que una mutación en los aminoácidos de la hélice  $\alpha 5$  modificaría su movimiento, y por lo tanto, su actividad (Kumaresan et al., 2011).

El docking junto con un análisis de la relación cuantitativa de la estructura-actividad fueron empleados para evaluar la enantioselectividad de la CalB, ocupando una base de datos de 28 donantes de acilo. En este estudio se evaluó la contribución del donante de acilo y cinco campos de interacción molecular. Los resultados mostraron que la enantioselectividad es consecuencia de interacciones moleculares múltiples, con diferente grado de contribución, siendo la más significativa la del campo electrostático. Aunque quedó inconcluso si la interacción hidrofóbica entre el donante acilo y la proteína pudieran afectar la selectividad de la última (J. Gu et al., 2011).

Por otro lado Escorcía y colaboradores en 2014 y 2013, estudiaron la enantioselectividad en la acilación de (R,S) propanolol por medio de CalB. En este proyecto se ensayaron la acetilación y la des-acetilación de la enzima, encontrándose las formas de interacción entre cada isómero y la enzima. En estas formas de unión se encontró que el enantiómero R puede tomar una orientación más favorable hacia el sitio catalítico de la enzima. Dicha orientación propiciaría que se lleve a cabo la



acetilación del isómero R-propanolol en lugar de la del S-propanolol. Estos datos concuerdan con los resultados experimentales de la reacción, la cual fue enantioselectiva para el R-propanolol (Escorcía et al., 2014; Escorcía, Molina, Daza, & Doerr, 2013).

La acilación de proteínas ha empleado también a la CalB, por lo que ha llevado al estudio de las interacciones y orientaciones de diferentes sustratos proteicos en la cavidad catalítica de la lipasa. El docking, docking flexible y la dinámica molecular fueron utilizados para investigar la acilación selectiva del grupo  $\epsilon$ -amino. Estos estudios proveyeron información acerca de la selectividad de la enzima (Dettori et al., 2018; Ferrari et al., 2014). Ferrari y colaboradores (2014) mostraron que el bolso catalítico de la CalB prefiere cadenas largas y flexibles. De esta manera las moléculas podrían penetrar en la profundidad de la bolsa y alcanzar la triada catalítica. Otro dato importante, es que la rigidez y profundidad del sitio catalítico de la enzima podría ser la principal causa de su selectividad (Ferrari et al., 2014). Así mismo, Dettori y colaboradores (2018), encontraron que la presencia de un grupo carbonil grande puede provocar impedimento estérico, mientras que la posición  $\epsilon$  es más accesible y flexible para el sitio catalítico (Dettori et al., 2018).

En 2019 Gu y colaboradores emplearon el docking para encontrar el mecanismo de la adición aza-Michael entre anilina y acrilatos, utilizando a la CalB como catalizador. Este procedimiento ayudó a explicar el efecto de las estructuras del ligando sobre la reacción y su rendimiento. Además sugiere que el tipo de sustituyentes en el anillo bencénico de la anilina puede tener impacto en las interacciones de los intermediarios de la reacción y el sitio activo de la enzima; por lo que afectaría la estabilidad sustrato-enzima y por lo tanto el rendimiento de la reacción (B. Gu et al., 2019).

De Oliveira y colaboradores (2009) analizaron el comportamiento de la isoquercetina y de la rutina por medio de docking y dinámica molecular. Este grupo observó que el aglicón de estos flavonoides se podría estabilizar por medio de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Mientras que el azúcar de dichos flavonoides fue



estabilizado cerca del sitio catalítico. Sus resultados también mostraron que solo los hidroxilos 6'' de la Isoquercetina y 4''' de la rutina se estabilizaron cerca del sitio reactivo de la histidina y del enlace acetato-serina de la enzima. Con lo que teóricamente la esterificación esperada en esta reacción sería en dichos sitios. Estos resultados concuerdan con los productos de la acilación enzimática de la Isoquercetina y de la rutina (De Oliveira et al., 2009).

En el estudio de Christelle y colaboradores en 2011, se ofrece una explicación de por qué la lipofilización de quercetina ha podido suceder empleando la lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PCL) y no con CalB. Según los resultados del docking y dinámica molecular esto podría deberse a que la CalB tiene menor espacio en el sitio catalítico que la PCL, lo que disminuiría la distancia entre este y la quercetina, facilitando de esta manera la reacción. Mientras que la quercetina dentro de la CalB, mostró que se puede estabilizar en la zona del oxianión. Esta estabilización dificultaría el acceso y la orientación de la quercetina al sitio catalítico para que ocurra la reacción, lo cual podría explicar la especificidad de la CalB por flavonoides glicosilados (Christelle et al., 2011). Además, otros resultados experimentales pueden ser también contradictorios sobre la especificidad de la CalB sobre alcoholes primarios ya que, se ha logrado esterificar flavonoides que no poseen estos grupos en su estructura (Chebil et al., 2007; Saik et al., 2016, 2017b; Yang et al., 2019).

#### Pasos para la simulación de la lipofilización

1. Unión del ácido carboxílico a la estructura de la enzima.
2. Simulación de la reacción empleando el flavonoide.

Para definir cuales interacciones teóricas podrían sugerir una interacción experimental entre un sustrato y una enzima, se determinó que debería de existir en los resultados de interacción una distancia ligando-enzima de 4 Å (Christelle et al., 2011; De Oliveira et al., 2009).

## JUSTIFICACIÓN

La transformación estructural de los antocianos ha traído consigo cambios en sus propiedades físico-químicas. Por ejemplo, en la lipofilización química de la delphinidina 3-O-sambubiósido, algunos de sus productos perdieron el color. Además, los ésteres producidos, debido a la dificultad que presentó su purificación, solo se caracterizaron parcialmente por técnicas espectrométricas. Por esta razón, no está claro el por qué de la pérdida de color (Grajeda-Iglesias et al., 2017). Sin embargo, la explicación a este fenómeno podría explicarse por medio de la química computacional. La cual, actualmente puede ser empleada como una metodología que auxilia a entender y predecir las propiedades físico-químicas de los antocianos y compuestos relacionados (Sinopoli et al., 2019).

Por esta razón, el empleo de la química computacional, en específico de la DFT y TD-DFT, podría dar un panorama sobre lo que ocurre a nivel molecular del antociano cuando este es esterificado en distintos sitios.

Por otra parte, la lipofilización enzimática de los antocianos, al ser una reacción selectiva en el alcohol primario del azúcar, ha ofrecido un solo producto por antociano en la reacción. Lo que ha brindado mayor facilidad en la purificación y caracterización físico-química de los nuevos pigmentos producidos. Además que, los nuevos pigmentos producidos conservan su color y poseen mayor lipofilia (Cruz et al., 2016; Cruz et al., 2017). Lo que podría indicar que la lipofilización selectiva en el azúcar primario de los antocianos sería un factor para evitar la pérdida de color de los nuevos productos formados por lipofilización.

De esta manera, la lipofilización enzimática con CalB es la opción que ofrece obtener un antociano con propiedades liposolubles que mantenga sus propiedades colorantes. Además, la lipofilización selectiva facilita la purificación y caracterización físico-química con la finalidad de obtener información sobre sus posibles aplicaciones. Por último, el



empleo de *Hibiscus sabdariffa* L como materia prima, brindaría un valor agregado a este cultivo nacional al obtener los antocianos de su flor.

## HIPÓTESIS

La lipofilización química o enzimática tiene efectos sobre las propiedades de color que pueden ser explicados por cálculos teóricos.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar teórica y experimentalmente las propiedades físico-químicas de los ésteres de antocianos obtenidos por vía enzimática.

## OBJETIVOS PARTICULARES

Explicar por medio de la química computacional los cambios en las propiedades colorantes que experimentaron los ésteres de la jamaica lipofilizados por vía química.

Lipofilizar enzimáticamente los antocianos de la flor de jamaica.

Determinar las propiedades físico-químicas de los ésteres de los antocianos lipofilizados enzimáticamente.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIALES Y EQUIPOS

#### REACTIVOS

De Sigma- Aldrich fueron adquiridos:

Lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada ( $\geq 5000$  U/g recombinante, expresada en *Aspergillus niger*) (USA; Madrid, España)

Ácido hexanóico (USA)

Ácido octanóico (Madrid, España)

Tamices moleculares de 4 Å (USA; Madrid, España)

2-Metil-2-Butanol (Madrid, España)

Dodecilsulfato sódico (SDS) (Madrid, España)

El ter-butanol (J.T. Baker).

Gel de silica LiChroprep RP-18 (40-63  $\mu\text{m}$ ) (Merck; Darmstadt, Germany)

#### EQUIPOS Y SOFTWARE

Clúster en paralelo armado en fábrica (Linux, modelo X4150 Xeon 5345/8G RAM)

Gaussian09 (Linux) (Frisch et al., 2016)

GaussView 5 (Windows)

Avogadro (Mac)

SWizard (Windows)

Xcalibur 2.0.7 (Thermo Fisher Scientific)

Liofilizador BenchTop Pro (Virtis SP Scientific)

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Agilent (1100 Series, Alemania)

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Hitachi L-7100 (Merck)





Espectrómetro de masas LCQ (ThermoScientific, EUA)

Espectrómetro de masas LCQ DECA XP MAX (ThermoScientific, EUA)

## MÉTODOS

### METODOLOGÍA TEÓRICA

#### VALIDACIÓN

Se modeló en el programa GaussView la molécula de cianidina en su forma flavilio. Para la validación del modelo molecular de la cianidina, se empleó el DFT con las combinación entre los funcionales B3LYP, M06, M06-2X y los conjuntos de bases 6-31G, 6-31++G(d,p), 6-311++G(d,p). De acuerdo al funcional utilizado, se le agregó la “keyword” #m06 para las instrucciones del cálculo con el funcional M06, mientras que para el funcional M06-2X se le agregó la “keyword” #m06-2x. Además, por tratarse de cationes, todos los cálculos emplearon carga +1 y multiplicidad de singulete.

El primer cálculo realizado fue la optimización de la geometría molecular y la determinación de la ausencia de frecuencias imaginarias en fase gas a las estructuras optimizadas.

Una vez obtenida la geometría molecular de menor energía en fase gas se optimizó la geometría en fase acuosa y se determinó la ausencia de frecuencias imaginarias, empleando la variante de formalismo de ecuaciones integrales (IEF, de las siglas del inglés de Integral Equation Formalism) del modelo continuo polarizable (PCM, de las siglas del inglés de Polarizable Continuum Model) (Miertuš, Scrocco, & Tomasi, 1981; Pascual-ahuir, Silla, & Tuñon, 1994).

Por último, se compararon las distancias y ángulos obtenidos teóricamente en fase acuosa con aquellos obtenidos de difracción de rayos X del bromuro de cianidina



(Ueno, 1977). La validación entre los datos de difracción de rayos X y resultados teóricos se realizó para cada una de las combinaciones de funcionales y conjuntos de base.

## MODELACIÓN DE ANTOCIANOS

Una vez obtenida la validación de la estructura de la cianidina, esta se tomó como modelo para obtener la molécula de la delfinidina 3-O-sambubiósido. Para agregar la glucosa y xilosa, correspondientes a los azúcares del sambubiósido, se modeló por separado cada uno de estos. Posteriormente se unieron y se añadieron a la estructura de la delfinidina.

Después de obtener el modelo del sambubiósido unido a cada uno de los antocianos, se realizó la optimización geométrica y se confirmó la ausencia de frecuencias imaginarias en fase gas.

Una vez obtenida la estructura en fase gas, se empleó su archivo de salida para la optimización de geometría y el estudio de frecuencias de la fase acuosa.

## REACTIVIDAD LOCAL

Una vez obtenida la geometría molecular en estado acuoso, se realizó un análisis de reactividad local utilizando diferentes análisis de población para la delfinidina 3-O-sambubiósido, empleando el análisis natural de población (NPA, del inglés Natural Population Analysis), Mulliken y Hirshfeld. Se calcularon las reactividades con respecto a ataques nucleofílicos y electrofílicos. Para estos cálculos se emplearon los índices de Fukui, los cuales emplean las siguientes funciones (Fórmulas 13-15).

$$f_j^+ = q_j(N + 1) - q_j(N) \quad (13)$$



$$f_j^- = q_j(N) - q_j(N - 1) \quad (14)$$

Donde:

$f_j^+$ .- reactividad en ataque nucleofílico

$f_j^-$ .- reactividad en ataque electrofílico

$q_j$ .- es la carga de un átomo específico

$N$ .- valor de la energía electrónica

Cada cálculo se llevó a cabo con la carga neutra, como anión y como catión; en el caso de los antocianos debido a que son carbocationes, la carga empleada fue de +1 y la multiplicidad de 1. En el caso del análisis de carga aniónica se empleó la carga 0 y la multiplicidad de 2, mientras que en el cálculo de la energía como catión se empleó una carga +2 y multiplicidad de 2. El cálculo fue realizado en fase acuosa empleando el IEFPCM.

## ESTADOS EXCITADOS

Por medio del TD-DFT se obtuvieron los espectros teóricos del UV-vis de los antocianos y los ésteres de antocianos en fase acuosa empleando el IEFPCM. Los funcionales empleados fueron B3LYP, M06 y M06-2X con la base 6-31 ++G(d,p). Posteriormente, se obtuvieron los orbitales moleculares con el nivel de teoría que se aproximara más a los estados excitados experimentales.

El resumen de la metodología se muestra en el diagrama de la Figura 6.

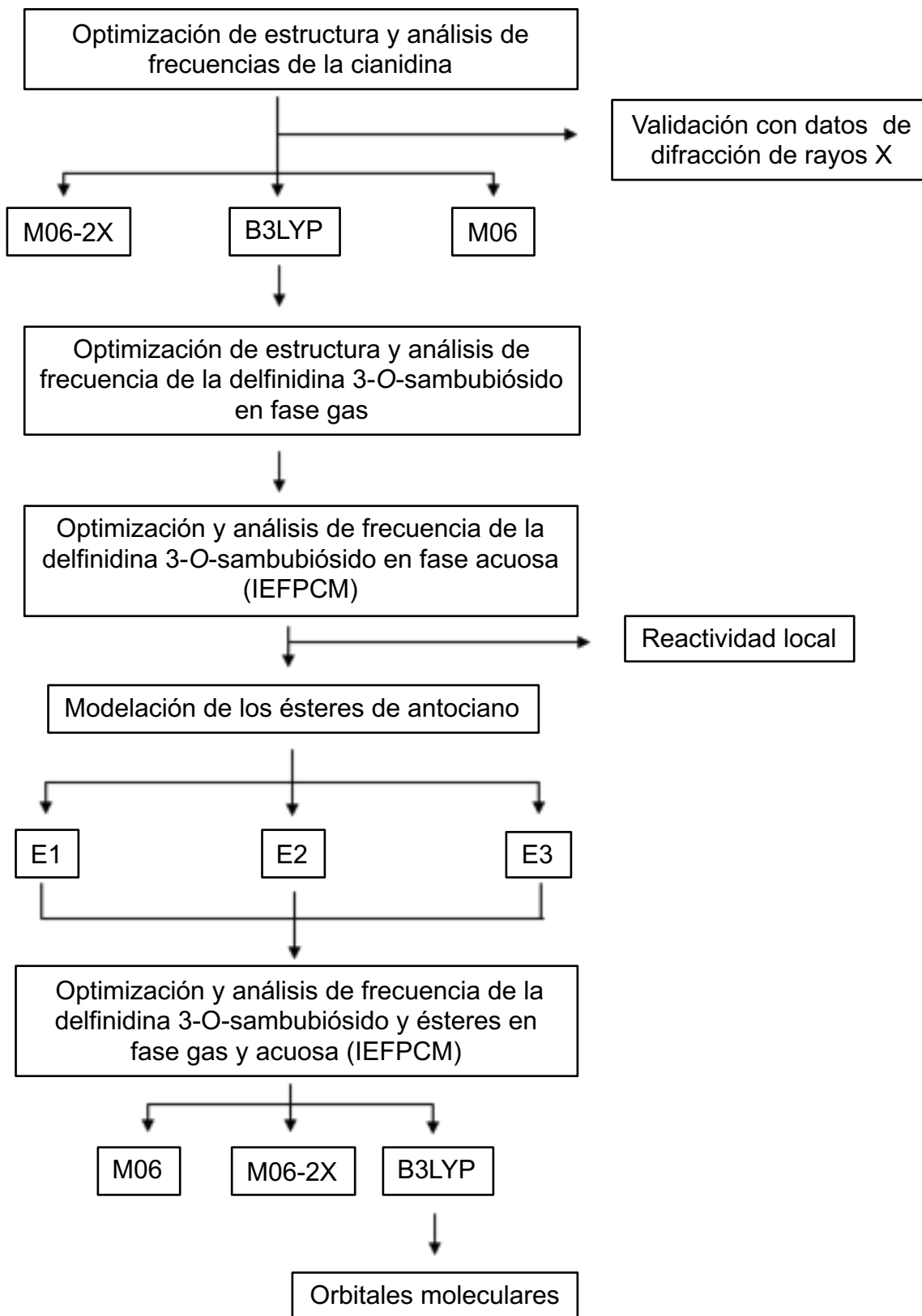


Figura 6. Diagrama de la metodología teórica.

## DOCKING RÍGIDO

Las estructuras de delfinidina 3-O-sambubiósido y malvidina 3-O-glucósido fueron optimizadas con la metodología DFT:B3LYP/6-31++g(d,p). Ambas estructuras optimizadas de delfinidina 3-O-sambubiósido y malvidina 3-O-glucósido fueron utilizadas como ligando en el docking molecular rígido por medio del software Autodock 4.0 con un algoritmo genético. La malvidina 3-O-glucósido se empleó como control, ya que la reacción de lipofilización con este antociano ya ha sido confirmada experimentalmente. La estructura cristalina de la macromolécula empleada fue la 4K6G (Xie et al., 2014) de la lipasa B de *Candida antarctica*. El primer paso fue limpiar la molécula, eliminando estructuras de etilen-glicol y agregando los hidrógenos polares. Posteriormente se realizó un docking ciego en el área total de la macromolécula, además en el sitio activo 1 y el sitio activo 2 empleando la estructura de los antocianos mencionados previamente. Los parámetros de análisis se pueden observar en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros del acoplamiento molecular rígido entre la lipasa B de *Candida antarctica* y los antocianos delfinidina 3-O-sambubiósido y malvidina 3-O-glucósido.

Parámetro	Docking ciego	Sitio 1	Sitio 2
X	126	30	30
Y	126	34	34
Z	126	26	26
Spacing center	0.747	0.375	0.375
x	8.734	-4.575	7.746
y	0.126	-5.227	-23.055
z	37.763	28.714	16.303



## METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### EXTRACCIÓN

La flor de jamaica se obtuvo del mercado local y posteriormente fue triturada en una licuadora (Oster de acero inoxidable modelo 4090) hasta obtener un polvo fino, que se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la extracción de los polifenoles. La extracción polifenólica se realizó con 200 g de flor de jamaica molida, los cuales se colocaron en 250 mL de solución agua (5% ácido acético, v/v)- etanol (80:20). La mezcla se colocó en un sonicador con una cama de hielo durante 30 minutos. Al finalizar la sonicación, el extracto se filtró y el residuo de la flor de jamaica se desechó. El extracto se concentró por rota evaporación a  $36^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

### CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANOS

Para la cuantificación de los antocianos se realizó una curva de calibración de delfinidina 3-O-sambubiósido. La delfinidina fue obtenida de un extracto de flor de jamaica que fue fraccionado y purificado en un trabajo previo (Grajeda-Iglesias, 2016). La curva se realizó con 5 soluciones diferentes de delfinidina 3-O-sambubiósido, las cuales se prepararon por diluciones seriadas a partir de una solución madre de 1000 mg/L. Todas las soluciones fueron disueltas en agua acidificada (ácido acético 5%). Las concentraciones para cada solución fueron de 62.5, 125, 250, 500 y 1000 mg/L de delfinidina 3-O-sambubiósido. Cada punto se leyó por triplicado en HPLC-DAD.

### FRACCIONAMIENTO POR EXTRACCIÓN DE FASE SÓLIDA

El fraccionamiento se realizó por medio de cromatografía de extracción de fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés de Solid Phase Extraction). La metodología se desarrolló de acuerdo a lo reportado por Grajeda-Iglesias y colaboradores en 2016 (Grajeda-



Iglesias et al., 2016), con una modificación en los solventes. Se empleó etanol en lugar de metanol, ya que el primero es más amigable con el medio ambiente. Se tomó 2 mL de extracto de jamaica diluido y se colocó en el cartucho de Sep-pak® previamente activado con etanol y equilibrado con agua (5% ácido acético, v/v). Después se le agregó sucesivamente 300 mL de agua (5% ácido acético, v/v) (F1); 200 mL de agua (5% ácido acético, v/v)-etanol (97.5:2.5) (F2); 200 mL de agua (5% ácido acético, v/v)-etanol (95:5) (F3); 50 mL de etanol (F4) y finalmente el cartucho se limpia con 50 mL de etanol. Cada una de las fracciones fue evaporada en rota vapor a 36°C. El residuo obtenido se recuperó con 2 mL de (5% ácido acético, v/v) y se almacenó a -20°C para emplearse en análisis posteriores. La pureza de las fracciones F2 y F3 se determinó por medio de HPLC/DAD, así como el contenido de antocianos.

### **FRACCIONAMIENTO POR CROMATOGRAFÍA BATCH**

El fraccionamiento del extracto de flor de jamaica se realizó por medio de cromatografía en fase reversa con gel C18 en un embudo Buchner. La silica C18 se acondicionó previamente en metanol antes de ser equilibrada con agua acidificada (ácido clorhídrico 0.1 M). Después del equilibrio se adicionó el extracto de jamaica diluido y se pasó a través del gel HCl (0.1 M) para eliminar ácidos fenólicos y azúcares. Después del lavado, se eluyó la fracción rica en delphinidina 3-O-sambubiósido con una solución 95/5 de HCl (0.1 M)/etanol (v/v). Posteriormente se limpió el gel C18 con etanol 100%, ya que la delphinidina era el único compuesto de interés. La fracción se concentró por medio de evaporación al vacío a 40 °C y se inyectó en el HPLC con columna de fase inversa C18, para determinar su grado de pureza.



## **LIPOFILIZACIÓN DE LA DELFINIDINA 3-O-SAMBUBIÓSIDO EN TERT-BUTANOL**

La lipofilización se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado por Cruz et al. (2017), empleando ter-butanol en lugar del 2-metil-2 butanol como solvente. Antes de realizar la reacción, el antociano fue disuelto en metanol acidificado (2% HCl), para asegurar que se encontrara en la forma flavilio; posteriormente se evaporó bajo presión reducida a 37°C. Después se disolvió 4 mg del cloruro de delfinidina 3-O-sambubiósido en 4 mL tert-butanol anhidro. A esta mezcla se agregó ácido hexanóico (100 equivalentes) y el tamiz molecular activado (100 g/L). Por último se agregó la lipasa inmovilizada de *Candida antarctica* B (20 g/L), con lo cual se dio inicio la reacción enzimática. La reacción se llevó a cabo en atmósfera inerte a 60°C. Antes de comenzar la reacción, se tomó una alícuota de la misma y se inyectó en el HPLC-DAD/MS. Después de iniciada la reacción se tomó una alícuota cada hora, la cual fue inyectada en el HPLC-DAD Agilent 1100 series (Alemania) con el fin de monitorear la formación del nuevo compuesto (Cruz et al., 2017).

## **LIPOFILIZACIÓN DE LA DELFINIDINA 3-O-SAMBUBIÓSIDO EN 2-METIL-2 BUTANOL**

Esta reacción al igual que la realizada en ter-butanol, se realizó de acuerdo a la metodología de Cruz y colaboradores (2017). Se disolvieron 10 mg de cloruro de delfinidina 3-O-sambubiósido en 10 mL 2 metil-2 butanol anhidro (2M2B). Después de la disolución del antociano, se agregó el ácido octanóico (C8) (100 equivalentes) y el tamiz molecular activado (100 g/L). Por último se agregó la lipasa inmovilizada de *Candida antarctica* B (40 g/L), con lo cual dio inicio la reacción enzimática. La reacción se llevó a cabo en atmósfera inerte a 60°C. Al inicio de la reacción se tomó una alícuota y se inyectó en el HPLC/DAD Hitachi. Después de iniciada la reacción se tomó una alícuota cada hora, la cual fue inyectada en el HPLC/DAD Hitachi con el fin de observar la evolución de la reacción. La reacción se detuvo al obtener la máxima conversión. La finalización de la reacción se llevó a cabo al filtrar los tamices moleculares y la enzima,





agregando metanol para recuperar los pigmentos adheridos a estos. Posteriormente, se evaporaron el metanol y el 2M2B, para por último recuperar el medio de reacción en 10 mL de metanol

## **EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO**

Después de recuperar la reacción en metanol, para eliminar los ácidos grasos en exceso de la reacción de lipofilización, se empleó la extracción líquido-líquido. Se realizaron dos extracciones con dos solventes diferentes. La primera extracción se realizó con heptano (1:1 v/v), por triplicado. Mientras que, la segunda extracción se llevó a cabo con hexano (1:1 v/v), también por triplicado. El heptano y el hexano fueron descartados. Después de confirmar la ausencia de ácidos grasos libres por medio de TLC, la fracción metanólica se evaporó a sequedad y el residuo se recuperó con agua acidificada (0.1 M HCl). La muestra se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posteriormente aislar el éster obtenido.

## **CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA**

Se realizó una TLC en sílica para determinar si los ácidos grasos excedentes de la fracción metanólica fueron eliminados con la extracción líquido-líquido. La solución eluyente fue una mezcla de hexano/acetato de etilo (4:2 v/v), en la que se colocó la mezcla de la reacción, recuperada en metanol y, un control de ácido octanóico.

## **CROMATOGRAFÍA FLASH**

La separación de los productos de la lipofilización enzimática se realizó por medio de cromatografía flash. Se empleó el gel LiChroprep RP-18 (Merck, Alemania) con una altura de columna de 23 cm. El gel se acondicionó con metanol acidificado (0.1 M de



HCl) y posteriormente se equilibró con dos volúmenes de una solución de HCl 0.1 M. Después del equilibrio, se cargó en la columna la muestra totalmente disuelta en una solución HCl 0.1M y la mínima cantidad de metanol acidificado (0.1 M de HCl). Este último se empleó debido a que los productos lipofílicos no se disuelven en agua. La separación del compuesto inicial del producto se realizó aumentando gradualmente la concentración del metanol 0.1 M. Por medio de una bomba mecánica se aplicó presión a la columna, para obtener un flujo aproximado de 3mL/min. Se recolectó y analizó por HPLC en columna C18 cada una de las fracciones obtenidas.

### **CROMATOGRAFÍA DE BAJA PRESIÓN**

Esta metodología se realizó para purificar por segunda vez el producto de lipofilización. Se empleó con gel LiChroprep RP-18 (Merck, Alemania) acondicionado con metanol acidificado (2% HCl) y equilibrada con agua acidificada (2% HCl). Se colocó la muestra empleando la mínima cantidad de metanol para disolver el nuevo antociano. Se aplicó presión por medio de una bomba peristáltica, para obtener un flujo de 1mL/min. Posterior a la aplicación del nuevo antociano en la columna, se aumentó gradualmente la cantidad de metanol acidificado (0.1 M HCl). El producto deseado se recolectó y se concentró en rotavapor a 40°C para posteriormente liofilizarse.

### **ANÁLISIS EN CROMATOGRAFÍA DE ALTA RESOLUCIÓN**

Se empleó el análisis cromatográfico para:

1. Obtener el perfil fenólico del extracto de la flor de jamaica.
2. Determinar parcialmente la pureza de las fracciones obtenidas por fraccionamiento en extracción de fase sólida.
3. Cuantificar los antocianos contenidos en el extracto bruto de la flor de jamaica y las fracciones.
4. Monitorear el avance de las reacciones de lipofilización.

## Perfil fenólico del extracto de jamaica

Las determinaciones del perfil fenólico se realizaron por medio de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés de High Performance Liquid Chromatography) Agilent 1100 Series (Alemania). Se inyectaron 10  $\mu$ L de muestra a un flujo de 0.300 mL/min con un gradiente de agua (ácido fórmico 1% v/v) (A) y acetonitrilo (B). El gradiente mencionado se puede observar en la Tabla 4. Se utilizó una columna de fase inversa SB-C18 (Zorbax Stablebond de 80Å, 2.1 x 150 mm, 3.5  $\mu$ m de diámetro de partícula) con una temperatura de columna de 30°C. Durante el análisis se empleó un módulo de arreglo de diodos Agilent 1100 series (Alemania) en las longitudes de onda de 280, 320, 360 y 520 nm.

Tabla 4. Gradiente de elución para análisis en HPLC Agilent 1100 series.

Tiempo (min)	A %	B %
0	100	0
8	90	10
10	90	10
23	80	20
30	70	30
45	60	40
50	20	80
55	0	100
60	0	100
65	100	0

El seguimiento de la reacción de lipofilización se realizó en un HPLC Hitachi L-7100 (Merck), equipado con detector de arreglo de diodos (Merck, Hitachi L7450A) y una columna de fase inversa C8 (150 mm x 2.1 mm de diámetro interno, Vydac 208TP, Grace Division Discovery Sciences). Se inyectaron 20  $\mu$ L de cada muestra a un flujo



de 0.4 mL/min con fases móviles de agua acidificada (0.5% con ácido fórmico) (%A) y acetonitrilo (%B). El gradiente que se empleó se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Gradiente de elución para HPLC Hitachi L-7100.

Tiempo (min)	A %	B %
0	100	0
5	80	20
15	0	100
25	0	100
35	100	0

## ANÁLISIS EN CROMATOGRAFÍA DE ALTA RESOLUCIÓN ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

### Espectrómetro LCQ

La reacción de la lipofilización enzimática de delphinidina 3-O-sambubiósido con ácido hexanoico se monitoreó por medio del HPLC-DAD Agilent 1100 series (Alemania), acoplado a un espectrómetro de masas LCQ (ThermoScientific, EUA). En el caso del acoplamiento HPLC-DAD/MS, se inyectaron en el HPLC 10  $\mu$ L de muestra a un flujo de 0.250 mL/min con un gradiente de agua (ácido fórmico 1% v/v) (A) y acetonitrilo (B). La ionización de la muestra en el espectrómetro se llevó a cabo por medio de ionización en electrospray (ESI, por sus siglas en inglés de ElectroSpray ionization) en modo positivo.

### Espectrómetro LCQ DECA XP MAX

Para el monitoreo de la reacción de delphinidina 3-O-sambubiósido con ácido octanóico se empleó un HPLC Finnigan Surveyor series acoplado a un espectrómetro de masas



LCQ DECA XP MAX. La columna, las fases móviles y demás parámetros de la cromatografía son los utilizados en el seguimiento de reacción de la lipofilización de delfonidina 3-O-sambubiósido y ácido octanóico. La ionización se realizó con una fuente ESI con un voltaje de evaporación y de capilar de 5 kV y 4 kV , respectivamente.

### ABSORTIVIDAD MOLAR $\varepsilon$

La determinación del coeficiente de absorptividad molar para la delfinidina 3-O-sambubiósido se determinó por medio del método HPLC-DAD reportado por Pelillo y colaboradores (2004) (Pelillo et al., 2004). El método consiste en graficar las áreas de la curva, tomadas a 520 nm, a diferente concentración (abscisa) contra los valores que representan el termino dependiente de la Ecuación 9 (ordenadas).

$$\text{Área} = \varepsilon * \frac{0.06 * b * m_0}{F * PM} \quad (9)$$

Para obtener los valores de los terminos dependientes (y), se empleó la Ecuación 10 y, para los términos dependientes la Ecuación 11.

$$y = \text{área bajo la curva} \quad (10)$$

$$x = \frac{0.06 * b * m_0}{F * PM} * 1000 \quad (11)$$

Donde:

Área.- Es el área bajo la curva del pico (U $\mu$ A.seg)

PM.- Peso molecular (g/mol)

m<sub>0</sub>.- masa inyectada en el cromatógrafo (ng)

b.- 1 cm

F.- Flujo del cromatógrafo (cm<sup>3</sup>/s)

1000.- Coherencia dimensional



Para los cálculos de  $\varepsilon$ , en el método del espectrofotómetro se emplea la ley de Lambert-Beer y el peso del antociano, incluyendo el cloro como contra-ión, y una molécula de agua de la hidratación (Giusti et al., 1999).

## CINÉTICA QUÍMICA

Para determinar el orden de reacción en la desaparición y aparición de componentes en la reacción de lipofilización se graficaron las concentraciones de estos a diferentes tiempos de acuerdo a las ecuaciones 15, 16 y 17. Estas ecuaciones corresponden a cinéticas de orden cero, primero y segundo, respectivamente.

$$[A]_t = -kt + [A]_0 \quad (15)$$

$$\ln [A]_t = -kt + \ln [A]_0 \quad (16)$$

$$\frac{1}{[A]_t} = kt + \frac{1}{[A]_0} \quad (17)$$

## RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Se realizó la resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas del inglés Nuclear Magnetic Resonance) a la mezcla de los dos productos de lipofilización. El espectro del  $^1\text{H}$  NMR (600.13 MHz) y del  $^{13}\text{C}$  NMR (125.77 MHz) se obtuvieron en un espectrometro Bruker-Avance 600 a 303 K. La muestra fue disuelta en DMSO-d<sub>6</sub>/ TFA (9:1) con TMS como estándar interno (Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se cuantificaron en partes por millón y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) en Hertz ). Los desplazamientos químicos del  $^1\text{H}$  fueron asignados empleando espectrometría de



correlación (COSY) en 2D, mientras que solo se empleó tecnologías gHMBC y gHSQC para el  $^{13}\text{C}$ . El delay para el rango largo del acoplamiento C/H se optimizó a 7 Hz.

## LIPOFILICIDAD

El coeficiente de partición octanol-agua ( $\text{Log } P$ ) experimental se determinó por medio de el método de agitación de matraz. El *n*-octanol fue pre-saturado con HCl 0.1M por más de 24 horas. La delfinidina 3-*O*-sambubiósido y la delfinidina 3-*O*-sambubiósido-C8 se disolvieron en 1 mL de *n*-octanol, respectivamente. Posteriormente se agregó 1 mL de agua acidificada (HCl 0.1 M) a cada vial para alcanzar una concentración final de 0.17 mM. Posteriormente, el vial se mantuvo en agitación durante 1 h para luego dejar reposar por 24 h y permitir el equilibrio de los solutos entre las fases. Luego de alcanzar el equilibrio, se emplearon jeringas para extraer muestras de cada una de las fases (Cruz et al., 2017). Cada una de las muestras fue analizada por espectroscopia UV-vis y se tomaron las absorbancias a 520 nm. El  $\log P_{oa}$  se calculó empleando la Ecuación 18.

$$\log P_{oa} = \log \frac{A_{\text{octanol}}}{A_{\text{agua}}} \quad (18)$$

## PARÁMETROS TERMODINÁMICOS O SALTOS DE PH.

Las propiedades termodinámicas y las constantes de las cinéticas de la delfinidina 3-*O*-sambubiósido (DpS) y la delfinidina 3-*O*-sambubiósido-C8 (DpS-C8) se determinaron por medio de el método de saltos de pH (Brouillard et al., 1978).

Debido a que el éster de antociano DpS-C8 es poco soluble en agua, la metodología se realizó en una solución micelar de SDS, de acuerdo a la metodología reportada por Mendoza y colaboradores en 2018 (Mendoza et al., 2018).



Se preparó la solución de buffer universal de Theorell Stenhagen, disolviendo 2.25 mL de ácido fosfórico (85 % p/p), 7 g de ácido cítrico monohidratado, 3.54 g de ácido bórico y 343 mL de NaOH 1M en 1L de agua destilada.

Se prepararon diferentes soluciones a diferente pH, empleando HCl (1M) y NaOH (0.1 o 1 M).

Se preparó una solución stock 0.3 mM de la DpS y el éster DpS-C8 en una solución 0.1 M de SDS con HCl 0.1 M (pH~ 1).

Para alcanzar una concentración en cubeta de 0.1 mM de la DpS y del éster DpS-C8 se adicionaron 300  $\mu$ L de cada solución stock, 300  $\mu$ L de buffer universal de Theorell Stenhagen al pH deseado y 300  $\mu$ L de NaOH 0.1 M. La absorbancia UV-vis de estos saltos de pH directos, al adicionar NaOH, fue monitoreada por medio de un espectrofotómetro Thermo Evo Array (Waltham, MA); hasta que el pseudo-equilibrio fue alcanzado. Después de esto, todas las soluciones fueron dejadas para alcanzar el equilibrio final, después de 24 h. El pH final de las muestras se obtuvo por medio de un potenciómetro con microprocesador (pH 320). Los valores de  $pK'_a$  y  $pK^a$  se determinaron graficando la absorbancia experimental contra el pH, empleando el herramienta de Excel Solver (Guimarães et al., 2018).





## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### RESULTADOS TEÓRICOS

#### VALIDACIÓN

Las distancias entre los átomos en las estructuras dadas por las diferentes metodologías se compararon con las distancias interatómicas del bromuro de cianidina obtenidas por medio de difracción de rayos X. Las mejores correlaciones se obtuvieron con la base 6-31++G(d,p) (Tabla 6) y con el funcional B3LYP, con una  $R^2 = 0.9329$ .

Tabla 6. Distancias interatómicas experimentales\* (Ueno, 1977) y teóricas de diferentes metodologías para la aglicona Cianidina.

Distancias (Å)	6-31++G(d,p)			
	Experimental	B3LYP	M06-2X	M06
C2-C1'	1.453	1.451	1.453	1.427
C4a-C5	1.432	1.432	1.429	1.411
C1'-C2'	1.409	1.417	1.411	1.413
C6-C7	1.413	1.418	1.417	1.401
C2-C3	1.396	1.408	1.402	1.410
C3'-C4'	1.400	1.415	1.411	1.394
C4-C4a	1.382	1.399	1.396	1.404
C6'-C1'	1.404	1.411	1.402	1.415
C4a-C8a	1.408	1.421	1.414	1.393
C7-C8	1.387	1.398	1.392	1.427
$R^2$	-	0.9329	0.9185	0.9193

Nota. \* Datos de difracción de rayos X

## REACTIVIDAD LOCAL

La reactividad local se determinó por medio del análisis poblacional de Mulliken, carga natural (NPA) y Hirshfeld. Este último fue el que mejores resultados mostró. En la Figura 7 se observan los sitios nucleofílicos y electrofílicos de la delfinidina 3-O-sambubiósido y sus ésteres. Con un círculo se muestran los sitios nucleofílicos y con la flecha azul los sitios electrofílicos de las moléculas mencionadas. En el caso de los sitios nucleofílicos, la ubicación corresponde con lo que se presenta experimentalmente, en la posición del C4 en el anillo C. Por otra parte, los resultados teóricos muestran el sitio electrofílico en el oxígeno del C4', en la delfinidina 3-O-sambubiósido y en el E3, mientras que el E1 y E2 presentan este sitio en el C7. Sin embargo, solo estos últimos coinciden con los resultados experimentales (V. de Freitas & Mateus, 2006; Fulcrand, Atanasova, Salas, & Cheynier, 2004).

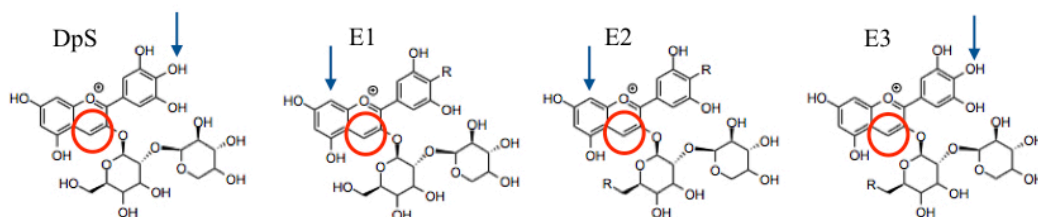


Figura 7. Reactividad teórica local de la delfinidina 3-O-sambubiósido.

## MODELACIÓN DE ANTOCIANOS

La modelación de la estructura de los ésteres de antocianos se determinó de acuerdo a los resultados de reactividad local y espectrometría de masas. Los resultados experimentales de espectrometría de masas se tomaron de la lipofilización química realizada por Grajeda-Iglesias y colaboradores en 2017 (Grajeda-Iglesias et al., 2017).

En la Figura 8(a) se puede observar un pico con el ion molecular a 729 m/z, el cual corresponde a la delfinidina 3-O-sambubiosido mono-éster, mientras que el pico a 479



$m/z$  indica la pérdida de 294  $m/z$  lo cual corresponde al aglicón más la cadena alifática; por lo que se concluye que la lipofilización ocurrió en la aglicón. De esta manera, conjugando los resultados del sitio electrofílico teórico y los resultados de espectrometría de masas, que indicaron que la cadena alifática se colocó en el aglicón, se realizó el modelo del éster 1 (E1). Por otra parte, tomando los mismos datos teóricos y la información espectrométrica de la di-esterificación en el aglicón y el sambubiósido, se modeló el éster 2 (E2). La conformación del di-éster por espectrometría de masas se pudo deducir al observar un ion molecular con 849  $m/z$  y una pérdida de 420  $m/z$ , con lo que se concluyó que ocurrió una lipofilización tanto en el aglicón como en el sambubiósido (Figura 8(b)). Por último, el éster 3 (E3) se modeló de acuerdo a la información de espectrometría de masas. Esta información se puede observar en la Figura 8(c), la cual muestra un pico con el ion molecular 723  $m/z$  y una pérdida de 420  $m/z$ , lo que indicó que la esterificación tuvo lugar en el sambubiósido.

De esta manera se empleó la metodología DFT:B3LYP/6-31++G(d,p) para determinar la estructura geométrica de la delfinidina 3-O-sambubiósido y tres de los posibles ésteres obtenidos por lipofilización química, que se muestra en la Figura 9. Además, el análisis de frecuencias realizado a cada estructura no mostró frecuencias imaginarias.

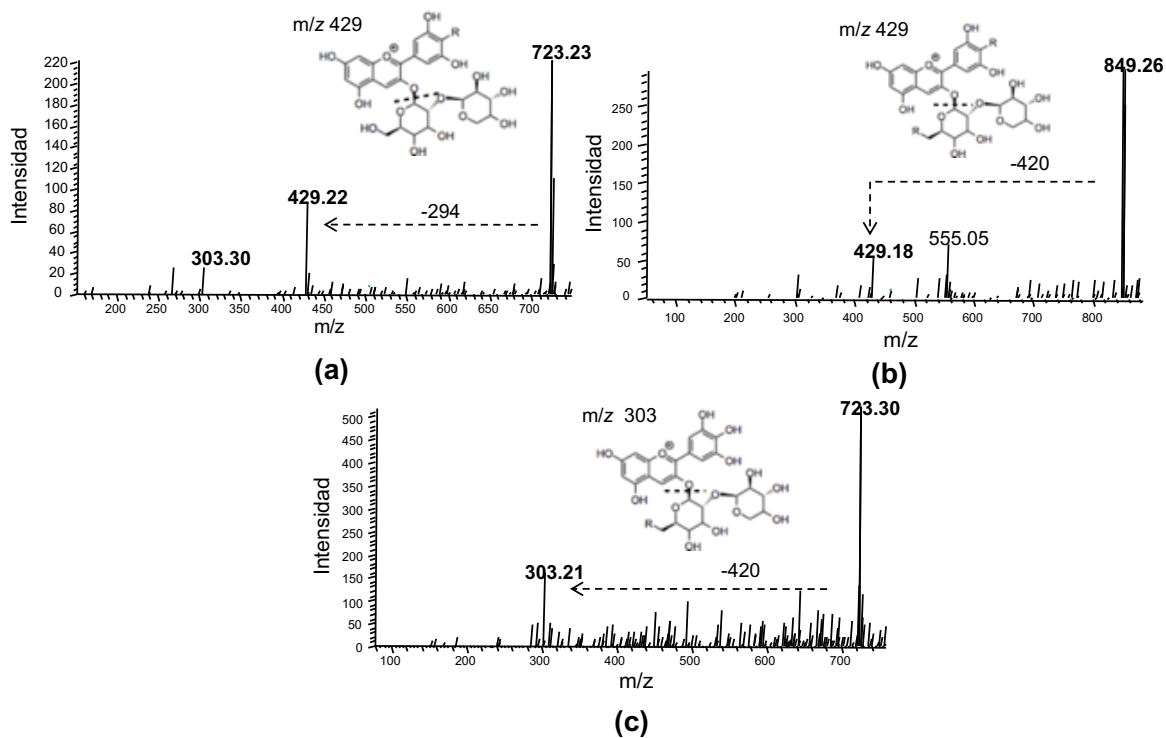


Figura 8. Espectrometría de masas Full-scan (+) ESI del monoéster E1(a), di-éster E2 (b) y monoéster E3 (c).

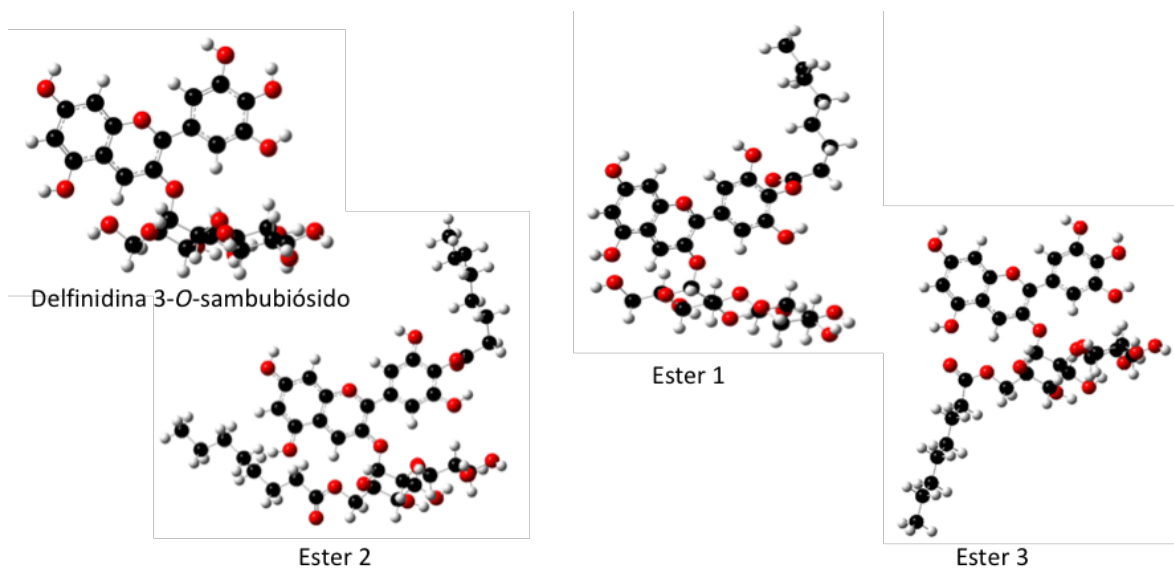


Figura 9. Estructuras finales de la delfinidina 3-O-sambubiósido y los ésteres de antocianos obtenidos por lipofilización química.

## ESTADOS EXCITADOS

### Nivel de teoría TD-DFT:B3LYP/6-31++G(d,p)

Los estados excitados de la delfinidina 3-O-sambubiósido y los ésteres de antociano fueron calculados con el nivel de teoría TD-DFT:B3LYP/6-31++G(d,p) en fase acuosa. El cálculo mencionado arrojó como resultado una longitud de onda de máxima absorbancia de 487.7 nm para la delfinidina 3-O-sambubiosido (Tabla 7). Este valor está desfasado del experimental, el cual es de 526 nm. Sin embargo, este desfase ocurre en cualquier cálculo teórico, por lo que se explora cual metodología puede explicar o representar mejor los resultados experimentales. En la Tabla 7 se muestran también la fuerza del oscilador y las principales transiciones electrónicas para la delfinidina 3-O-sambubiósido y los ésteres de delfinidina. Las transiciones electrónicas se pueden entender como los niveles energéticos por los que pasan los electrones de la molécula al recibir excitación. Por otra parte, se sabe que las transiciones pueden ir desde el orbital molecular ocupado de mayor energía (HOMO, por sus siglas en inglés de Highest Occupied Molecular Orbital) al orbital molecular desocupado de menor energía (LUMO, por sus siglas en inglés de Lowest Unoccupied Molecular Orbital), abreviado por H-0→L+0. De esta manera, para la delfinidina, en la Tabla 7 se puede observar que la fuerza del oscilador con mayor valor se presenta en la transición electrónica del H-0→L+0 (considerada como la más probable). Este resultado también se ha visto en trabajos previos que han analizado los estados excitados de los antocianos (Sanchez-Bojorge et al., 2015; Woodford, 2005). Se puede observar también que en los ésteres de delfinidina E1, E2 y E3, el oscilador con mayor fuerza es el que corresponde a la transición electrónica de H-0→L+0 (considerada como la más probable).

En la Figura 10 se pueden observar los espectros de absorción experimentales y los resultados teóricos de los estados excitados, fuerza del oscilador y longitud de onda de la delfinidina y los ésteres de delfinidina. En cuanto a los resultados experimentales,

se puede distinguir la diferencia entre el espectro de absorbancia experimental de la delfinidina y los ésteres obtenidos por lipofización química (Insertos de la Figura 10). Los ésteres de antocianos sufrieron un efecto hipocrómico diferente, según el sitio de lipofización, de esta manera el E2 presentó el efecto hipocrómico mas severo, seguido por el E1, mientras que el efecto del E3 fue moderado.

Tabla 7. Longitud de onda de absorción vertical ( $\lambda$ ), fuerza del oscilador ( $f$ ) y las principales transiciones electrónicas para la delfinidina 3-O-sambubiósido, calculados con el nivel de teoría DFT:B3LYP/6:31++G(d,p).

Molécula		$\lambda_{\text{calc}}$ (nm)	Fuerza del oscilador ( $f$ )	Transiciones electrónicas	
DpS	1	487.7	0.5409	H-0→L+0 (+92%)	H-2→L+0 (+7%)
	2	463	0.0273	H-1→L+0 (+98%)	
	3	422	0.1237	H-2→L+0 (+89%)	H-0→L+0 (+8%)
E1	1	484.0	0.0417	H-1→L+0 (+85%)	H-0→L+0 (+14%)
	2	478.1	0.3598	H-0→L+0 (+76%)	H-1→L+0 (+15%) H-2→L+0 (+8%)
	3	410.7	0.2969	H-2→L+0 (+89%)	H-0→L+0 (+9%)
E2	1	485.4	0.0265	H-1→L+0 (+90%)	H-0→L+0 (+9%)
	2	477.6	0.3769	H-0→L+0 (+81%)	H-1→L+0 (+10%) H-2→L+0 (+8%)
	3	411.2	0.2943	H-2→L+0 (+89%)	H-0→L+0 (+9%)
E3	1	486.9	0.5391	H-0→L+0 (+91%)	H-2→L+0 (+7%)
	2	463.5	0.028	H-1→L+0 (+99%)	
	3	422.4	0.1212	H-2→L+0 (+89%)	H-0→L+0 (+8%)

Nota. Delfinidina 3-O-sambubiósido  $\lambda_{\text{max}}=526$  nm

Por otra parte, el análisis de los resultados teóricos muestra que en el E1 y E2 ocurrió un desplazamiento batocrómico de los estados excitados, en comparación con los estados excitados de la delfinidina. Además, entre la delfinidina y el E1 (Figura 10(a)), el primer estado excitado de la primera tiene una fuerza de oscilador mayor que el primer estado excitado del E1, el cual tiene el segundo estado excitado con la fuerza del oscilador más alta, contrario a la delfinidina.

Este mismo comportamiento se puede observar entre la delfinidina y el E2, pero no así entre la delfinidina y el E3, los cuales tienen los estados excitados muy similares. De acuerdo con lo que se observó en la Tabla 7 y Figura 10, podría parecer que con la adición de una cadena alifática en el aglicón los estados excitados y fuerza del oscilador cambian. Sin embargo, la disminución en la fuerza del oscilador y un cambio en las transiciones electrónicas de los dos primeros estados excitados se puede deber a un deslizamiento hipsocrómico del primer estado excitado, simultaneo a un deslizamiento batocrómico del segundo estado excitado, ya que las transiciones electrónicas coinciden para los estados excitados. Este cambio en los estados excitados y el efecto que puede causar un cambio en los sustituyentes se ha observado en el estudio teórico de piranoantocianos, en el que el sitio de desprotonación podía modificar el espectro UV-vis teórico del compuesto (Vallverdú-Queralt et al., 2016).

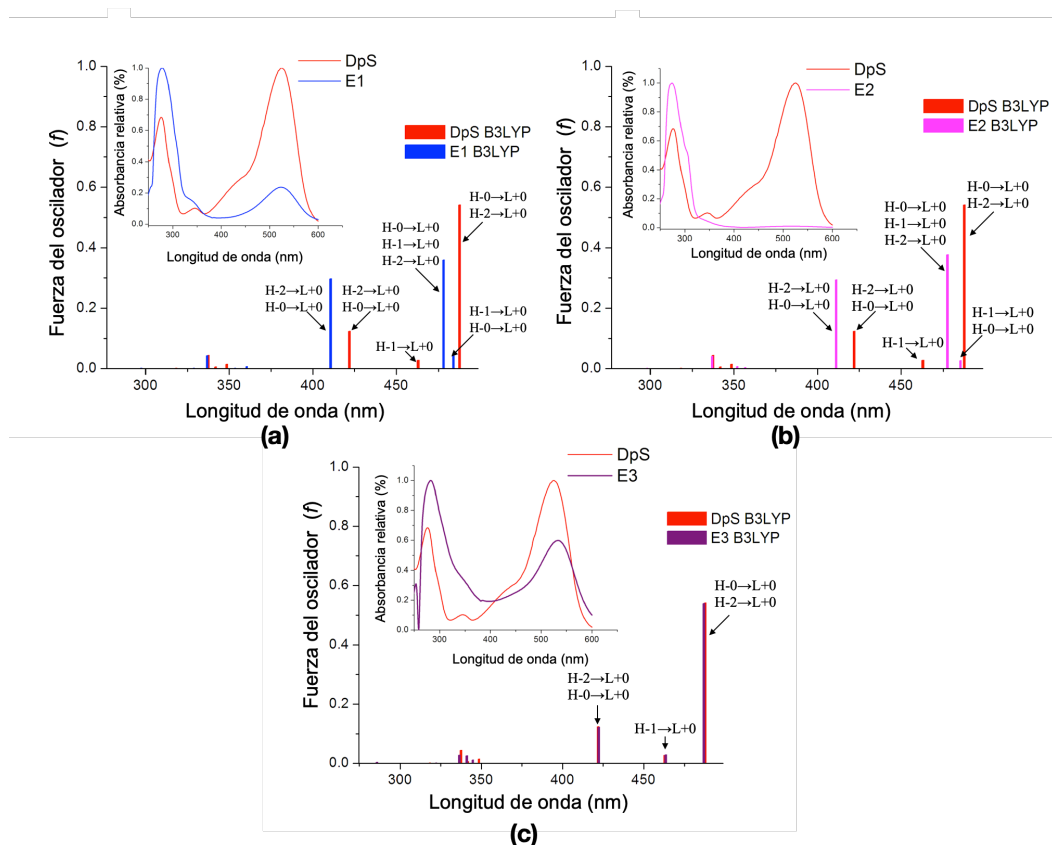


Figura 10. Espectro de absorción de la delfinidina 3-O-sambubiósido calculado con el nivel de teoría DFT:B3LYP/6:31++G(d,p): (a) mono-éster E1, (b) di-éster E2, (c) mono-éster E3 (Los insertos muestran la comparación del espectro de absorción UV-vis experimental entre la delfinidina 3-O-sambubiósido y el E1 (a), E2 (b) y E3(c)).

### Nivel de teoría TD-DFT:M06/6-31++G(d,p)

Además del análisis del espectro UV-vis con la metodología TD-DFT:B3LYP/6-31++G(d,p), se empleó el nivel de teoría TD-DFT:M06/6-31++G(d,p) en fase acuosa. Los resultados de los estados excitados, fuerza del oscilador y transiciones electrónicas para dicha metodología se pueden observar en la Tabla 8. La longitud de máxima absorbancia teórica para la delfinidina 3-O-sambubiósido fue de 479.9 nm, una longitud de onda mucho menor que la calculada con la metodología B3LYP. De igual manera, las longitudes de onda de los ésteres de antociano también mostraron un deslizamiento hipsocrómico, lo cual indica que se alejaron más de la  $\lambda_{max}$  de la delfinidina (526 nm).

Tabla 8. Longitud de onda de absorción vertical ( $\lambda$ ), fuerza del oscilador ( $f$ ) y las principales transiciones electrónicas para la delfinidina 3-O-sambubiósido, calculados con el nivel de teoría DFT:M06/6:31++G(d,p).

Molécula		$\lambda_{calc}$ (nm)	Fuerza del oscilador ( $f$ )	Transiciones electrónicas	
DpS	1	479.9	0.5886	H-0→L+0 (+93%)	H-2→L+0 (+7%)
	2	442.9	0.0137	H-1→L+0 (+99%)	
	3	407.8	0.1136	H-2→L+0 (+89%)	H-0→L+0 (+7%)
E1	1	470.4	0.438	H-0→L+0 (+92%)	H-2→L+0 (+7%)
	2	458.7	0.0151	H-1→L+0 (+99%)	
	3	398.1	0.272	H-2→L+0 (+89%)	H-0→L+0 (+8%)
E2	1	469.9	0.438	H-0→L+0 (+92%)	H-2→L+0 (+7%)
	2	460.1	0.0167	H-1→L+0 (+99%)	
	3	398.5	0.2719	H-2→L+0 (+89%)	H-0→L+0 (+8%)
E3	1	469.9	0.475	H-0→L+0 (+91%)	H-2→L+0 (+8%)
	2	465.5	0.0094	H-1→L+0 (+99%)	
	3	402.7	0.1793	H-2→L+0 (+87%)	H-0→L+0 (+8%)

Nota. Delfinidina 3-O-sambubiósido  $\lambda_{max}$ =526 nm



Por otro lado, el primer estado excitado es el que mayor fuerza del oscilador presenta, y este a su vez se refiere a la transición electrónica de H-0→L+0, tanto para la delfinidina como para los tres ésteres. Sin embargo, empleando el funcional M06 no ocurre el intercambio de estados excitados predicho con la metodología que empleó el funcional B3LYP (Figura 11).

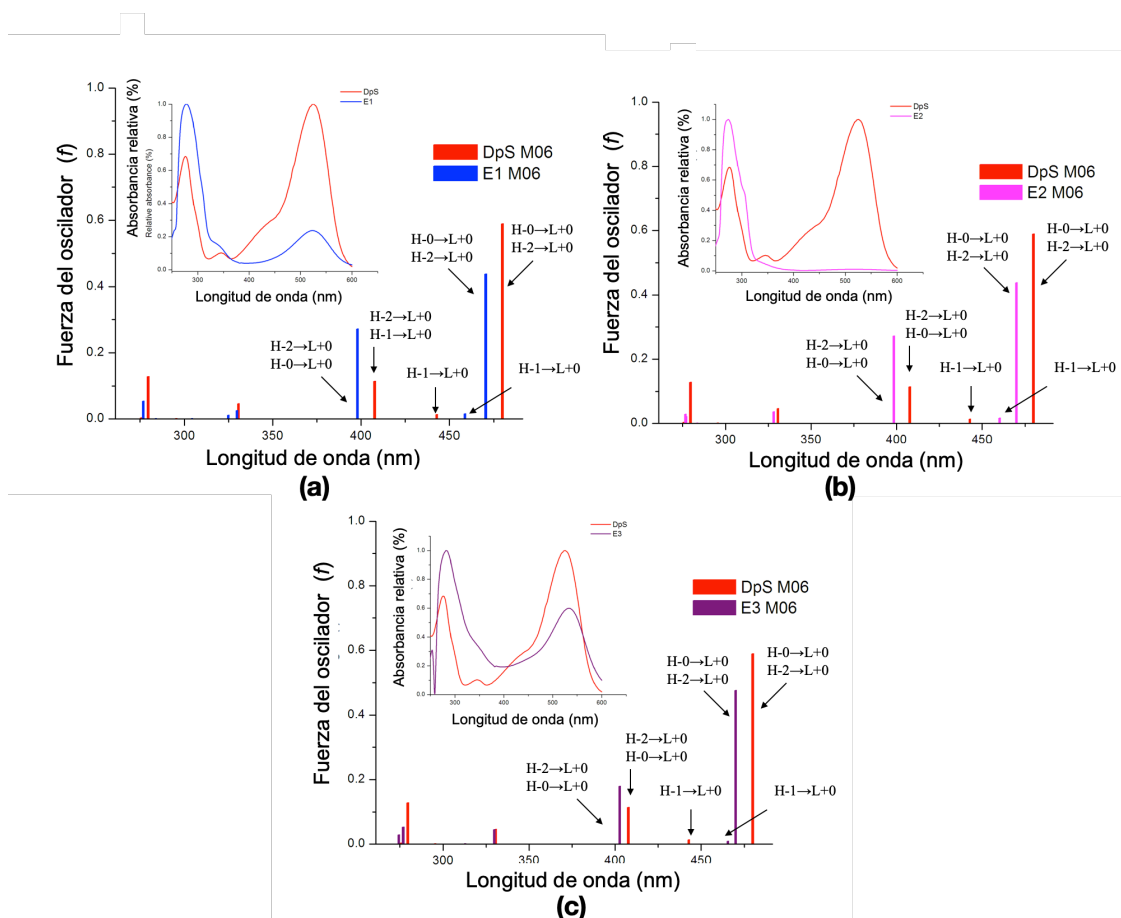


Figura 11. Espectro de absorción de la delfinidina 3-O-sambubiósido calculado con el nivel de teoría DFT:M06/6:31++G(d,p): (a) mono-éster E1, (b) di-éster E2, (c) mono-éster E3 (Los insertos muestran la comparación del espectro de absorción UV-vis experimental entre la delfinidina 3-O-sambubiósido y el E1 (a), E2 (b) y E3(c)).

### Nivel de teoría DFT:M062X/6-31++G(d,p)

Además de emplear la metodología con los funcionales B3LYP y M06, también se empleo el funcional Meta GGA M06-2X, con el conjunto de base 6-31++G(d,p) para evaluar el efecto de este funcional sobre el espectro UV-vis teórico de la delfinidina y

sus ésteres. En esta metodología la longitud de onda de máxima absorbancia calculada para la delfinidina fue de 426.9 nm, un valor mucho menor del que se obtuvo con los funcionales B3LYP y M06. Este valor obtenido se aleja del resultado experimental de la delfinidina por 100 nm, lo cual se atribuye al porcentaje de potencial HF del funcional M06-2X, que es de 54%.

Las longitudes de onda de máxima absorbancia de los ésteres presentaron también un deslizamiento hipsocrómico (Tabla 9). Además, se puede observar que el primer estado excitado de la delfinidina y los ésteres de delfinidina muestran el primer estado excitado con la mayor fuerza del oscilador. Así también, el primer estado excitado presenta la transición electrónica H-0→L+0 como la más probable.

Tabla 9. Longitud de onda de absorción vertical ( $\lambda$ ), fuerza del oscilador ( $f$ ) y las principales transiciones electrónicas para la delfinidina 3-O-sambubiósido, calculados con el nivel de teoría DFT:M06-2X/6:31++G(d,p).

Molécula		$\lambda_{\text{calc}}$ (nm)	Fuerza del oscilador ( $f$ )	Transición electrónica	
DpS	1	436.9	0.6474	H-0→L+0 (+92%)	H-2→L+0 (+6%)
	2	357.2	0.1095	H-1→L+0 (+50%)	H-2→L+0 (+39%)
	3	350.3	0.0532	H-2→L+0 (+49%)	H-1→L+0 (+46%)
E1	1	429.5	0.545	H-0→L+0 (+93%)	H-2→L+0 (+6%)
	2	373.5	0.0188	H-1→L+0 (+97%)	
	3	349.7	0.2484	H-2→L+0 (+86%)	H-0→L+0 (+5%)
E2	1	428.9	0.5452	H-0→L+0 (+93%)	H-2→L+0 (+6%)
	2	374	0.0182	H-1→L+0 (+97%)	
	3	349.8	0.2515	H-2→L+0 (+85%)	H-0→L+0 (+5%)
E3	1	429.8	0.5582	H-0→L+0 (+91%)	H-2→L+0 (+7%)
	2	378.1	0.0161	H-1→L+0 (+97%)	
	3	352.5	0.1833	H-2→L+0 (+83%)	H-0→L+0 (+7%)    H-4→L+0 (+5%)

Nota. Delfinidina 3-O-sambubiósido  $\lambda_{\text{max}}=526$  nm

De igual manera, como sucedió anteriormente con la metodología que empleó el funcional M06, no hubo intercambio de estados excitados en ninguna de las moléculas (Figura 12).

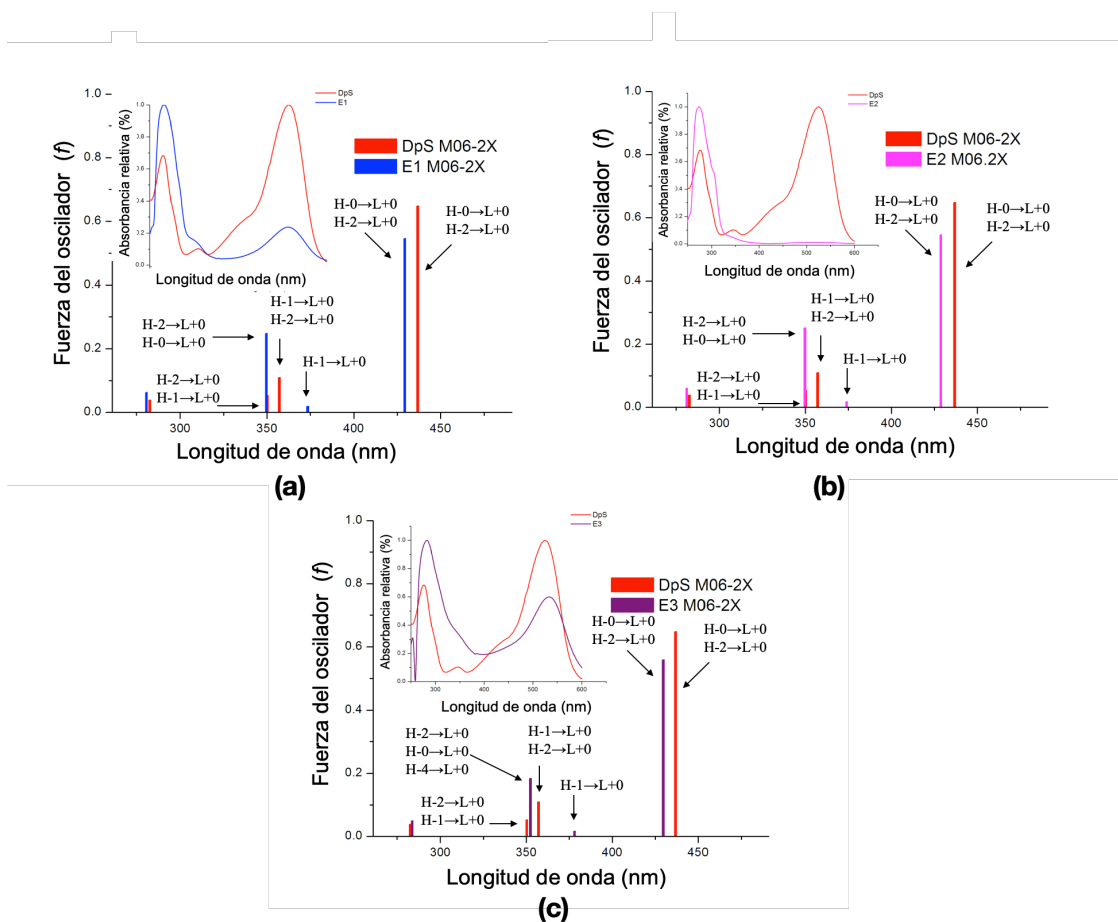


Figura 12. Espectro de absorción de la delphinidina 3-O-sambubiósido calculado con el nivel de teoría DFT:M06-2X/6:31++G(d,p): (a) mono-éster E1, (b) di-éster E2, (c) mono-éster E3 (Los insertos muestran la comparación del espectro de absorción UV-vis experimental entre la delphinidina 3-O-sambubiósido y el E1 (a), E2 (b) y E3(c)).

## ORBITALES MOLECULARES

Una vez que se determinó que la metodología TD-DFT:B3LYP/6-31++G(d,p), describía de mejor forma el espectro de absorción del antociano y sus ésteres, se



realizaron los cálculos de energía para hacer un mapeo electrónico de los orbitales moleculares.

El mapeo de orbitales moleculares para la delfinidina y sus ésteres se realizó con la principal transición electrónica encontrada en los antocianos, que es la de HOMO-LUMO. Esta transición electrónica es la observada en los resultados del cálculo del espectro UV-vis teórico y de trabajos previos. En la Figura 13 se puede observar cómo la nube electrónica abarca toda la superficie del aglicón, mientras que la sección del sambubiósido queda despejada. Esto nos indica que en la transición electrónica en la que se ve involucrado el fenómeno de color no interviene el sambubiósido, como tampoco en las cadenas alifáticas. En general, no se observan cambios significativos sobre la nube electrónica entre las diferentes moléculas estudiadas. Sin embargo, en el LUMO las moléculas de delfinidina y el E3 muestran una nube en el O5' que las del E1 y E2 no presentan.

También se puede observar en la Figura 13, la diferencia de energía entre el HOMO y el LUMO. Esta diferencia de energía entre orbitales es la energía necesaria para pasar del estado basal al excitado y conferir el color a la molécula. La diferencia de energía HOMO-LUMO para la delfinidina es de 2.852 electronvolts (eV), la cual es similar a lo reportado previamente por Rustioni y colaboradores (Rustioni, Di Meo, Guillaume, Failla, & Trouillas, 2013) de 2.87 eV. También se pueden observar las diferencias de energía de los ésteres de delfinidina, los cuales son: 3.019 eV para E1, 3.024 eV para E2 y 2.984 eV para E3. Como se puede ver en estos valores, el E3 es el valor más parecido a la delfinidina. En cuanto a los ésteres 1 y 2, la diferencia de energía con respecto a la delfinidina es mayor, sin embargo, es similar entre ellos.

Por otra parte, al comparar estos resultados con los resultados de reactividad local, se puede observar la relación de los sitios reactivos con los orbitales moleculares. De esta manera, el sitio electrofílico se relaciona con dónde se encuentra la mayor densidad del LUMO y, el sitio nucleofílico con la mayor densidad de HOMO.

Por último, se puede observar que las propiedades moleculares teóricas de la delfinidina, al ser esterificada en el sambubiósido, son muy similares a los de la delfinidina. Resultado que ha sido diferente cuando la esterificación sucede en el cuerpo del aglicón. Tanto los resultados de reactividad, como los orbitales moleculares, pueden aclarar que un pequeño cambio en las transiciones electrónicas podría modificar las propiedades macroscópicas de las moléculas.

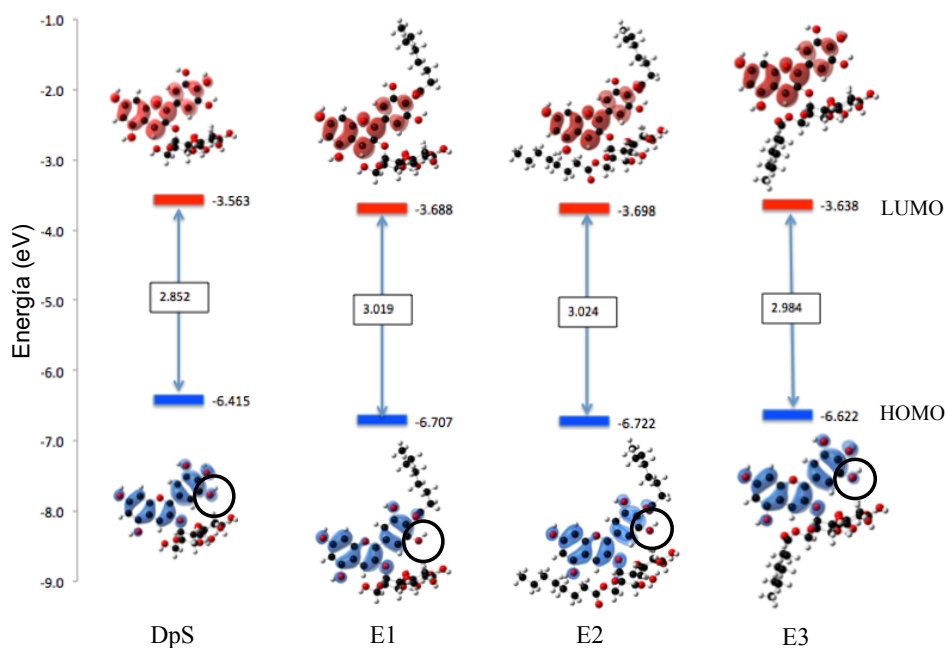


Figura 13. Orbitales moleculares y diferencia energética entre HOMO-LUMO a un nivel de teoría de DFT:B3LYP/6-31++G(d,p) para la delfinidina 3-O-sambubiósido y los ésteres E1, E2 y E3.

## CONCLUSIONES DEL ANÁLISIS *IN SILICO*

La metodología que mejor se ajustó para explicar los estados excitados y fenómenos de color fue la TD-DFT:B3LYP6-31++G(d,p). Como ya se ha visto en trabajos previos, los estados excitados de los antocianos se describen de mejor manera empleando coeficientes HF bajos. Por dicha razón el funcional B3LYP, presentó mejores resultados que los funcionales meta GGA M06 y M06-2X.

Por otro lado, como se pudo observar en el mapeo de orbitales moleculares, un pequeño cambio en las nubes electrónicas del antociano podría comprometer el sistema de resonancia de los mismos y afectar el color. Efecto que puede suceder cuando la esterificación sucede en el cuerpo del aglicón.

## DOCKING RÍGIDO

### Docking ciego

Después de la limpieza de la enzima y la eliminación de la molécula de etilen glicol se realizó el docking ciego con las moléculas de delfinidina 3-O-sambubiósido y malvidina 3-O-glucósido. Estas moléculas fueron previamente modeladas y optimizadas geométricamente por medio de la metodología 6-31 ++G(d,p)/ B3LYP.

El docking ciego se realizó para ambos antocianos, en el cual la malvidina 3-O-glucósido, mostró una energía de  $-4.45$  kcal/mol, lo cual indicaría mayor probabilidad de reaccionar experimentalmente. Sin embargo, esta zona no es el sitio catalítico de la lipasa B de *Candida antarctica*, la cual se muestra en la Figura 14. Aunque, por otra parte, este acoplamiento entre el antociano y la enzima se encontró cerca del otro sitio de la enzima que se considera activo, pero no donde se lleva a cabo la esterificación (Figura 15).

Por otro lado, la delfinidina 3-O-sambubiósido mostró una energía de  $-2.48$  kcal/mol. Esta energía tampoco es suficiente para que la reacción se lleve a cabo y el lugar tampoco es el sitio catalítico de la enzima, el cual está bastante alejado de este (Figura 16).

En este análisis de docking ciego se puede destacar que la energía es más baja en la malvidina 3-O-glucósido que en la delfinidina 3-O-sambubiósido, lo que implica que sería más probable una reacción en la malvidina que en la delfinidina. Sin embargo, la

energía de ambos antocianos muestra que en ningún caso se llevaría a cabo una reacción, además que el sitio de acoplamiento es diferente al sitio catalítico.

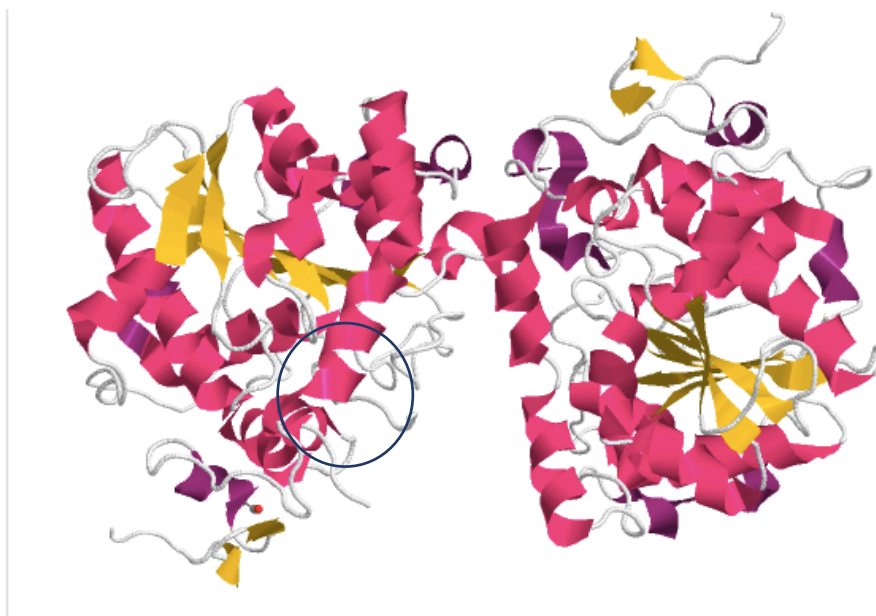


Figura 14. Representación de la lipasa B de *Candida antarctica* y el sitio catalítico encerrado en azul, imagen obtenida de Protein Data Bank 4K6G (Xie et al. 2014).

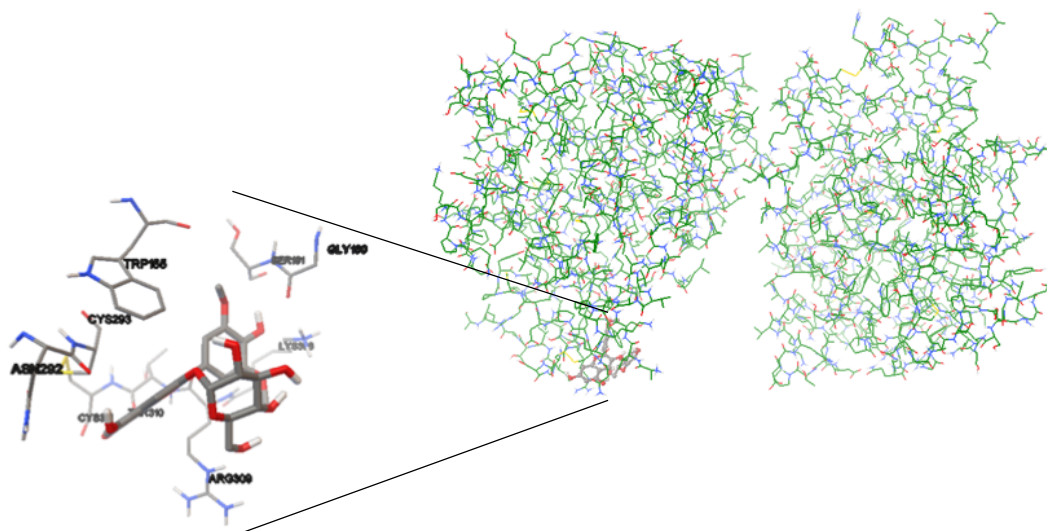


Figura 15. Esquema del docking ciego entre la malvidina 3-O-glucósido y la CalB.

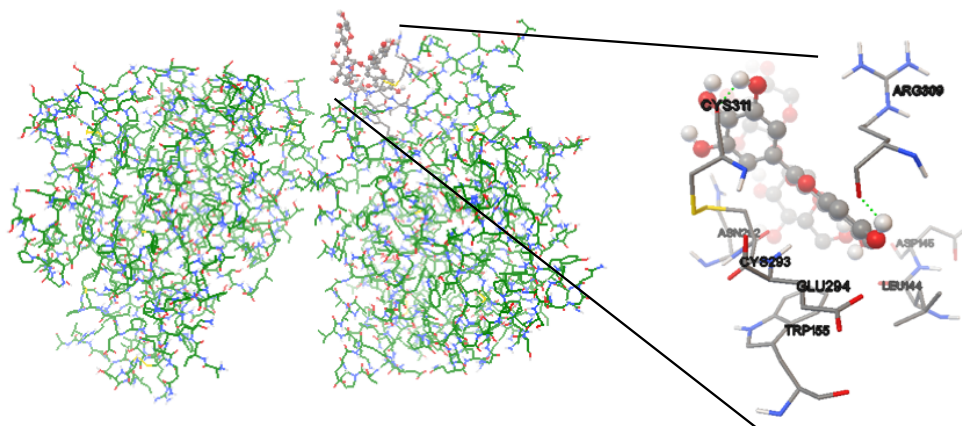


Figura 16. Esquema del docking ciego entre la delphinidina 3-O-sambubiósido y la CalB.

El docking se realizó también en los dos sitios activos de la enzima. El sitio catalítico se nombró como sitio uno. Mientras que el sitio que se observa como activo, pero no es el sitio en el que se lleva a cabo la hidrólisis o la lipofilización, se nombró como sitio dos.

### Docking en sitio uno

El docking de la malvidina 3-O-glucósido para el sitio uno mostró una energía de 6.26 Kcal/mol, lo cual indica que en la realidad una reacción no se podría llevar a cabo. La orientación que tomó la molécula está mostrada en la Figura 17. En esta figura se puede observar que el azúcar está orientado hacia adentro del túnel del sitio catalítico. En esta conformación se puede notar solo un puente de hidrógeno entre el hidroxilo primario de la glucosa y el ASP 134. Estos resultados podrían mostrar que en la realidad esta reacción no tiene lugar, lo cual concuerda con los datos mostrados por De Oliveira et al. (2009). Estos datos muestran que para que la reacción de lipofilización suceda, el aglicón y el azúcar deben cumplir ciertos requisitos. Uno de estos es que, el aglicón debería estar estabilizado por interacciones hidrofóbicas en la cavidad de entrada. Mientras que el azúcar tendría que estar estabilizado y orientado



hacia el sitio catalítico, por lo menos a 4 Å de los aminoácidos involucrados. Sin embargo, hay diferencias entre ambos trabajos. En este trabajo no se realizó la acetilación de la enzima antes de realizar el docking, contrario a lo realizado por De Oliveria y colaboradores. Además aquí se realizó la dinámica molecular para determinar la distancia entre el ligando y la enzima.

Este protocolo de realizar la acetilación y la posterior simulación en dinámica molecular fue realizado también por Christelle y colaboradores en 2011 (Christelle et al., 2011). Sin embargo, este estudio mostró que la acetilación de la quercetina por medio CalB no se podría llevar a cabo debido a que el flavonoide quedó estabilizado por puentes de Hidrógeno en la cavidad del sitio catalítico.

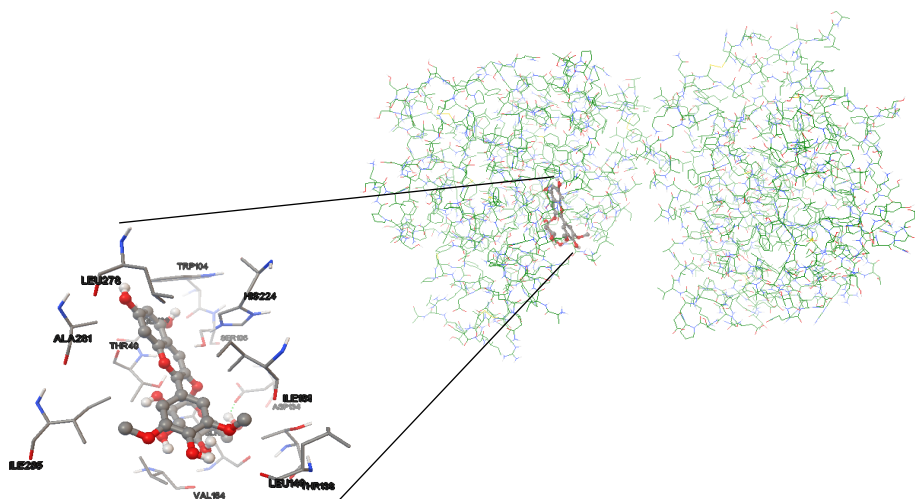


Figura 17. Esquema del docking entre la malvidina 3-O-glucósido y la CalB en el sitio uno.

El acoplamiento en el sitio uno, entre la delfinidina 3-O-sambubiósido y la CalB, se observa que la parte del sambubiósido queda por fuera del túnel, por lo que no se podría llevar a cabo la lipofilización (Figura 18). Otra posibilidad es que lo voluminoso de la molécula pueda impedir que el azúcar llegue al sitio catalítico.

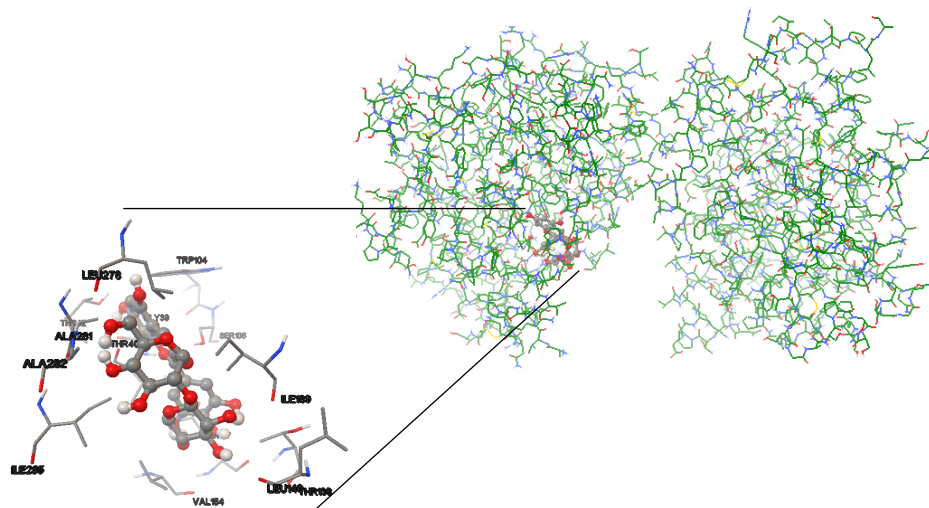


Figura 18. Esquema del docking entre la delphinidina 3-O-sambubiósido y la CalB en el sitio uno.

### Docking en sitio dos

El acoplamiento entre la MvG y la CalB dio como resultado una energía de 1.33 Kcal/mol; además de interacciones de puentes de hidrógeno entre la VAL 306 y los hidrógenos de la glucosa, el ASN 169 con el hidrógeno 7 y la ARG 168 con el oxígeno primario (Figura 19). Con lo que este acoplamiento muestra una energía menor que el calculado para el sitio donde se lleva a cabo la esterificación, esto indicaría que un acoplamiento entre la MvG y la enzima es más posible en este sitio.

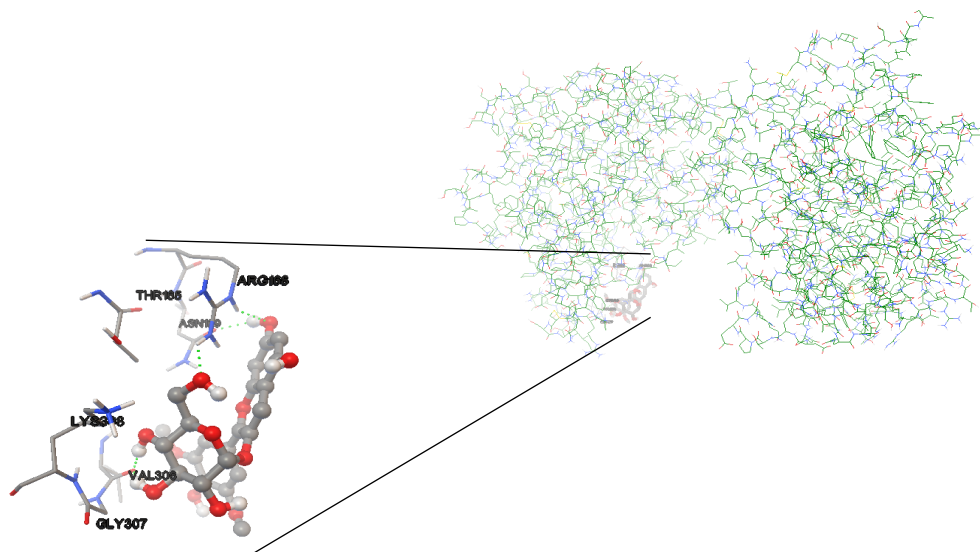


Figura 19. Esquema del docking entre la malvidina 3-O-glucósido y la CalB en el sitio dos.

Por otro lado, el acoplamiento entre la DpS y la CalB en el sitio dos muestra una energía de 0.78 Kcal/mol y puentes de hidrógeno entre la GLY 307 y la VAL 306 (Figura 20). Por tanto, también presenta menos energía de acoplamiento en el sitio donde no se lleva a cabo la esterificación que en el sitio activo. Aunque tampoco sería suficiente energía para esperar que suceda una reacción experimentalmente.

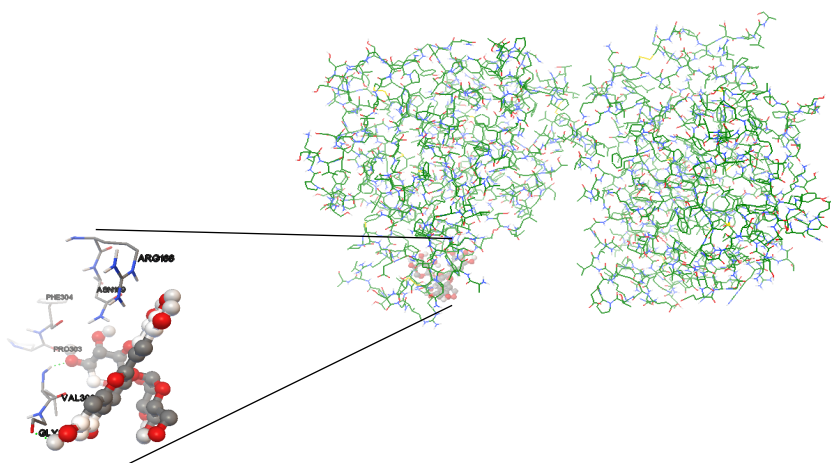


Figura 20. Esquema del docking entre la delphinidina 3-O-sambubiósido y la CalB en el sitio dos.



## **Conclusiones del acoplamiento molecular (docking)**

El docking rígido no mostró información sobre la preferencia de CalB en la esterificación de la MvG sobre la DpS, en el sitio catalítico. Ya que las reacciones de lipofilización si ocurren experimentalmente, la forma de análisis debería de modificarse simulando el proceso. En este, la enzima primero sufre una acilación y posteriormente una des acilación, con lo que finalmente se libera al éster formado. Por este motivo, convendría simular y analizar este proceso con dinámica molecular y docking rigido o flexible, de acuerdo a lo descrito previamente (Christelle et al., 2011; De Oliveira et al., 2010).

## RESULTADOS EXPERIMENTALES

### EXTRACCIÓN

De la extracción polifenólica de la flor de jamaica asistida por ultrasonido se obtuvo un líquido rojo brillante. El perfil fenólico del extracto fue analizado por medio de HPLC-DAD. En el perfil fenólico de la flor de jamaica (Figura 21) se pueden observar ácidos fenólicos, flavonoles y antocianos. Los compuestos se pueden clasificar de acuerdo con la absorbancia que presenten. De esta manera, los ácidos fenólicos absorben a 280 y 320 nm, mientras que los flavonoles a 280 y 360 nm. Mientras que los antocianos absorben a todas las longitudes de onda anteriores, y además a 520 nm.

Uno de los principales ácidos fenólicos en la flor de jamaica es el ácido clorogénico (**1**), al cual podemos observar con su respectivo barrido espectral en la Figura 21(a). También se pueden observar los dos principales antocianos de la flor de jamaica, la delfinidina 3-O-sambubiósido (**2**) y la cianidina 3-O-sambubiósido (**3**), con su barrido espectral perteneciente (Figura 21(b)). De igual manera se puede apreciar que el antociano mayoritario es la delfinidina 3-O-sambubiósido (Riaz & Chopra, 2018).

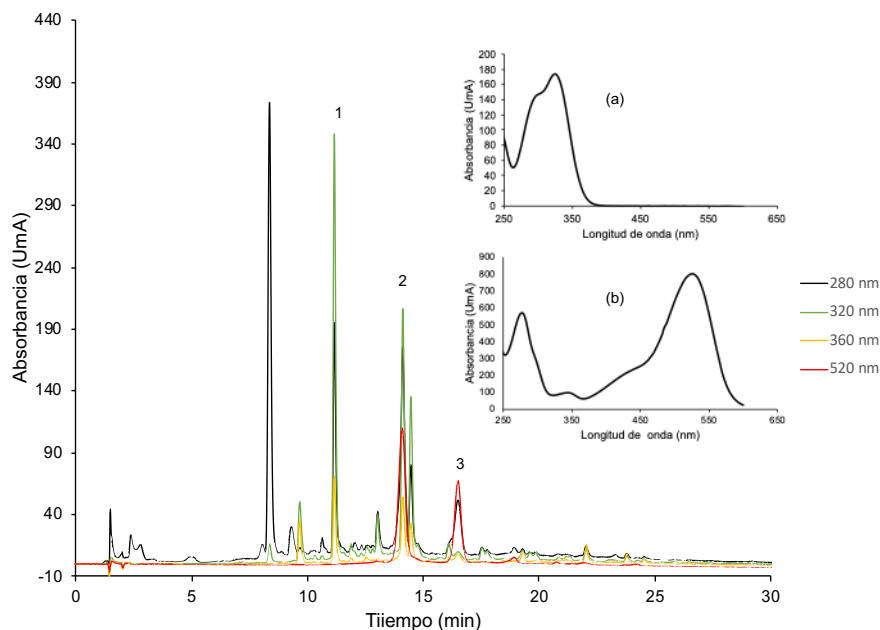


Figura 21. Perfil polifenólico del extracto hidro-alcohólico de la flor de jamaica, con algunos de sus principales compuestos: ácido clorogénico (1), delphinidina 3-O-sambubiósido (2) y cianidina 3-O-sambubiósido (3). Los insertos muestran el barrido espectral UV-vis del ácido clorogénico (a) y de los antocianos (b).

## CONTENIDO DE ANTOCIANOS

El contenido de pigmentos fenólicos se determinó por medio de una curva de calibración de delphinidina 3-O-sambubiósido. Los resultados de la curva de calibración, el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta se pueden apreciar en la Figura 22. Empleando la ecuación de la recta se obtuvo la concentración de delphinidina 3-O-sambubiósido de 67.27 mg/ 100 g de flor de jamaica. Mientras que de cianidina 3-O-sambubiósido el contenido es 42.24 mg/ 100 g (equivalentes de delphinidina) de materia seca. Las cantidades de antocianos obtenidas corresponden a 10 veces menos a las concentraciones reportadas por Ríaz y Chopra en el 2018 (Alarcón-Alonso et al., 2012; Cid-Ortega & Guerrero-Beltrán, 2015; Jabeur et al., 2017; Sinela et al., 2017).

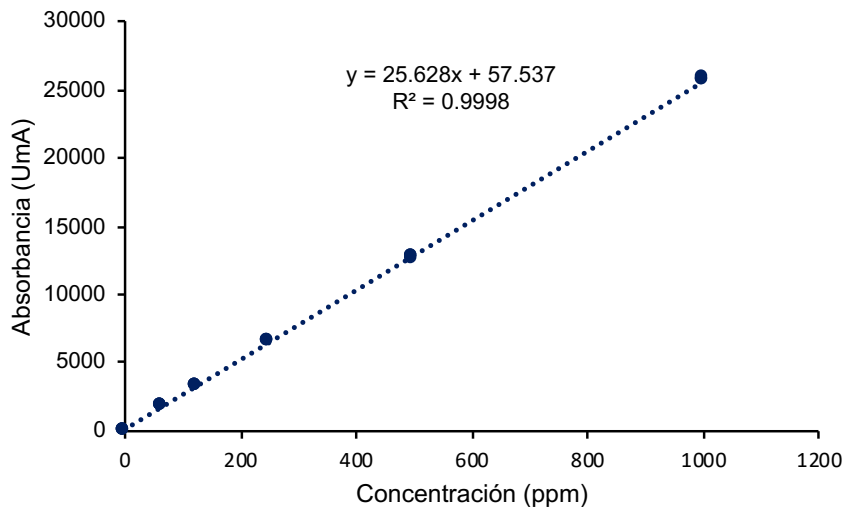


Figura 22. Curva de calibración de la delphinidina 3-O-sambubiósido.

## FRACCIONAMIENTO POR EXTRACCIÓN DE FASE SÓLIDA

La extracción por SPE, dio como resultado cuatro fracciones, de las cuales la fracción 2 (**F2**) y la fracción 3 (**F3**) tiene mayor importancia, debido a su contenido de antocianos. En la Figura 23 se pueden apreciar los anillos de color formados por los antocianos de la flor de jamaica. El primer anillo y de mayor volumen corresponde a la delphinidina 3-O-sambubiósido (**F2**). Mientras que en el segundo anillo se puede observar al grupo de cianidinas (**F3**), que coeluyen al mismo tiempo y, en el que el antociano mayoritario es la cianidina 3-O-sambubiósido, como reportó por Grajeda-Iglesias y colaboradores en 2016 (Grajeda-Iglesias et al., 2016).

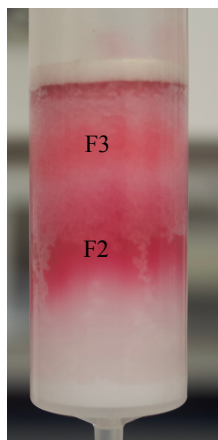


Figura 23. Extracción de fase sólida del extracto de flor de jamaica, delfinidina 3-O-sambubiósido (F2) y cianidina 3-O-sambubiósido (F3).

Después del fraccionamiento por SPE, cada uno de las fracciones evaporadas y recuperadas en agua acidificada (ácido acético 5%) se inyectó en el HPLC-DAD. En la Figura 24 se puede observar el cromatograma de la **F2**. En el tiempo de retención de 14 min y con absorbancia a 520 nm se puede observar a la delfinidina 3-O-sambubiósido, como compuesto mayoritario de la fracción. También se puede observar que el fraccionamiento, si bien solo aisló al antociano mas polar del extracto de flor de jamaica, contiene además algunos ácidos fenólicos. El contenido de ácidos fenólicos se puede deducir de los picos observados en el cromatograma que absorben a longitudes de onda de 320 y 360 nm.

El contenido de delfinidina 3-O-sambubiósido de la **F2** fue calculado por la ecuación de la recta de la curva de calibración realizada con delfinidina 3-O-sambubiósido. El contenido de dicho antociano es de 0.83 mg/mL, lo cual nos indica un rendimiento del fraccionamiento del 75%.

Por otro lado, en la Figura 25, se puede observar el cromatograma de la **F3**. Con un tiempo de retención de 16 min y abosrbancia en 520 nm se muestra al grupo de antocianos que identificaremos como cianidina 3-O-sambubiósido. Este grupo de antocianos se separó completamente de la delfinidina, sin embargo, la fracción aún



contiene ácido fenólicos y flavonoides, como se puede observar por sus absorbancias características.

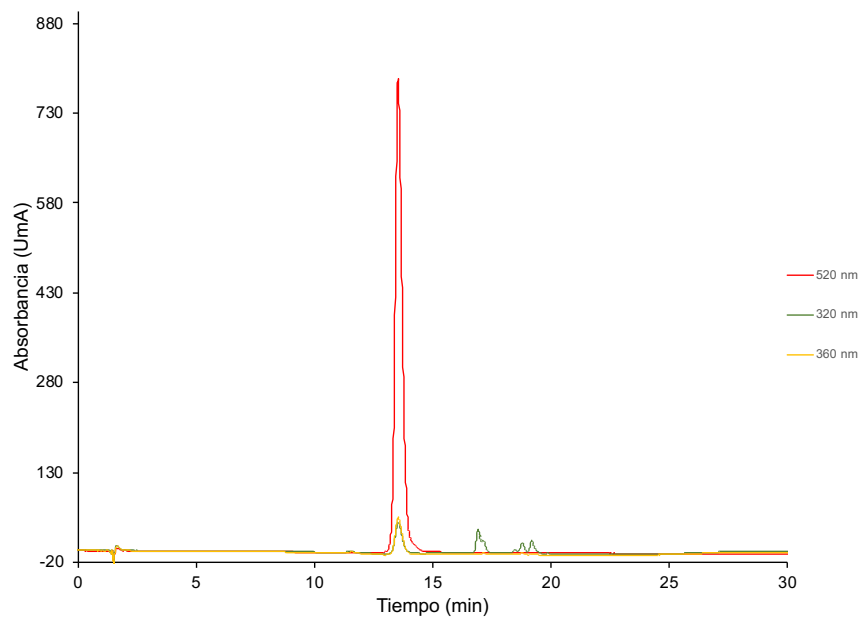


Figura 24. Cromatograma de la fracción 2 (F2), delphinidina 3-O-sambubiósido, obtenida del extracto de flor de jamaica y aislada por SPE.

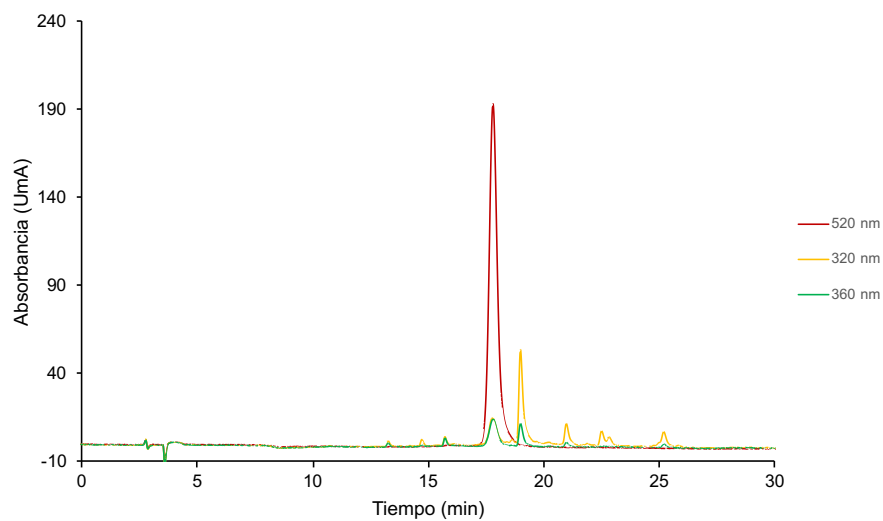


Figura 25. Cromatograma de la fracción 3 (F3), cianidina 3-O-sambubiósido, obtenida del extracto de flor de jamaica y aislada por SPE.



El contenido de antocianos de la fracción 3 es de 0.213 mg/mL en equivalentes de delfinidina 3-O-sambubiósido.

## CONCLUSIONES DE FRACCIONAMIENTO DE ANTOCIANOS

La SPE es un método rápido y sencillo para la purificación en un paso de antocianos. Puede ser también más amigable con el medio ambiente al emplear solventes verdes.

## LIPOFILIZACIÓN ENZIMÁTICA DE ANTOCIANOS

### Lipofilización de delfinidina 3-O-sambubiósido con ácido hexanoico en *tert*-butanol

La lipofilización enzimática de delfinidina 3-O-sambubiósido con ácido hexanoico, se llevó a cabo por medio de la lipasa B de *Candida antarctica*, en alcohol *tert*butílico. La delfinidina 3-O-sambubiósido en *tert*butanol tuvo un cambio de color del rosa al azul, el cual fue más evidente al ser el medio menos ácido o al tener menos concentración de antociano. En la Figura 26 se puede observar el cromatograma en el tiempo cero de lipofilización, en el cual se puede observar dos picos con absorbancia en 520 nm, característico de los antocianos. Por lo que se puede deducir que la delfinidina sufrió degradación. La concentración de delfinidina en solución al T0 es de 2.27 mg/mL. En la Figura 27 se muestra en el espectro de masas, a tiempo cero, en el que se observa el patrón de fragmentación de la delfinidina 3-O-sambubiósido. En el espectro se puede ver el ion molecular de la delfinidina 3-O-sambubiósido a  $m/z$  597, mientras que el pico con 465  $m/z$  corresponde a la delfinidina 3-O-glucósido, al perder la xilosa. Por último, el ión a  $m/z$  303 nos muestra el aglicón, con la pérdida del sambubiósido (294  $m/z$ ) durante la fragmentación. Es importante hacer notar que en un patrón normal de fragmentación, la masa correspondiente al aglicón es de 303  $m/z$ , que también es visible en el espectro. Sin embargo se ha observado la masa de 305  $m/z$ , lo que indica que el aglicón podría estar reducido.

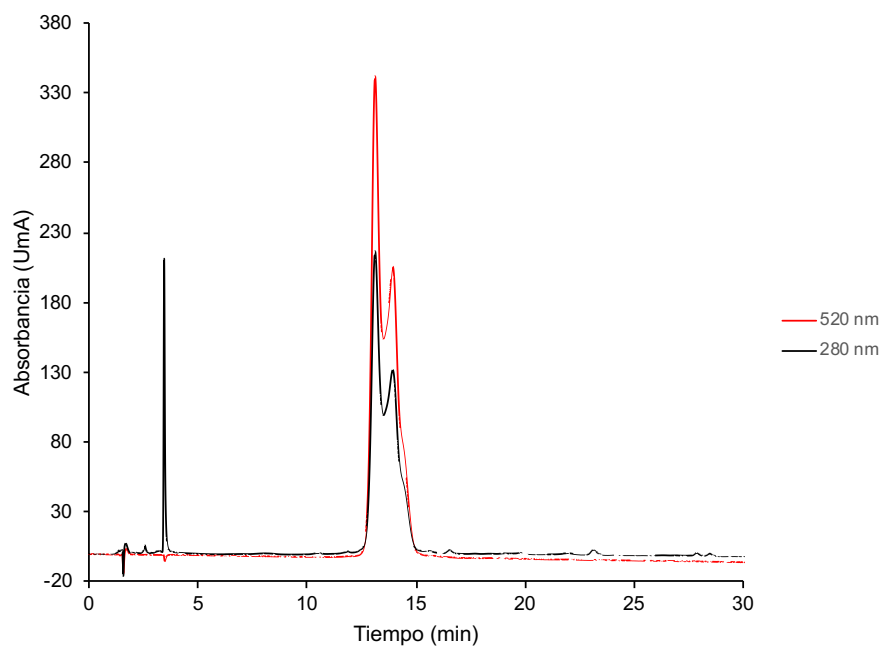


Figura 26. Cromatograma en tiempo cero (T0) de la reacción de lipofilización de delphinidina 3-O-sambubiósido con ácido hexanóico en tert-butanol.

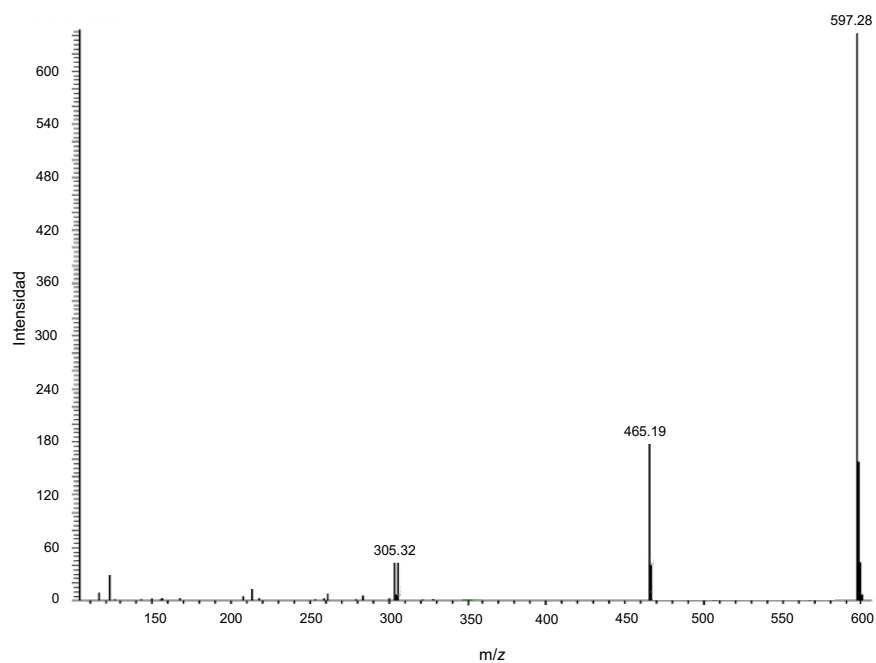


Figura 27. Espectro de masa ESI + en el tiempo cero (T0) de la reacción de lipofilización de delphinidina 3-O-sambubiósido con ácido hexanóico en tert-butanol.

Después de tres horas de reacción (T3) en atmósfera de argón, se tomó la segunda muestra y se inyectó en el HPLC-DAD/MS. El cromatograma en el T3 se muestra la formación de un segundo pico, con un tiempo de retención de 24 min, el cual solo tiene absorbancia en 280 nm (Figura 28). La concentración de delfinidina en este momento es de 1.37 mg/mL, mientras que el del nuevo pico es de 0.522 mg/mL, lo cual sería en este momento un 23% de conversión de la delfinidina. La concentración del producto de esta lipofilización se calculó por medio de la curva de concentración de la delfinidina 3-O-sambubiósido a 280 nm. En el espectro de masas se puede observar un pico que corresponde a una masa 701  $m/z$  (Figura 29). Sin embargo, no se observa la masa que debería esperarse del éster de 695  $m/z$ . La masa de 701  $m/z$  podría deberse a una hidrogenación del éster esperado, en el flavilio, la glucosa y la xilosa; lo que explicaría la masa esperada de 695  $m/z$ , más seis hidrógenos. La reducción del flavilio, dos hidrógenos más, se puede observar desde el inicio de la reacción, como se observó en el espectro de la Figura 27. Otra posible explicación a la formación del aducto formado, con 701  $m/z$ , podría corresponder a una reacción adicional por parte de la enzima, ya que el pH óptimo para la lipasa B de *Candida antarctica* es entre 6-7. También puede observar en la Figura 29, la masa de 565  $m/z$ , que correspondería al éster de delfinidina 3-O-glucósido reducido, ya que la masa de este compuesto sin reducir es de 563  $m/z$ .

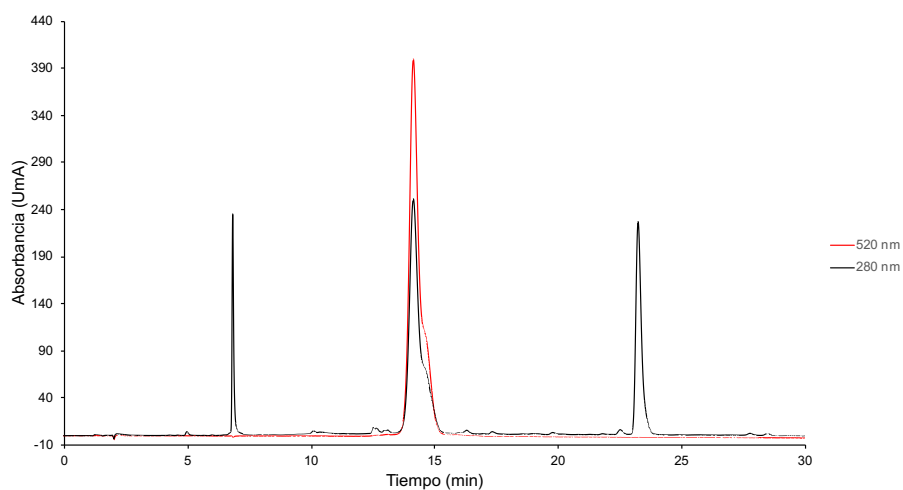


Figura 28. Cromatograma a las tres horas (T3) de la reacción de lipofilización de la delfinidina 3-O-sambubiósido con ácido hexanóico en tert-butanol.

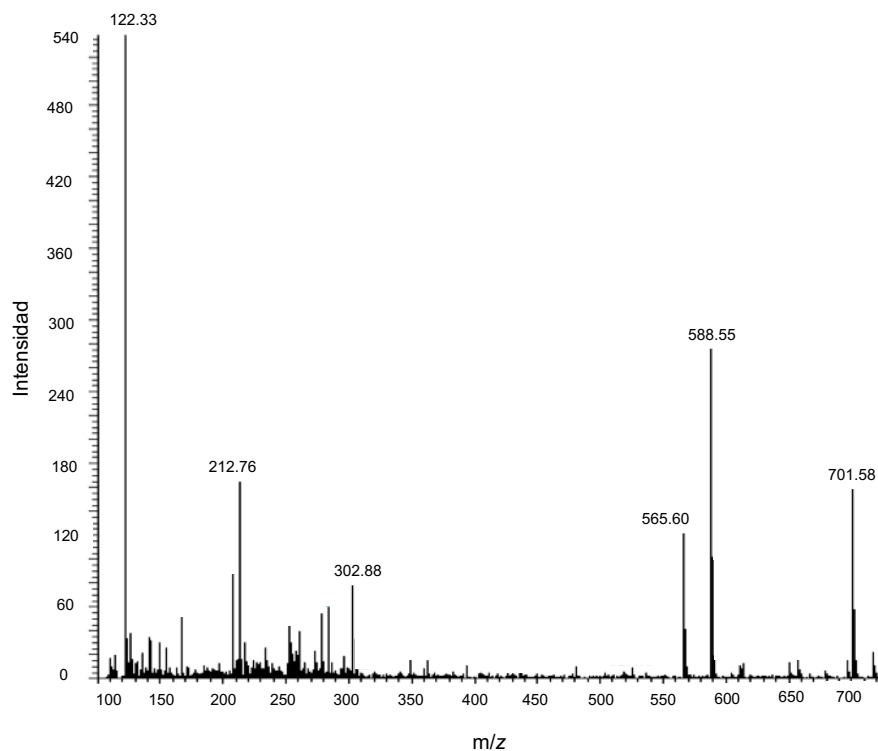


Figura 29. Espectro de masa ESI + del pico a los 24 min a las 3 h (T3) de la reacción de lipofilización de la delfinidina 3-O-sambubiósido con ácido octanóico en tert-butanol.

Después de 27 hr de reacción se observa el mismo patrón observado a las dos horas de reacción (Figura 30), el aducto formado carece de absorbancia a 520 nm. Con lo que se puede deducir que se está formando un compuesto incoloro después de la lipofilización enzimática de la delfinidina 3-O-sambubiósido. Por otro lado, la concentración de delfinidina y el aducto formado, se observó una disminución en la concentración de ambos compuestos después de 24 horas de reacción. Esta disminución en la concentración de ambos compuestos podría ser muestra de la degradación de los mismos durante el prolongado tiempo a 60 °C.

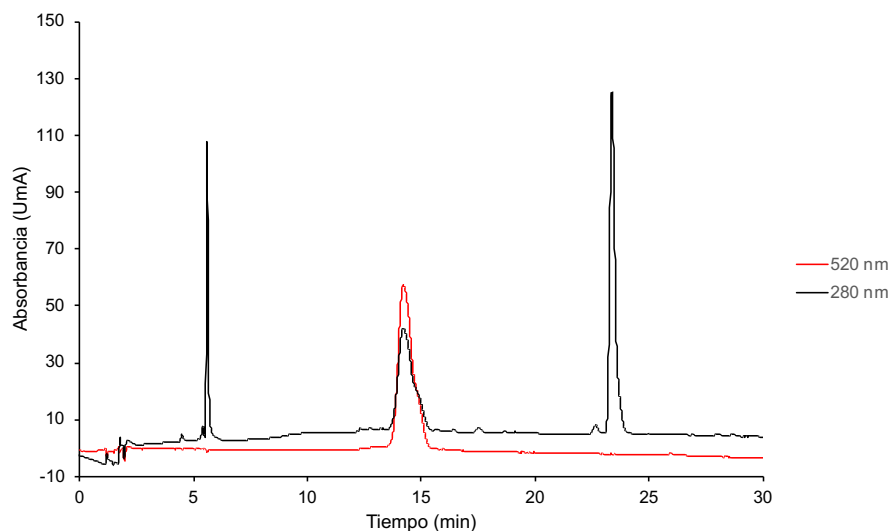


Figura 30. Cromatograma a las 27 h (T27) de la reacción de lipofilización de la delphinidina 3-O-sambubiósido con ácido octanóico en tert-butanol.

### Lipofilización de delphinidina 3-O-sambubiósido con ácido octanóico en 2-metil-2-butanol

A diferencia de la lipofilización con ácido hexanóico, para la reacción con ácido octanóico, no se realizó una acidificación para mantener el antociano en forma flavilio. Aunque de igual manera que en la reacción con ácido hexanóico, el antociano cambio de color rojo a azul al entrar en contacto con el solvente.

La lipofilización con ácido octanóico (100 equivalentes) se realizó variando la cantidad de enzima entre 20 y 40 g/L, la cantidad de tamiz molecular entre 100 y 200 g/L, mientras que la concentración de antociano varió de 0.75, 1.0 y 1,5 g/L.

Las mejores condiciones para llevar a cabo la reacción se encontraron empleando 40 g/L de enzima, 100 g/L de tamiz molecular y 1g/L de antociano liofilizado. La correcta liofilización y cuidado en mantener el antociano seco es muy importante para que la racción se lleve a cabo. Ya que la delphinidina 3-O-sambubiósido posee alta higroscopicidad que puede afectara que la reacción se realice. Este ha sido un factor importante mencionado en trabajos previos sobre lipofilización enzimática con CalB,



que mencionan que el contenido de humedad debe ser cercano a cero (Anderson, Larsson, & Kirk, 1998).

Las primeras reacciones fueron monitoreadas por HPLC-DAD, en columna C8. En donde se observó la formación de producto de lipofilización hasta la cuarta hora de reacción, encontrándose el máximo rendimiento a las 16 h, con 30%. Después de 27 horas de reacción la cantidad de reactivos y productos comenzó a decrecer.

En el momento de la formación del nuevo pico, se encontró en este una absorbancia máxima de 535 nm. Este cambio de absorbancia en los productos de lipofilización se ha observado en trabajos previos de lipofilización de antocianos (Cruz et al., 2018, 2017; Yang et al., 2019, 2018).

Posteriormente una análisis en HPLC/MS fue realizado al producto de lipofilización purificado. El análisis de espectrometría de masas mostró la presencia de dos productos. El análisis mostró una masa de 723 m/z, la cual es la esperada para la delfinidina 3-O-sambubiósido-C8. Sin embargo, se observó también el producto de lipofilización de la delfinidina 3-O-glucósido-C8, con una masa de 591 m/z (Figura 31).

Debido a este hallazgo se cambio el gradiente de análisis en HPLC (Tabla 5), como el tipo de columna empleando una columna C18. Esta modificación en la metodología se realizó con el fin de observar una mejor separación, tanto del antociano inicial, como de los productos. El análisis en HPLC con columna de fase inversa C18, mostró que la muestra de delfinidina 3-O-sambubiósido empleada para la reacción habría sufrido degradación debido a una hidrólisis entre los azúcares del sambubiósido. La delfinidina 3-O-sambubiósido, perdió el azúcar xilosa, por lo que en la muestra se encontraban tanto delfinidina 3-O-sambubiósido y delfinidina 3-O-glucósido.

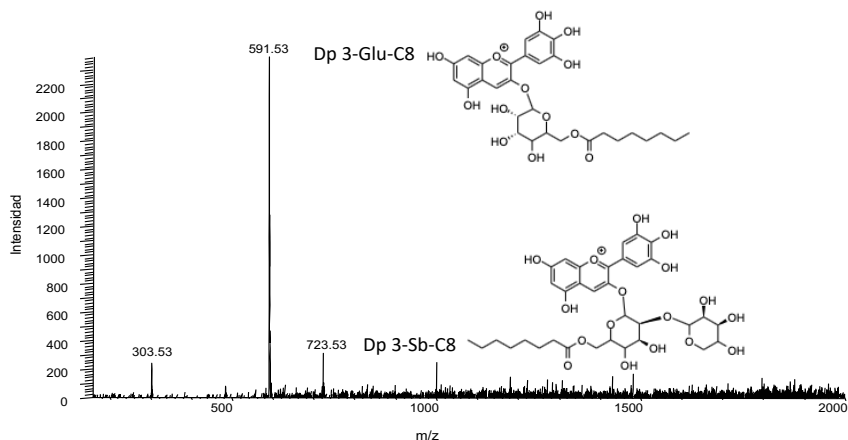


Figura 31. Espectrograma de masas de la reacción de lipofilización de delphinidina 3-O-sambubiósido con ácido octanóico en 2-metil-2-butanol.

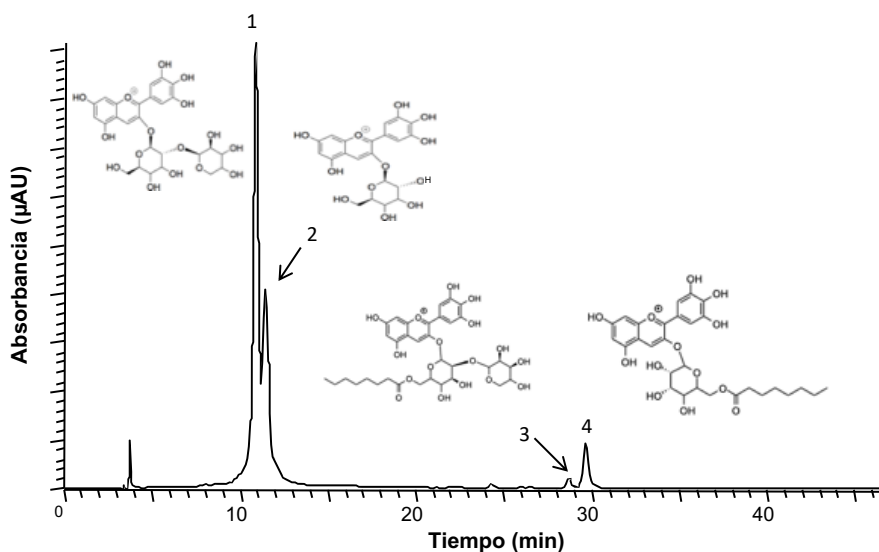


Figura 32. Cromatograma HPLC en columna C18 de la reacción de lipofilización de la delphinidina 3-O-sambubiósido a 535 nm.

A partir de este nuevo método de análisis, se pudo observar que la delphinidina 3-O-sambubiósido presentaba alto grado de degradación en delphinidina 3-O-glucósido desde el inicio de la reacción. Mientras que en la evolución de la misma se observó mayor formación de delphinidina 3-O-glucósido-C8 que de delphinidina 3-O-sambubiósido-C8 (Figura 32). Tal como se observa en el cromatograma, el área de la delphinidina 3-O-glucósido-C8 (4) es mayor que la delphinidina 3-O-sambubiósido-C8 (3), lo que podría indicar mayor formación del primero que del segundo; aunque se encuentre una mayor cantidad de delphinidina 3-O-sambubiósido (1) que de delphinidina



3-O-glucósido (2). Por lo que se puede suponer que la enzima tiene preferencia por el glucósido en comparación al sambubiósido. La máxima formación de producto siguió encontrándose a las 16 h de reacción con rendimientos de 28 y 15% para delfinidina 3-O-glucósido-C8 y delfinidina 3-O-sambubiósido-C8, respectivamente. Se ha encontrado que la lipofilización de flavonoides monosacáridos con CalB es un proceso eficiente (Ardhaoui et al., 2004; Cha, Park, & Park, 2019; Heřmánková-Vavříková et al., 2017; Stevenson, Wibisono, Jensen, Stanley, & Cooney, 2006). Por su parte, la lipofilización de antocianos monoglucósidos con diferentes ácidos grasos ha tenido rendimientos entre 20 y 40% (Cruz et al., 2018). Por otro lado, la esterificación de antocianos disacáridos puede ser un proceso mas complicado que el de los antocianos monosacáridos, posiblemente debido a un mayor impedimento estérico de los primeros. Esto podría dificultar el acceso al sitio activo de la enzima. Aunque se ha llegado a reportar en la lipofilización de antocianos rutinósidos rendimientos de 62-77% (Yang et al., 2019), empleando tert-butanol como solvente. Sin embargo en la presente investigación no se encontró mejora en el rendimiento al emplear como solvente al tert-butanol.

Los productos de lipofilización mostraron diferente espectro de absorción UV-vis de los antocianos de los que proceden, como se ha reportado previamente en otras lipofilizaciones (Cruz et al., 2018, 2017; Yang et al., 2019, 2018). El éster de antociano delfinidina 3-O-glucósido-C8 posee una máxima absorción a 535 nm, lo cual es un deslizamiento batocromico de 12 nm (Figura 33). Mientras que el éster delfinidina 3-O-sambubiósido-C8 tuvo una absorbancia en el espectro visible de 532 nm, lo cual es un deslizamiento batocromico de 6 nm (Figura 34). Además de un efecto hipocromico en la longitud de máxima absorbancia, ya que la banda a 280 nm es mayor.

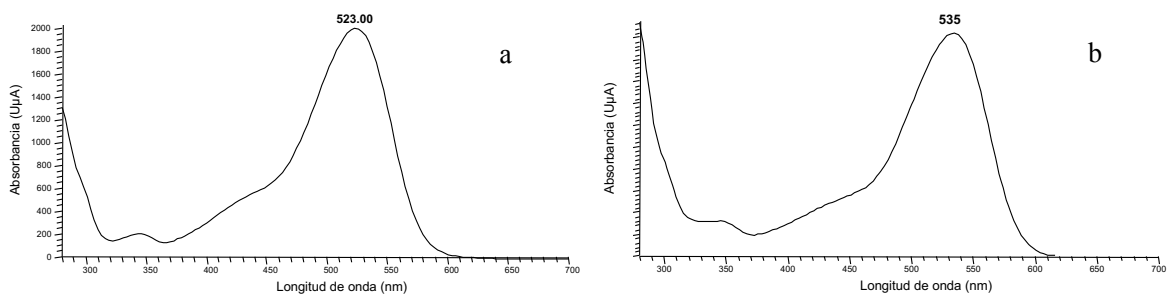


Figura 33. Espectros de absorción de a) la delphinidina 3-O-glucósido y b) el éster de delphinidina 3-O-glucósido-C8.

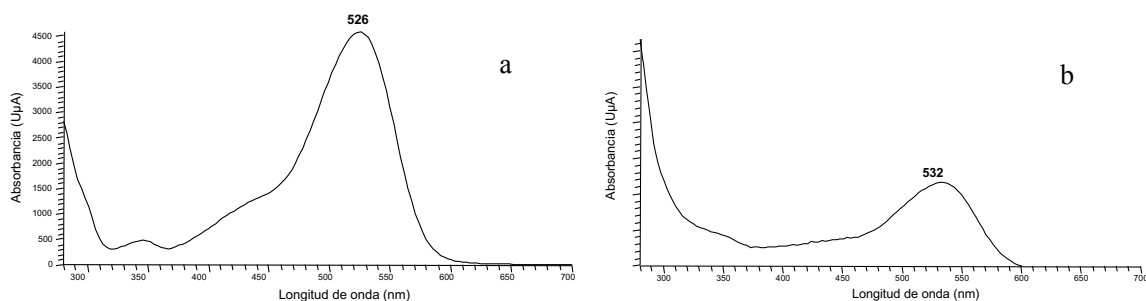


Figura 34. Espectros de absorción de a) la delphinidina 3-O-sambubiósido y b) el éster de delphinidina 3-O-sambubiósido-C8.

Para evitar la delphinidina 3-O-glucósido y su producto en la reacción se empleó delphinidina 3-O-sambubiósido pura. En esta reacción también se modificó la temperatura del medio, para de observar si esta tenía algún efecto sobre la degradación del antociano. Sin embargo, el resultado de las reacciones fue el mismo. Al inicio de la reacción se observaron los picos correspondientes a la delphinidina 3-O-sambubiósido y a la delphinidina 3-O-glucósido, mientras que en las primeras horas de reacción solo se observó el éster producto del segundo antociano. Además, ambas reacciones mostraron menor cantidad de producto, que en las reacciones anteriores a ese mismo tiempo, probablemente debido a la menor temperatura del medio. Como se mencionó anteriormente, también se empleó tert-butanol como solvente, para observar si el rendimiento de la reacción mejoraba. Estas reacciones mostraron tener producto a las dos horas de reacción, mientras que con el 2-metil-2-butanol, el producto apareció hasta las 4 horas. Sin embargo, después de las 4 horas de reacción se observó mas producto en la reacción con 2-metil-2-butanol que en la de tert-butanol.



Debido a estos resultados se procedió a trabajar con fracciones de delphinidina 3-O-sambubiósido con alta pureza, es decir, que contuvieran poca cantidad de delphinidina 3-O-glucósido, ya que realizar la reacción con el antociano puro, no garantizó un solo antociano en la reacción, ni tampoco un solo producto.

La obtención del éster delphinidina 3-O-sambubiósido-C8 se intentó obtener empleando el contraión acetato, sin embargo la lipofilización no se llevó a cabo. De igual manera se realizó la lipofilización enzimática con el contraión formato. Estos contraiones, son por separado el anión que le daría el equilibrio de carga al catión flavilio, en lugar del ión cloruro.

Una fracción de rica en antocianos de flor de jamaica se acidifico con 1% de ácido fórmico y se llevo a cabo la reacción según lo descrito por Cruz y colaboradores en 2018 (Cruz et al., 2018). Con lo cual se obtuvo solo el ester delphinidina 3-O-sambubiósido-C8 como producto de la reacción de lipofilización. En esta ocasión el máximo rendimiento (15%) de la reacción se obtuvo después de 16 h (Figura 35). Además del cambio del contraión, también se ajustaron las variables de la reacción. Las condiciones finales para la reacción fueron 20 g/L de CalB, 100 g/L de tamices moleculares, 1 mg/mL de delphinidina 3-O-sambubiósido liofilizada, 250 equivalentes de ácido octanóico en 2M2B a 60°C.

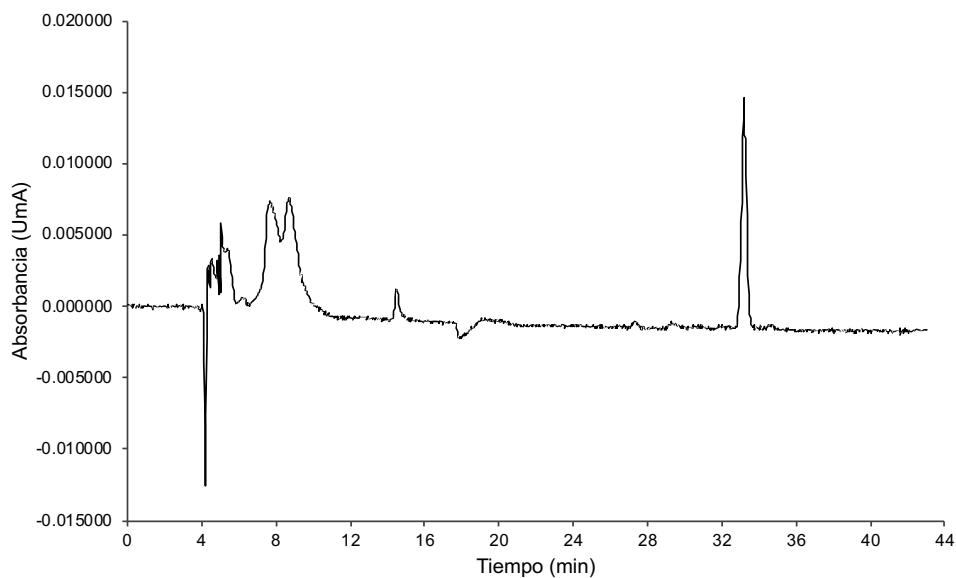


Figura 35. Cromatograma HPLC en columna C18 de la reacción de lipofilización de la delfinidina 3-O-sambubiósido con contraíón formato a 532 nm a las 16 h de reacción.

Las reacciones una vez detenidas, se les removió los tamices moleculares y la enzima por medio de filtración. Mientras la separación de los ácidos grasos, los reactivos y los productos se llevó a cabo por medio de extracción líquido-líquido con hexano y heptano, y cromatografía de columna.

### Conclusiones de la lipofilización de delfinidina 3-O-sambubiósido

Se pudo esterificar selectivamente y obtener un solo producto de la delfinidina 3-O-sambubiósido empleando la lipasa B de *Candida antarctica*. La esterificación de este antociano disacárido sin que se hidrolizara se logró empleando mayor contenido de ácido graso; así como el empleo del contra-ion formato.

El cambio de estructura en los antocianos con la lipofilización enzimática trae consigo un efecto batocrómico en su espectro de absorción, sin que estos pierdan sus propiedades colorantes. De esta manera, la lipofilización enzimática, específica en el sambubiósido del antociano evita que se pierda el color por la esterificación, contrario a lo que ocurre cuando se esterifica en el aglicón.

## SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LIPOFILIZACIÓN

La separación de los antocianos nativos y de los antocianos lipofilizados se logró por diferencia de polaridad.

### EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO

Se realizó una extracción líquido-líquido por triplicado con heptano y posteriormente con hexano, en las que se logró eliminar el exceso de ácidos grasos libres que no reaccionaron. Para comprobar que no quedaran remanentes de ácido graso se comprobó su ausencia con una cromatografía de capa fina.

### CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

Por medio de cromatografía de capa fina se logró comprobar que la extracción líquido-líquido con heptano y hexano eliminó el exceso de ácidos grasos, que no reaccionaron en la lipofilización. La ausencia de ácido octanóico del metanol recuperado de las reacciones se observó cuando se comparó con un testigo que contenía ácido octanóico. A su vez el residuo del último lavado con hexano tampoco contenía ácido octanóico, como se puede observar en la Figura 36.



Figura 36. Cromatografía de capa fina de la fase hexanólica y la fase metanólica de la reacción de lipofilización de delfinidina 3-O-sambubiósido.

## PURIFICACIÓN DEL ÉSTER DELFINIDINA 3-O-SAMBUBIÓSIDO-C8

Con la purificación realizada por medio de cromatografía flash con gel LiChroprep RP-18 (Merck, Alemania), se logró separar la delfinidina 3-O-sambubiósido del éster delfinidina 3-O-sambubiósido-C8, en la reacción realizada a la delfinidina con el contraíón formato, mientras que la realizada con contraíón clorato no fue posible separar los ésteres formados. La separación de la delfinidina 3-O-sambubiósido se logró con una solución de HCl (0.1 M)- metanol (0.1 M de HCl) 80:20 (v/v). Mientras que, la elución del éster, o de la mezcla de ésteres, se consiguió con una solución de HCl (0.1 M)- metanol (0.1 M de HCl) 40:60 (v/v). Esta diferencia en las concentraciones utilizadas para eluir los diferentes compuestos muestra el cambio de polaridad que sufrió el antociano al ser lipofilizado (Figura 37).

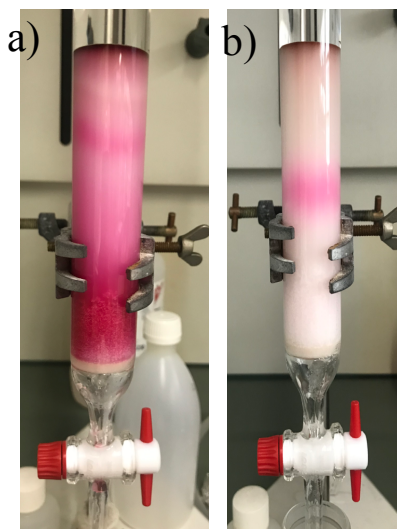


Figura 37. Evolución en la separación de la delfinidina 3-O-sambubiosido y su producto de lipofilización: la delfinidina 3-O-sambubiósido-C8. A) HCl (0.1 M)- metanol (0.1 M de HCl) 80:20 (v/v); b) HCl (0.1 M)- metanol (0.1 M de HCl) 40:60 (v/v).

Para las reacciones realizadas con contraíón clorato se realizó una segunda purificación con cromatografía de columna a baja presión. Mientras que las reacciones realizadas con contraíón formato solo requirieron la cromatografía flash.

El éster purificado delfinidina 3-O-sambubiósido-C8, se analizó por medio de HPLC-DAD (Finnigan Surveyor Series). En la Figura 38 se puede observar el cromatograma, en el que se puede distinguir un solo compuesto, la delfinidina 3-O-sambubiósido-C8.

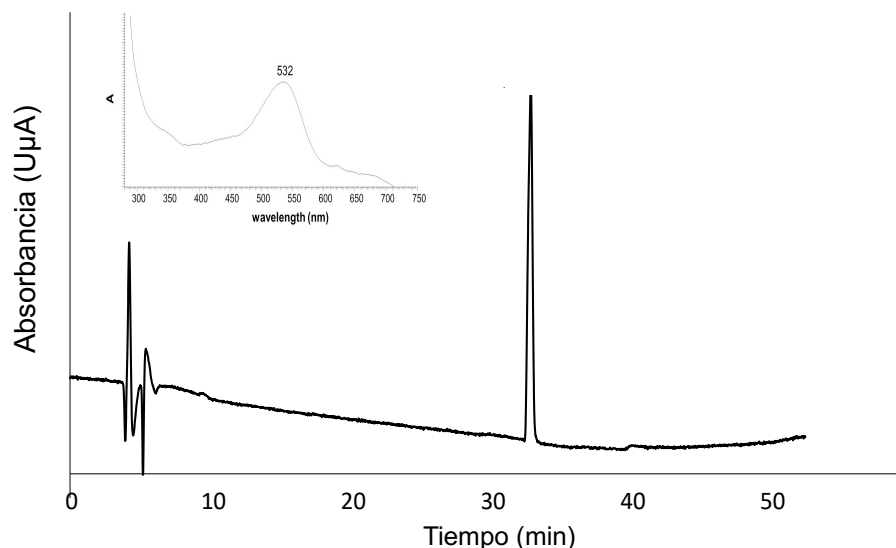


Figura 38. Cromatograma de éster delfinidina 3-O-sambubiósido-C8 purificado a 532 nm. Inserto: espectro de absorción de la delfinidina 3-O-sambubiósido-C8.

## CROMATOGRAFÍA DE BAJA PRESIÓN

Posteriormente a la cromatografía flash se realizó una cromatografía de baja presión a la mezcla de delfinidina 3-O-sambubiósido-C8 y delfinidina 3-O-glucósido-C8, para separar a estos productos de lipofilización. Las impurezas arrastradas de la cromatografía flash fueron removidas. Los productos de lipofilización eluyeron lentamente con soluciones de diferente polaridad. Al aplicar una solución acuosa de metanol acidificado (45%) (0.1 M HCl) se comenzó a ver la separación de dos anillos de diferente color, el primero en eluir de color rosa correspondería al éster de delfinidina 3-O-sambubiósido-C8, y el segundo de color magenta a la delfinidina 3-O-glucósido-C8 (Figura 39). El primer anillo eluyó con una solución acuosa de metanol acidificado al 50% (0.1 M HCl). Mientras que el segundo anillo, eluyó con una solución acuosa de metanol acidificado al 60% (0.1 M HCl). Las muestras fueron evaporadas y

recuperadas con la mínima cantidad de metanol para su posterior análisis por HPLC/MS y NMR.

Sin embargo, debido al bajo rendimiento de la reacción, se obtuvo muy poco producto; además, no fue posible purificar a cada éster, por lo que la mezcla se liofilizará para su posterior análisis en NMR, como mezcla.

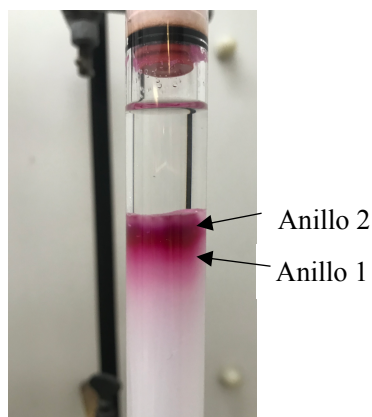


Figura 39. Purificación de los productos de liofilización por cromatografía de baja presión.

### **Conclusiones de separación y purificación del éster de delfinidina 3-O-sambubiósido-C8**

Las técnicas cromatográficas lograron separar los componentes de la reacción para facilitar sus análisis posteriores. Sin embargo cuando la mezcla de compuestos es muy similar y en poca cantidad no es posible realizar la separación y purificación.





## RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Los productos de la lipofilización en las que se empleó contra-ión cloro y formato fueron aislados por medio de cromatografía flash y de baja presión. La mezcla de ésteres de antociano con contra-ión cloro, delfinidina 3-O-sambubiósido-C8 y delfinidina 3-O-glucósido-C8; y el éster con contra-ión formato, delfinidina 3-O-sambubiósido-C8 fueron liofilizados para su análisis por NMR. El polvo color magenta de cada muestra se disolvió en una solución de DMSO- $d_6$ /TFA (9:1). Posteriormente, la estructura de los ésteres de antociano se determinó empleando datos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . Y en el caso del análisis de NMR de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del éster delfinidina 3-O-sambubiósido-C8 aislado se emplearon además las técnicas de correlación COSY, HSQC y HMBC .

Los resultados del análisis se pueden observar en la Tabla 10. Se pueden observar las diferencias entre los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) en el carbono 6''' de la glucosa del antociano sin esterificar y el antociano lipofilizado. El cambio en el desplazamiento químico esta entre 2 y 3 ppm para ambos ésteres de antocianos. Este cambio de desplazamiento también se ha descrito previamente en otros trabajos de lipofilización (Cruz et al., 2016; Cruz et al., 2017; Yang et al., 2019, 2018). Además, el nuevo desplazamiento químico es similar al obtenido previamente en la lipofilización de la delfinidina 3-O-glucósido obtenida de la grosella negra, con un valor de 63.5 ppm ( $\delta^{13}\text{C}$ ) (Cruz et al., 2018). El mismo éster obtenido por Yang y colaboradores en 2019, también mostró un valor semejante, de 64.7 ppm ( $\delta^{13}\text{C}$ ).

De esta manera el espectro de NMR  $^{13}\text{C}$  puede confirmar la acilación selectiva en el alcohol primario de la glucosa de ambos antocianos, la delfinidina 3-O-sambubiósido y la delfinidina 3-O-glucósido.

Tabla 10. Datos de Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de la mezcla ésteres de antocianos DpS-C8 y DpG-C8 en DMSO- $d_6$ /TFA (9:1).

Posición	DpS-C8		DpG-C8	
	$\delta$ ( $^1\text{H}$ ); J (Hz)	$\delta$ ( $^{13}\text{C}$ )	$\delta$ ( $^1\text{H}$ ); J (Hz)	$\delta$ ( $^{13}\text{C}$ )
2C	-	161.7	-	161.4
3C	-	144.0	-	144.0
4C	8.68; s	131.9	8.73; s	133.5
4aA	-	111.6	-	111.6
5A	-	157.7	-	157.7
6A	6.68; *	102.7	6.69; d, 1.9	102.7
7A	-	168.9	-	168.9
8A	6.82; *	94.1	6.83; d, 1.9	94.1
8aA	-	156.0	-	156.0
1'B	-	119.5	-	119.5
2'B	7.72; s	111.6	7.70; s	111.5
6'B	7.72; s	111.6	7.70; s	111.5
3'B	-	144.2	-	143.7
4'B	-	146.6	-	146.5
5'B	-	144.2	-	143.7
<b>Glucosa</b>				
1''	5.68; d, 7.7	98.6	5.43; d, 7.7	101.6
2''	3.97; m	82.5	3.59; m	72.9
3''	3.88; m	72.8	3.39; m	76.4
4''	3.60; m	70.1	3.20; m	70.2
5''	3.88; m	74.7	3.81; m	74.5
6''a	4.00; m	63.5	4.30; m	63.5
6''b	3.62; m	63.5	3.97; m	63.5
<b>Xilosa</b>				
1'''	4.54; d, 7.8	105.4	-	-
2'''	2.95; t, 8.0	74.7	-	-
3'''	3.05; t, 8.7	76.7	-	-
4'''	3.22; m	70.4	-	-
5'''a	3.42; m	76.2	-	-
5'''b	2.70; m	n.a.	-	-
<b>Ácido octanóico</b>				
1 C=O	-	173.4	-	174.7
2 CH <sub>2</sub>	2.25; t, 7.5	33.6	2.16; t, 7.5	33.9
3 CH <sub>2</sub>	1.47; *	24.6	1.35; *	24.6
4-7 (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	1.23; *	22.3	1.11; *	22.3
8 CH <sub>3</sub>	0.83; *	14.0	0.76; t, 7.1	14.0

s, singulete; m, multiplete; d, doblete; t, triplete; \*sin resolver; n.a. no asignado

## Conclusiones de Resonancia Magnética Nuclear

Se logró comprobar que la lipofilización con la lipasa B de *Candida antarctica* fue selectiva en el alcohol primario de la glucosa del antociano.

## LIPOFILICIDAD

Para conocer la lipofilicidad de la delfinidina 3-O-sambubiósido-C8 y compararla con respecto a su antocianina precursora, se determinó el coeficiente de partición octanol-agua. Como se puede observar en la Figura 40, el color en las diferentes fases indica la distribución de las delfinidina 3-O-sambubiósido y delfinidina 3-O-sambubiósido-C8 en la fase acuosa y la fase orgánica, respectivamente. Por lo que se puede notar la afinidad de la primera por la fase acuosa, mientras que la segunda tiene mayor afinidad por el *n*-octanol.

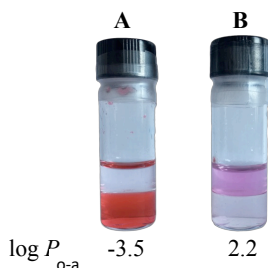


Figura 40. Coeficiente de partición de la delfinidina 3-O-sambubiósido (A) y la delfinidina 3-O-sambubiósido-C8 (B) en una mezcla bifásica de octanol-agua (HCl 0.1M).

## Conclusión de lipofilicidad

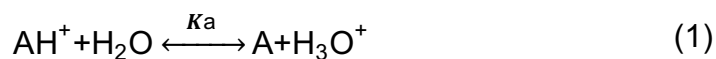
La lipofilización en la delfinidina 3-O-sambubiósido con ácido octanoico, empleando CalB, cambia la polaridad de la estructura del éster formado. Por lo que la solubilidad del éster de antociano en matrices lipídicas se ve aumentada.

## SALTOS DE PH

Las estructuras químicas de los antocianos en solución acuosa son dependientes del pH de la misma. Estas estructuras coexisten en equilibrio como se mostró en la Figura 3. En un pH ácido la forma predominante es el catión flavilio, sin embargo, al aumentar el pH se comienzan a dar las reacciones que dan lugar a las otras especies. Los equilibrios de estas reacciones se dividen en tres diferentes pasos con diferentes escalas de tiempo.

### Transferencia de protón

Es el primer proceso que ocurre al realizarse un salto de pH 1 a pH mayor, en el cual el protón se transfiere del antociano al agua (Ecuación 1) (Pina, 1998). De esta manera, el catión flavilio transfiere un protón a las solución acuosa para dar lugar a la base quinoidal. Esta es la reacción más rápida del equilibrio y donde la cinética de la transferencia se da por la Ecuación 19.



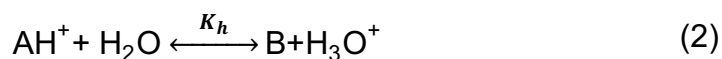
$$k_{1d} = k_a + k_{-a}([\text{H}^+]) \quad (19)$$

### Hidratación y tautomerización

Es el segundo paso cinético en el que el catión flavilio, de naturaleza electrofílica se hidrata, dando lugar a la apertura del anillo B, conocida como tautomerización (Ecuaciones 2 y 3).



Brouillard y Lang en 1990 (Brouillard & Lang, 1990) pudieron comprobar, por medio de saltos de pH y temperatura, que la reacción de tautomerización es una reacción más rápida que la de hidratación (a pH mayor de 1) y la cinética de la reacción de tautomerización se define por medio de la Ecuación 20.



$$k_{2d} = \frac{[\text{H}^+]}{[\text{H}^+] + K_a} k_h + \frac{1}{1 + K_t} k_{-h} [\text{H}^+] \quad (20)$$

Debido a la escala de tiempo en el que ocurre la reacción de hidratación y tautomerización y que la formación de la trans-chalcona es muy lenta, se puede decir que el sistema llega a un estado de pseudo-equilibrio (Ecuación 21). La velocidad de reacción de este equilibrio se muestra en la Ecuación 22.



$$K_a^\wedge = K_a + K_h + K_h K_t \quad (22)$$

Donde la base conjugada,  $\text{CB} = [\text{A}] + [\text{B}] + [\text{C}_{cis}] + [\text{C}_{trans}]$ .

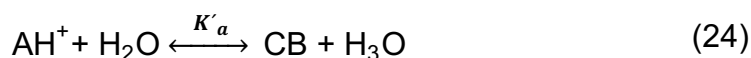
### Isomerización cis-trans.

Es el tercer paso de la cinética multiestado y también el más lento, se define por la ecuación 4 y, la velocidad de reacción de la cinética de isomerización se representa por la ecuación 23.



$$k_{3d} = \frac{K_h K_t}{[H^+] + K_a} k_i + k_{-i} \quad (23)$$

Después de la isomerización, el sistema alcanza el equilibrio final, que se define por la ecuación 24 y su constante de velocidad por la ecuación 25.



$$K'_a = K_a + K_h + K_h K_t + K_h K_t K_i \quad (25)$$

Donde la base conjugada,  $CB = [A] + [B] + [C_{cis}] + [C_{trans}]$

### Constante de equilibrio ( $K'_a$ ) y constante de pseudo-equilibrio ( $K^a$ )

Los equilibrios y las constantes de reacción multiestado de los antocianos se obtuvieron por medio de los saltos de pH directos o reversos, descritos por Brouillard y Delaporte en 1978.

El equilibrio multiestado del éster de delfinidina 3-O-sambubiósido-C8 y su antociano precursor se determinaron en SDS 0.1 M. Se realizaron diversos saltos de pH, mientras que las variaciones en el espectro UV-vis se determinaron a través del tiempo para

AH<sup>+</sup>/A, B y C<sub>cis</sub> en el pseudo equilibrio. Mientras que el equilibrio final se determinó hasta alcanzar la escasa formación de C<sub>trans</sub>. El ión flavilio (AH<sup>+</sup>) y la base quinoidal (A) absorben en el espectro UV-vis, por lo que fue posible ajustar la disminución de la absorbancia del primero y el incremento de la segunda, en función del pH (Figura 41). De esta manera se logró determinar el pK<sub>a</sub>=5.83 y el pK'<sub>a</sub>=5.82. La pequeña diferencia entre estos valores muestra que la especie de la trans-chalcona no forma gran parte en el equilibrio.

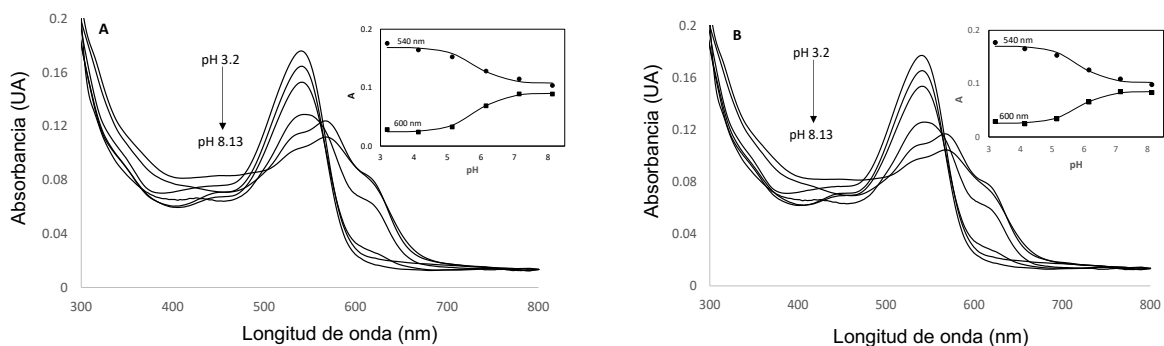


Figura 41. (A) Variaciones espectrales del éster DpS-C8 (0.1 mM) en SDS 0.1 M en función del pH en el pseudo-equilibrio, pK<sub>a</sub>=5.83. Inserto: Ajuste de la absorbancia a 540 y 600 nm como función del pH. (B) Variaciones e espectrales del éster DpS-C8 (0.1 mM) en SDS 0.1 M en función del pH en el equilibrio el equilibrio final, pK<sub>a</sub>=5.82. Inserto: Ajuste de la absorbancia a 540 y 600 nm como función del pH.

### Constante de acidez K<sub>a</sub>

La constante de acidez (pK<sub>a</sub>), se obtiene normalmente por medio de espectroscopia de flujo detenido (del inglés, Stopped flow), la cual cuantifica termodinámicamente la transferencia del protón en una escala de mili-segundos. Sin embargo, la constante de acidez también se puede obtener por medio de saltos de pH directos desde el pH 1 hasta 6-7, donde la hidratación del antociano (B) es lo suficientemente baja y la disminución de la absorbancia de la base quinoidal (A) puede ser cuantificada por un espectrofotómetro normal. De esta manera, la K<sub>a</sub> se puede obtener al conocer las fracciones molares (Ecuaciones 26-29) de las especies involucradas, las cuales fueron deducidas de las ecuaciones 1-5, 8 y 11.

$$[AH^+] = \frac{[H^+]}{[H^+] + K'_a} \quad (26)$$

$$[A] = \frac{K_a}{[H^+] + K'_a} \quad (27)$$

$$[B] + [C_{cis}] = \frac{K^{\wedge}_a - K_a}{[H^+] + K'_a} \quad (28)$$

$$[C_{trans}] = \frac{K'_a - K^{\wedge}_a}{[H^+] + K'_a} \quad (29)$$

Así de la ecuación 3 se obtiene la  $pK_a=5.90$ , al considerar  $[A]= A_{final}/A_{inicial}$

### Constante de hidratación $K_h$

Tomando en cuenta las ecuaciones cinéticas del segundo estado intermediario, cuando la tautomerización es más lenta que la hidratación, tomando en cuenta una  $K_t=0$ ; de esta manera la cinética de hidratación se muestra en la Ecuación 30, que representa la velocidad de reacción en el equilibrio entre el ión flavilio y el hemicetal.

$$k_{2d} = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a} k_h + k_{-h} [H^+] \quad (30)$$

De esta manera, al tomar la  $K_t$  como cero el final de la reacción hidratación/isomerización puede simplificar el cálculo, al emplear la ecuación de la constante del pseudo-equilibrio. Por lo que la Ecuación 30 se reduce a la Ecuación 31 para calcular  $K_h$ , la cual es una buena aproximación para calcular dicha constante, y que se ha empleado en otros estudios (Grajeda-Iglesias et al., 2016; Nave et al., 2010).



$$K_a^{\wedge} = K_a + K_h \quad (31)$$

En la Tabla 11 se muestran las constantes obtenidas para la DpS y la DpS-C8 en micelas de SDS 0.1 M, comparadas con las constantes obtenidas por Grajeda-Iglesias y colaboradores (2016).

Tabla 11. Constantes de equilibrio obtenidas por espectroscopia UV-vis para la delfinidina 3-O-sambubiósido y la delfinidina 3-O-sambubiósido en agua y en SDS.

	DpS 0.06 mM (agua) ‡	DpS 0.1 mM (SDS)*	DpS-C8 0.1 mM (SDS)*
$K_a$ ( $M^{-1}$ )	$2.00 \times 10^{-4}$	$2.19 \times 10^{-6}$	$1.26 \times 10^{-6}$
pK <sub>a</sub>	3.70	5.66	5.90
$K_a^{\wedge}$ ( $M^{-1}$ )	-	$4.27 \times 10^{-6}$	$1.48 \times 10^{-6}$
pK <sub>a</sub> <sup>^</sup>	-	5.37	5.83
$K_a^{\prime}$ ( $M^{-1}$ )	$1.20 \times 10^{-3}$	$7.24 \times 10^{-6}$	$1.51 \times 10^{-6}$
pK <sub>a</sub> <sup>'</sup>	2.92	5.14	5.82
$K_h$ ( $M^{-1}$ )	$9.55 \times 10^{-4}$	$2.08 \times 10^{-6}$	$2.20 \times 10^{-7}$
pK <sub>h</sub>	3.02	5.68	6.66

Notas.  $K_a$ , constante de acidez;  $K_a^{\wedge}$ , constante de pseudo-equilibrio;  $K_a^{\prime}$ , constante de equilibrio;  $K_h$ , constante de hidratación.\* Error estimado  $\approx 10\%$ . ‡(Grajeda-Iglesias et al., 2016).

### Distribución de la fracción molar

Una vez obtenidas las constantes, se pueden definir las fracciones molares de cada especie en el equilibrio en función del tiempo (Figura 42). En la Figura 42(A) se puede observar la pérdida del ion flavilio (AH<sup>+</sup>) a pH neutro, tanto en la DpS como DpS-C8. Mientras que la fracción molar de la base quinoidal (A) en la DpS a pH 9, es menos estable que la trans-chalcona (color amarillo), que es la especie mas estable a este pH. Por otro lado, la base quinoidal de la DpS-C8 al mismo pH, se muestra como la especie mayoritaria, lo que indica que el color azul del antociano estaría estabilizado a ese pH. Es sobresaliente la estabilidad de la base quinoidal del éster de antociano

por las micelas de SDS a pH neutro o ligeramente alcalino. Además este incremento en la estabilidad de la base quinoidal viene acompañado de la disminución de las otras especies, lo que contribuye a la intensificación del color azul en la solución. En especial la trans-chlacona, especie predominante cuando hay degradación irreversible del pigmento.

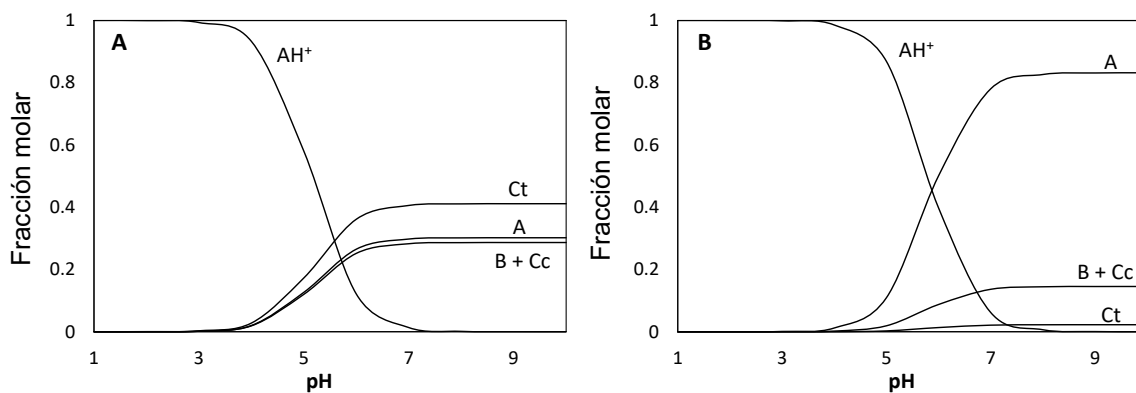


Figura 42. Distribución de la fracción molar en función del pH de (A) DpS 0.1 mM en SDS 0.1 M; (B) DpS-C8 0.1 mM en SDS 0.1 M.

### Conclusiones de las propiedades termodinámicas

Se logró calcular las propiedades de color de la delfinidinia 3-O-sambubiósido y del éster obtenido de esta. Las propiedades termodinámicas obtenidas en solución de SDS son la constante de acidez, la constante de pseudo-equilibrio, la constante de equilibrio y la constante de hidratación.

Los resultados mostraron que la lipofilización al producir una disminución en la constante de hidratación en el éster de antociano, comparado con el antociano nativo, ya que el primero presenta mayor estabilidad a la hidratación. Por lo que la lipofilización mejoraría la estabilidad del pigmento a la degradación por hidratación.

La estabilidad del ion flavilio en el éster a pH ácido no se ve afectada por la lipofilización, aunque la coloración del nuevo antociano sea diferente del precursor.



Por otro lado, la transformación estructural de la delfinidina mejoró la estabilidad de la base quinoidal del éster de antociano dentro de un pH neutro a ligeramente alcalino. Por lo que se estabilizó la estructura que da como resultado una coloración azul en solución.

### ABSORTIVIDAD MOLAR $\epsilon$

El coeficiente de absorptividad de la delfinidina 3-O-sambubiósido hasta el momento no se ha encontrado en la literatura. Por lo que este se determinó durante el presente proyecto por medio del método HPLC-DAD descrito por Pelillo y colaboradores (2004) (Pelillo et al., 2004).

En la Tabla 12 se pueden observar los datos de la absorbancia obtenida a diferentes concentraciones de delfinidina 3-O-sambubiósido. Las condiciones para el cálculo fueron un volumen de inyección de 10  $\mu$ L, con una elución del compuesto a los 15 minutos en una relación 86:14 de la fase móvil (ácido fórmico 1% /acetonitrilo). Para la obtención de estos valores se deben tomar en cuenta las unidades dimensionales de cada variable, en especial el factor dimensional, por lo que en este caso se tuvo que agregar el factor de  $10^3$  para lograr la coherencia numérica, por lo que a la Ecuación 9 se le agregó dicho factor.

$$\text{Área} = \epsilon * \frac{0.06 * b * m_0}{F * PM} \quad (9)$$

Donde:

Área.- Es el área bajo la curva del pico ( $U\mu A \cdot \text{seg}$ )

F.- Flujo de la fase móvil (mL/seg)

b.- espesor de la celda (cm)

PM.- Peso molecular (g/mol)

$m_0$ .- masa inyectada en el cromatógrafo (ng)

Tabla 12. Términos independientes y dependientes de la Ecuación 9.

UA 520 nm	$0.06 \cdot b \cdot m_0 /$ F*PM
0	0
0	0
0	0
1.7387	11538.462
1.7201	11538.462
1.7098	11538.462
3.2872	23076.923
3.2861	23076.923
3.2736	23076.923
6.6000	46153.846
6.5865	46153.846
6.5621	46153.846
12.6839	92307.692
12.6498	92307.692
12.625	92307.692
25.755	184615.38
25.7964	184615.38
26.7252	184615.38

Posteriormente los datos de la Tabla 12 fueron graficados, en orden de obtener la ecuación de la recta (Figura 43). La pendiente de la ecuación de la recta tiene el valor de 7109.7 L/mol.cm, lo que corresponde al valor del coeficiente de absortividad molar de la delfinidina 3-O-sambubiósido. Este valor es más bajo que el encontrado en otros

antocianos, tanto monosacáridos, como disacáridos. Solo la cianidina 3-O-rutinósido y la cianidina 3-O-sambubiósido-5-O-glucósido presentan menor valor, de 7000 y 3600 L/M.cm, respectivamente. Cabe mencionar que estos valores de  $\epsilon$  fueron obtenidos a pH 9. Mientras que otros valores menores del coeficiente se han obtenido en la malvidina 3-5-diglucósido en etanol al 0.1% de ácido clorhídrico, con valores entre 10700 y 10300 L/M.cm (Giusti & Wrolstad, 2001). Como se puede observar en la literatura, la principal diferencia encontrada sobre los valores de  $\epsilon$  es el tipo de solvente y el valor de pH en el que se realizó la evaluación (Pelillo et al., 2004). En éste caso la diferencia entre podría deberse al solvente empleado para la obtención de  $\epsilon$ , que en este caso es principalmente agua acidificada, mientras que para los otros antocianos ha sido en metanol y bajo el método clásico del espectrofotómetro. Torsi y colaboradores (1990) (Torsi et al., 1990) encontraron que dependiendo del instrumento los valores entre metodologías podrían variar entre 18-20% de error sistemático.

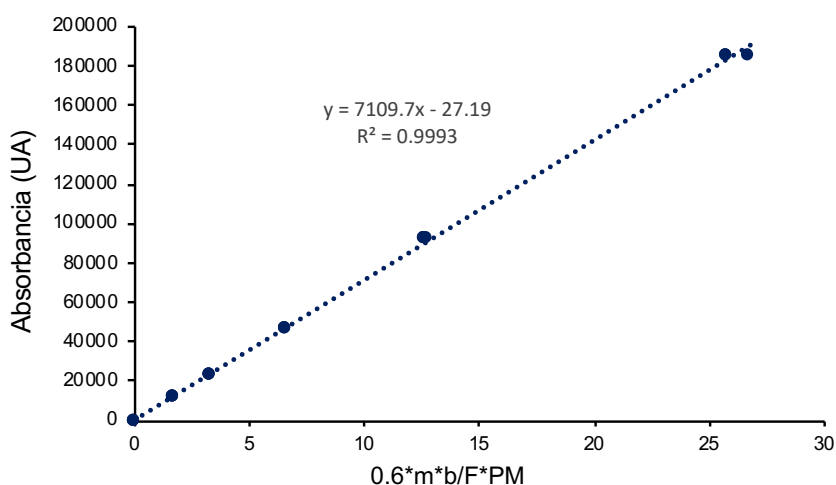


Figura 43. Gráfico y ecuación de la recta de la absorbancia de la calibración de delfinidina 3-O-sambubiósido a diferentes concentraciones, bajo condiciones constantes de flujo.

### Conclusiones de coeficiente de absortividad

Fue posible calcular el coeficiente de absortividad molar de la delfinidina 3-O-sambubiósido, por medio de las absorbancias obtenidas en un HPLC a



concentraciones conocidas del antociano. Sin embargo, el valor obtenido por este medio debe de verificarse y validarse por medio del método del espectrofotómetro; el cual es el establecido para la determinación de este parámetro.

## CINÉTICA QUÍMICA

Las concentraciones de la delfinidina 3-O-sambubiósido, delfinidina 3-O-glucósido, delfinidina 3-O-sambubiósido-C8 y delfinidina 3-O-glucósido-C8 de la reacción de lipofilización se graficaron de acuerdo a las Ecuaciones 15, 16 y 17. Las concentraciones se obtuvieron de acuerdo a curvas de calibración con estándares de malvidina 3-O-glucósido (MvG) y cianidina 3-O-glucósido. También se empleó la fórmula de Torsi para obtener la concentración de delfinidina 3-O-sambubiósido empleando el coeficiente de absortividad molar  $\epsilon$ . Los resultados se muestran en la Tabla 13. Como se puede observar, los valores difieren de acuerdo a la calibración elegida. Cuando se emplea la curva de calibración de malvidina 3-O-glucósido, los valores de los productos de lipofilización son negativos, incluso a las dos horas de reacción, cuando ya se había observado su presencia. Por el contrario, al emplear la curva de calibración de la cianidina, se obtienen valores relativamente de los productos en el tiempo inicial, antes de comenzar la reacción. Por otro lado, al emplear los datos del coeficiente de absortividad, las concentraciones están acordes al tiempo de aparición de los productos. Sin embargo, todos los datos se graficaron para observar si las tendencias en el orden de reacción son similares al emplear diferentes métodos para obtener la concentración. Para realizar los gráficos se tomará como cero los valores negativos y los valores positivos antes de las dos horas de reacción.

Para realizar las cinéticas de reacción se excluyó al ácido octanoico, que al estar en exceso, se puede reducir su efecto a un orden cero. Además se desestimó en los cálculos que la delfinidina 3-O-sambubiósido experimenta una reacción paralela del lipofilización y de hidrólisis de uno de sus azúcares, la xilosa (Figura 44).

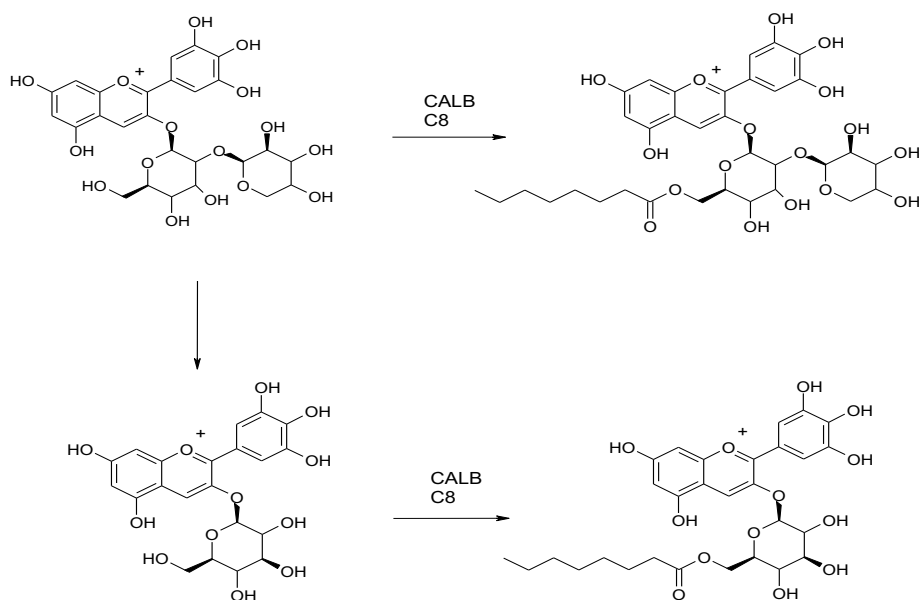


Figura 44. Esquema simplificado de las reacciones de lipofilización de delphinidina 3-O-sambubiósido y cianidina 3-O-sambubiósido.

Tabla 13. Concentraciones en la reacción de lipofilización a diferentes tiempos, empleando curvas de calibración y método absoluto.

			T antes de la reacción	T <sub>0</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>20</sub>
Equivalentes malvidina 3-O-glucósido	DpS	DpS	122.15	44.00	31.52	19.74	16.49	8.64
		DpG	55.77	13.99	14.41	16.65	10.64	11.84
		DpS-C8	-0.63	-0.63	-0.08	-0.06	0.20	0.58
		DpG-C8	-0.63	-0.63	0.53	0.96	2.69	7.99
Conc (mg/L) cianidina 3-O-glucósido	DpS	DpS	115.67	51.98	41.81	32.21	29.56	23.17
		DpG	64.83	27.53	27.87	29.69	24.80	25.77
		DpS-C8	15.61	15.61	16.06	18.06	16.29	16.60
		DpG-C8	15.61	15.61	16.59	16.91	18.32	22.63
Equivalentes delphinidina 3-O-sambubiósido	DpS	DpS	310.48	112.87	81.29	51.52	43.28	23.44
		DpG	152.74	36.98	38.03	43.70	28.50	31.52
		DpS-C8	0	0	1.40	1.44	2.10	3.07
		DpG-C8	0	0	3.04	4.02	8.40	21.79

### Orden de reacción en base a los equivalentes de malvidina 3-O-glucósido.

En la Figura 45 se pueden observar los resultados graficados al aplicar la ecuación para una reacción de orden cero, empleando las concentraciones obtenidas por medio de la curva de calibración de malvidina 3-O-glucósido. A simple vista se puede observar que las constantes de reacción presentan valores negativos para la DpS y DpG, lo que concuerda con la desaparición del compuesto a lo largo de la reacción. Este mismo comportamiento se observa en la cinética de primer orden.

La Figura 46 se puede observar un coeficiente de correlación de uno para la formación de delfinidina 3-O-sambubiósido. Sin embargo, este valor nos dice poco ya que, se emplearon dos puntos debido a que los valores correspondientes a ese tiempo son valores negativos cuando se emplea la curva de calibración de malvidina 3-O-glucósido.

Debido a esto mismo en la grafica de la cinética de segundo orden (Figura 47), los valores de la DpS-C8 muestran irregularidad y ninguna tendencia.

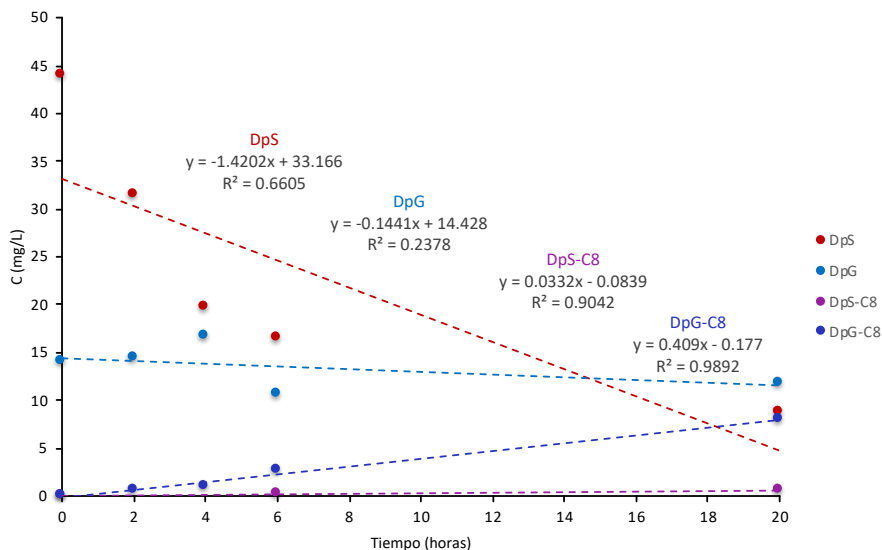


Figura 45. Cinética de reacción de orden cero para lipofilización (equivalentes de malvidina 3-O-glucósido).



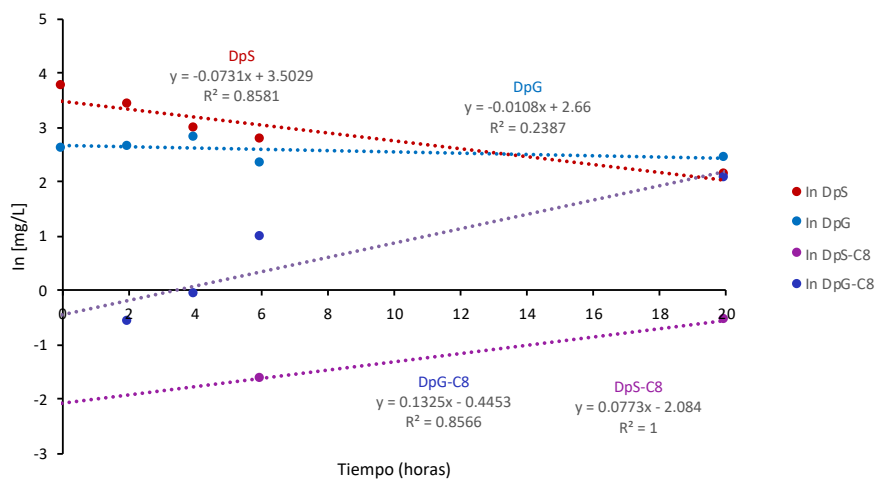


Figura 46. Cinética de reacción de primer orden para lipofilización (equivalentes de malvidina 3-O-glucósido).

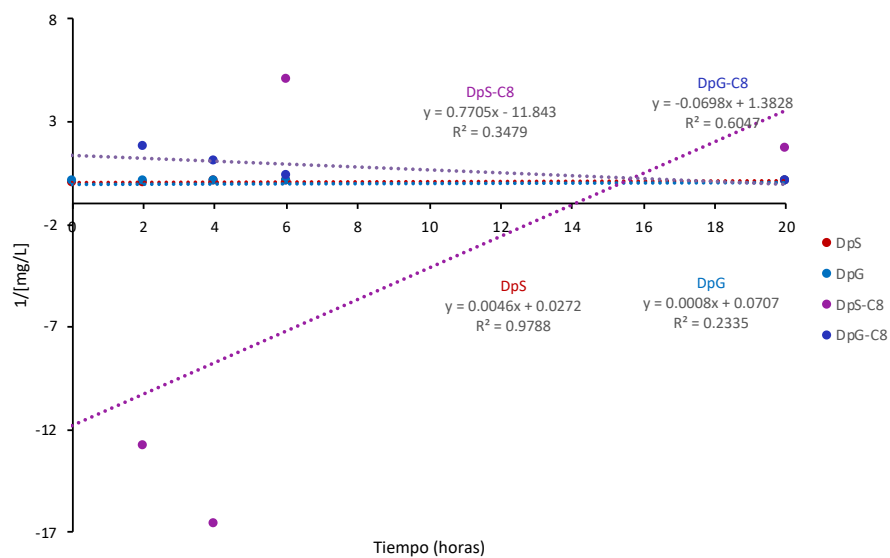


Figura 47. Cinética de reacción de segundo orden para lipofilización (equivalentes de malvidina 3-O-glucósido).

Con respecto a los valores de las constantes de reacción obtenidas se puede observar en la Tabla 14, que son congruentes con la formación o desaparición de productos y reactivos, respectivamente. Sin embargo, la constante de la DpS-C8 para una reacción de segundo orden tiene un valor positivo, lo que iría indicaría que se consume en lugar de producirse. Esto se podría deber a lo observado anteriormente acerca de la

irregularidad de los valores y el empleo de malvidina 3-O-glucósido como estándar para obtener la concentración.

Según estos coeficientes de correlación, se podría suponer que la delfinidina 3-O-sambubiósido muestra una desaparición de segundo orden ( $R^2= 0.9788$ ); que podría ser explicado por ser una reacción paralela entre la formación del éster y la hidrólisis de la xilosa (Figura 44). Mientras que la delfinidina 3-O-glucósido y el éster de delfinidina 3-O-sambubiósido presentarían un primer orden con coeficientes de correlación de 0.2382 y 1, respectivamente. Sin embargo, esto no podría ser tomado en cuenta para el éster, debido a que solo se lograron graficar los logaritmos naturales de dos de las concentraciones, por lo que la información es insuficiente. Por último, el éster de delfinidina 3-O-glucósido presenta un coeficiente de correlación mayor para una formación de producto de orden cero, lo que indicaría que la formación del éster es independiente de la concentración del mismo.

Tabla 14. Coeficientes de correlación y constantes para las diferentes cinéticas de reacción, empleando la curva de calibración de la malvidina 3-O-glucósido.

	Orden cero		Primer orden		Segundo orden	
	$R^2$	$k$	$R^2$	$k$	$R^2$	$k$
DpS	0.6605	-1.4202	0.8581	-0.0731	0.9788	0.0046
DpG	0.2378	-0.1441	0.2382	-0.0108	0.2335	0.0008
DpS-C8	0.9042	0.0332	1.0000	0.0773	0.3479	0.7705
DpG-C8	0.9892	0.409	0.8566	0.1325	0.6047	-0.0698

### Orden de reacción en base a los equivalentes cianidina 3-O-glucósido.

El gráfico con los datos de concentración en función del tiempo se puede observar en la Figura 48, donde se puede observar la misma tendencia que al emplear la concentración obtenida con equivalentes de malvidina 3-O-glucósido. De igual manera las constantes de reacción muestran un valor negativo para la DpS y la DpG, que concuerda con la desaparición de estas durante la reacción. Mientras que ocurre lo

contrario para los ésteres, que tienen una constante con valor positivo. Sin embargo, para los ésteres, el valor del intercepto no concuerda con el valor de la concentración inicial.

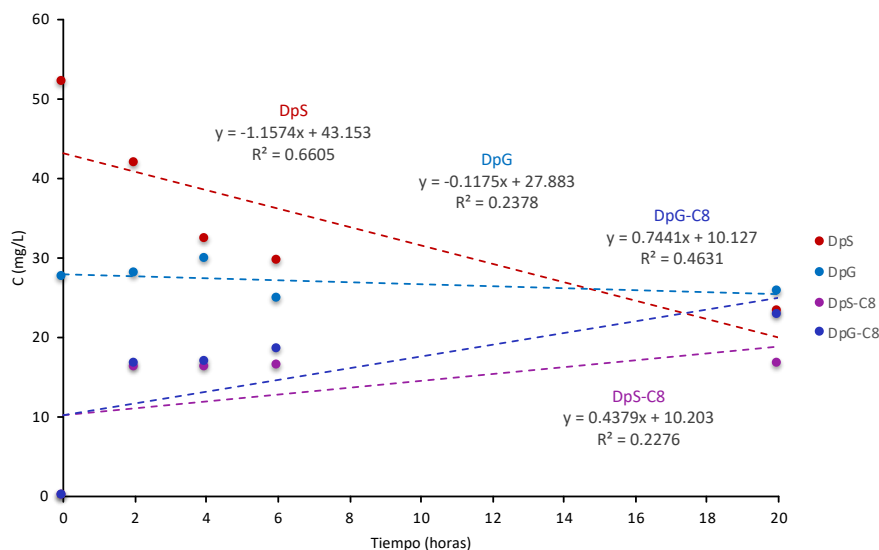


Figura 48. Cinética de reacción de orden cero para lipofilización (equivalentes de cianidina 3-O-glucósido).

En la Figura 49 se presentan los datos graficados linearizados a modo de una cinética de primer orden. En este gráfico se puede observar que tanto la constante de reacción como el intercepto tienen coherencia con la reacción y los valores de la concentración inicial.

El análisis bajo una cinética de segundo orden, muestra que las constantes de reacción se encuentran con valores negativos para la DpS-C8 y la DpG-C8; lo cual es congruente para este orden y la formación de productos (Figura 50). De igual manera se observa la misma coherencia con las constantes de los antocianos nativos. Por otro lado, el intercepto de la ecuación es muy cercano al valor inicial de cada uno de los componentes en la reacción.

Por último, en la Tabla 15 se pueden observar los valores de los coeficientes de correlación y constantes de reacción para los diferentes ordenes de reacción, empleando la cianidina 3-O-glucósido como estándar. Se puede notar que la DpS y la

DpG tienen un coeficiente de correlación más alto (0.8537 y 0.2400, respectivamente) si se tratan los datos como una reacción de segundo orden. Esto puede explicar a que la DpS sufre dos transformaciones paralelas, la lipofilización y la hidrólisis. Mientras que la DpG esta presente en un inicio de la reacción y también se forma a partir de la hidrólisis de la DpS, por lo que podría tratarse de una desaparición de pseudo-segundo orden.

Para los ésteres, se puede observar que sus coeficientes podrían indicar un primer orden de reacción, en la que la reacción depende de solo la concentración de un elemento.

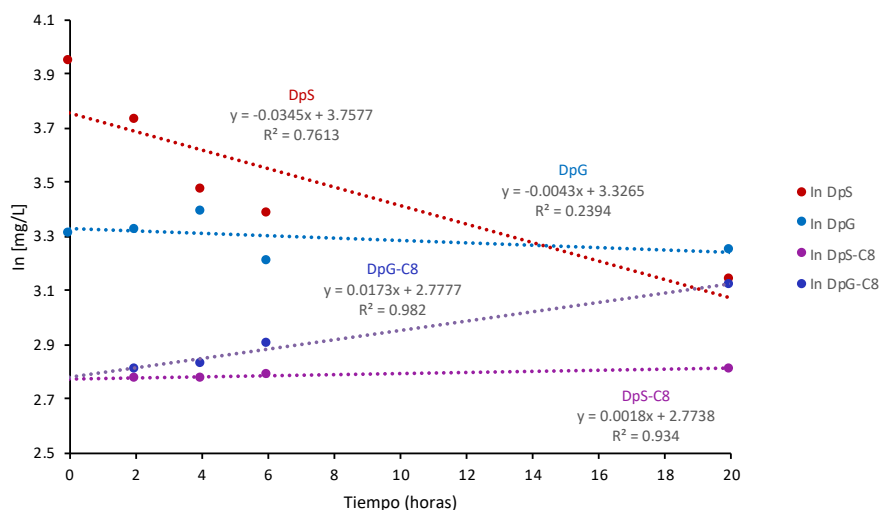


Figura 49. Cinética de reacción de primer orden para lipofilización (equivalentes de cianidina 3-O-glucósido).

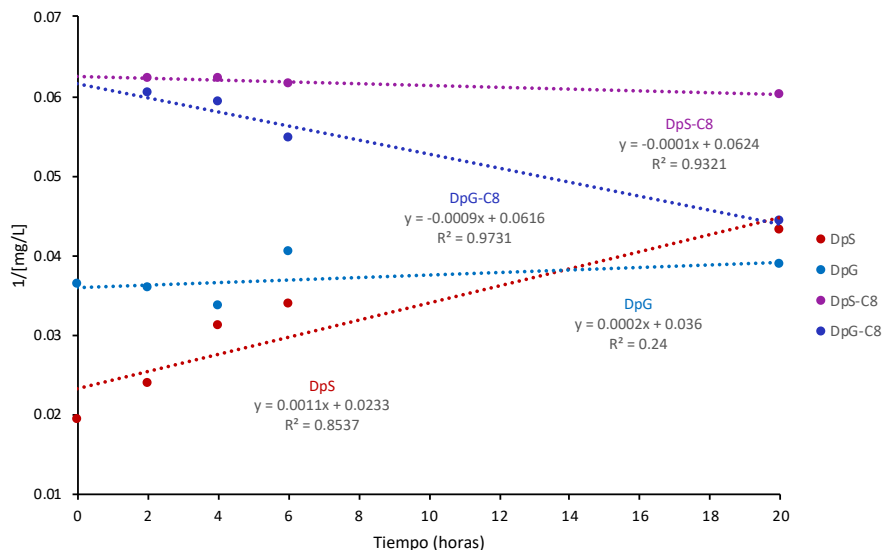


Figura 50. Cinética de reacción de segundo orden para lipofilización (equivalentes de cianidina 3-O-glucósido).

Tabla 15. Coeficientes de correlación y constantes para las diferentes cinéticas de reacción, empleando la curva de calibración de la cianidina 3-O-glucósido.

	Orden cero		Primer orden		Segundo orden	
	R <sup>2</sup>	k	R <sup>2</sup>	k	R <sup>2</sup>	k
DpS	0.6605	-1.1574	0.7613	-0.0345	0.8537	0.0011
DpG	0.2378	-0.1175	0.2394	-0.0043	0.2400	0.0002
DpS-C8	0.2276	0.4379	0.9340	0.0018	0.9321	-0.0001
DpG-C8	0.4631	0.7441	0.9820	0.0173	0.9731	-0.0009

### Orden de reacción en base a equivalentes de delfinidina 3-O-sambubiósido.

En la Figura 51 se muestra la concentración (equivalentes de delfinidina 3-O-sambubiósido) en función del tiempo, donde se puede observar el mismo comportamiento que cuando se emplearon los otros antocianos como estándares. Las constantes de reacción para la DpS y la DpG poseen valores negativos, mientras que los ésteres poseen valores positivos.

Se puede observar este mismo comportamiento en el signo de las constantes al emplear el modelo para una reacción de primer orden (Figura 52). Sin embargo, el valor del coeficiente de correlación muestra mejor ajuste para la cinética de primer orden que para la de orden cero, al menos en tres de los componentes. Solo la formación de DpG-C8 muestra un mejor ajuste para una cinética de orden cero.

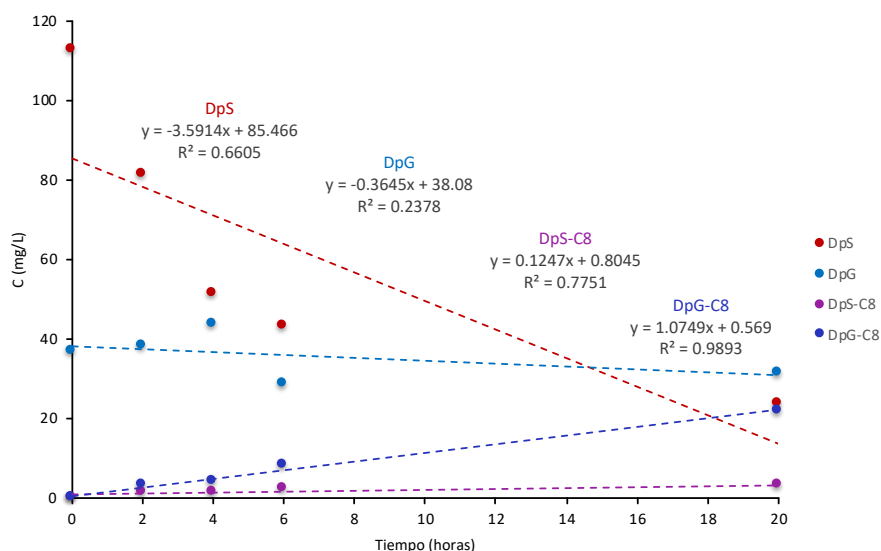


Figura 51. Cinética de reacción de orden cero para lipofilización (equivalentes de delfinidina 3-O-sambubiósido).

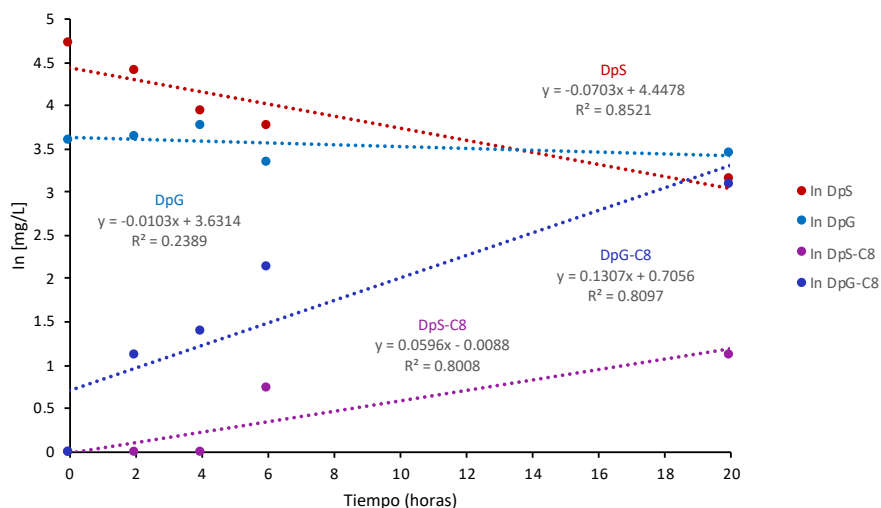


Figura 52. Cinética de reacción de primer orden para lipofilización (equivalentes de delfinidina 3-O-sambubiósido).



Por último, al analizar la cinética de segundo orden (Figura 53), se encuentra el mismo comportamiento congruente de los signos en las constantes de reacción que también se observó al emplear cianidina como estándar.

En la Tabla 16 se muestran los valores de las constantes de reacción con sus respectivos coeficientes de correlación, en el análisis de la cinética empleando equivalentes de delfinidina. Aquí se puede observar que la DpS muestra un coeficiente de correlación mayor en una cinética de segundo orden, similar al resultado que se obtuvo al emplear cianidina como estándar. Por lo que se puede deducir que la desaparición de la delfinidina se ve influenciada tanto por la lipofilización y la hidrólisis de la misma. De igual manera, la DpS-C8 muestra un coeficiente de correlación alto para una cinética de segundo orden, lo que podría sugerir que además de su formación también pueda sufrir una hidrólisis del azúcar, una vez lipofilizada. Por otro lado, la DpG es difícil de deducir, ya que no existe gran diferencia entre los diferentes coeficientes de correlación y, estos son muy bajos independientemente del tipo de estándar empleado en la obtención de la concentración. Además, la concentración de DpG está influida tanto por su concentración inicial y por la que se forma durante la hidrólisis de la DpS, que podría presentar diferentes cinéticas durante la reacción. Por último, la DpG-8 muestra un coeficiente de correlación muy alto para una cinética de orden cero, que podría ser justificado por su aumento de forma constante durante la reacción.

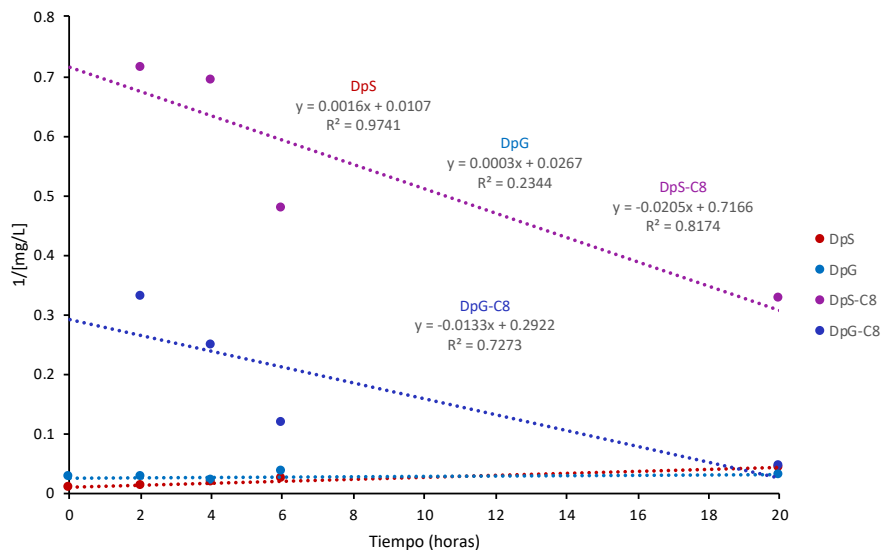


Figura 53. Cinética de reacción de segundo orden para lipofilización (equivalentes de delfinidina 3-O-sambubiósido).

Tabla 16. Coeficientes de correlación y constantes para las diferentes cinéticas de reacción, empleando el coeficiente de absorvividad molar de la delfinidina 3-O-sambubiósido.

	Orden cero		Primer orden		Segundo orden	
	R <sup>2</sup>	k	R <sup>2</sup>	k	R <sup>2</sup>	k
DpS	0.6605	-3.5914	0.8521	-0.0703	0.9741	0.0016
DpG	0.2378	-0.3645	0.2389	-0.0103	0.2344	0.0003
DpS-C8	0.7751	0.1247	0.8008	0.0596	0.8174	-0.0205
DpG-C8	0.9893	1.0749	0.8097	0.1307	0.7273	-0.0133

### Conclusiones de la cinética química

A pesar de toda esta información no se podría concluir totalmente en el orden de las cinéticas de reacción, ya que el efecto de la enzima no está siendo analizado. Por lo que se sugeriría realizar la cinética de reacción empleando el modelo de Michaelis-Menten. Aunque se puede concluir que la desaparición de la DpS es más alta que para la DpG, ya que para cualquiera de los análisis mostró una constante de 6 a 10 veces mayor. Además estas cinéticas pueden dejar más claro que la reacción de lipofilización favorece la formación del éster de la delfinidina 3-O-glucósido. La cual presenta menor





impedimento estérico que la delfinidina 3-O-sambubiósido. Este comportamiento se observó en la lipofilización de la delfinidina 3-O-glucósido y la delfinidina 3-O-rutinósido, en la que la lipofilización enzimática fue mayor en la primera (Cruz et al., 2018).



## CONCLUSIONES GENERALES

### CONCLUSIONES TEÓRICAS

La química computacional es una buena herramienta para auxiliar a la química experimental. Así también los datos experimentales ayudan a mejorar y dar una guía para identificar que métodos teóricos se ajustan mejor a la realidad experimental.

La teoría del funcional de la densidad (DFT) es útil para obtener información de compuestos de los que no se tiene información experimental completa. De esta manera el DFT, el funcional B3LYP y el conjunto de base 6-31++G(d,p) muestra un ajuste adecuado para definir teóricamente la estructura geométrica del la delfinidina 3-O-sambubiósido.

Como perspectiva teórica, se podría sugerir un estudio a profundidad sobre las interacciones antocianos-enzima acilada por medio de acoplamiento molecular (docking). Estos estudios podrían involucrar a los antocianos lipofilizados hasta el momento, como posibles candidatos a lipofilización. Esto con el fin de observar el efecto que tiene la estructura de los antocianos sobre la preferencia o rendimiento de las reacciones de lipofilización de los mismos. De esta manera se podría dar explicación al comportamiento de los antocianos y poder predecir qué sustratos podrían generar mejores rendimientos, como la factibilidad de las reacciones.



## CONCLUSIONES EXPERIMENTALES

La extracción asistida por ultrasonido es un medio rápido por el cual se pueden obtener antocianos y compuesto fenólicos sin comprometer la integridad estructural de los mismos.

El fraccionamiento por medio de SPE es una herramienta de gran utilidad para obtener compuestos concentrados y de gran pureza en un solo paso. De esta manera se pudo obtener antocianos de un extracto fenólico a partir de un extracto natural en un solo paso, además de emplear solventes considerados como verdes.

La lipofilización enzimática de la delfinidina 3-O-sambubiósido se logró realizar selectivamente por medio de la lipasa B de *Candida antarctica* y ácido octanóico.

El cambio estructural hecho a la delfinidina 3-O-sambubiósido con la lipofilización enzimática afectó las propiedades físico-químicas del éster creado. No solo se cambió la polaridad del pigmento, también se mejoró la estabilidad de la base quinoidal a pH neutro o ligeramente alcalino.

Por otro lado, se logró observar experimentalmente que, la esterificación selectiva en el azúcar del antociano modifica ligeramente la absorción UV-vis del éster, sin que este pierda su capacidad colorante, como se observó en los análisis teóricos. Los cuales, por medio de la metodología TD-DFT:B3LYP6-31++G(d,p), mostraron que el espectro de absorción UV-vis tiene menor cambio cuando la esterificación ocurre en el azúcar del antociano.

## REFERENCIAS

- Ahmadiani, N., Robbins, R. J., Collins, T. M., & Giusti, M. M. (2016). Molar absorptivity ( $\epsilon$ ) and spectral characteristics of cyanidin-based anthocyanins from red cabbage. *Food Chemistry*, 197(November), 900–906.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.032>
- Ahmadiani, N., Sigurdson, G. T., Robbins, R. J., Collins, T. M., & Giusti, M. M. (2019). Solid phase fractionation techniques for segregation of red cabbage anthocyanins with different colorimetric and stability properties. *Food Research International*, 120(November), 688–696.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.026>
- Al-Hashimi, A. G. (2012). Antioxidant and antibacterial activities of Hibiscus sabdariffa L. extracts. *African Journal of Food Science*, 6(21), 506–511.  
<https://doi.org/10.5897/AJFS12.099>
- Alarcón-Alonso, J., Zamilpa, A., Aguilar, F. A., Herrera-Ruiz, M., Tortoriello, J., & Jimenez-Ferrer, E. (2012). Pharmacological characterization of the diuretic effect of Hibiscus sabdariffa Linn (Malvaceae) extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 139(3), 751–756. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.12.005>
- Anderson, E. M., Larsson, K. M., & Kirk, O. (1998). One biocatalyst - many applications: The use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation*, 16(3), 181–204.  
<https://doi.org/10.3109/10242429809003198>
- Anouar, E. H., Gierschner, J., Duroux, J. L., & Trouillas, P. (2012). UV/Visible spectra of natural polyphenols: A time-dependent density functional theory study. *Food Chemistry*, 131(1), 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.034>
- Antonopoulou, I., Varriale, S., Topakas, E., Rova, U., Christakopoulos, P., & Faraco, V. (2016). Enzymatic synthesis of bioactive compounds with high potential for cosmeceutical application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(15), 6519–6543. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7647-9>
- Ardhaoui, M., Falcimaigne, A., Ognier, S., Engasser, J. M., Moussou, P., Pauly, G., & Ghoul, M. (2004). Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on



- the enzymatic acylation of flavonoids, *110*, 265–271.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.03.003>
- Bertran Rusca, J., Branchadell Gallo, V., Moreno Ferrer, M., & Sodupe Roure, M. (2002). *Química Cuántica Fundamentos y aplicaciones computacionales* (Segunda). Madrid: Editorial Síntesis S.A.
- Biocompare. (2020). Diode Array HPLC Detectors.
- Borrás-Linares, I., Fernández-Arroyo, S., Arráez-Roman, D., Palmeros-Suárez, P. A., Del Val-Díaz, R., Andrade-González, I., ... Segura-Carretero, A. (2015). Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Industrial Crops and Products*, *69*, 385–394.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.053>
- Botten, D., Fugallo, G., Fraternali, F., & Molteni, C. (2015). Structural Properties of Green Tea Catechins. *The Journal of Physical Chemistry B*, *119*(40), 12860–12867. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b08737>
- Brouillard, R. (1982). Chemical Structure of Anthocyanins. En *Anthocyanins as Food Colors* (pp. 1–40). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-472550-8.50001-9>
- Brouillard, R., Delaporte, B., & Dubois, J. E. (1978). Chemistry of Anthocyanin Pigments. 3.1 Relaxation Amplitudes in pH-Jump Experiments. *Journal of the American Chemical Society*, *100*(19), 6202–6205.  
<https://doi.org/10.1021/ja00487a041>
- Brouillard, R., & Lang, J. (1990). The hemiacetal-cis-chalcone equilibrium of malvin, a natural anthocyanin. *Canadian Journal of Chemistry/Revue Canadienne de Chimie*, *68*(5), 755–761.
- Burrows, A. (2009). Palette of our palates: A brief history of food coloring and its regulation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *8*(4), 394–408. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00089.x>
- Cabrita, L., & Andersen, Ø. M. (1999). Anthocyanins in blue berries of *Vaccinium padifolium*. *Phytochemistry*, *52*(8), 1693–1696. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00281-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00281-2)
- Carvajal-Zarrabal, O., Barradas-Dermitz, D. M., Orta-Flores, Z., Hayward-Jones, P.



- M., Nolasco-Hipolito Cirilo, Aguilar-Uscanga Ma. Guadalupe, & Miranda-Medina Anilú. (2012). Hibiscus sabdariffa L., roselle calyx, from ethnobotany to pharmacology. *Journal of Experimental Pharmacology*, 25.  
<https://doi.org/10.2147/jep.s27974>
- Cha, H. J., Park, J. B., & Park, S. (2019). Esterification of Secondary Alcohols and Multi-hydroxyl Compounds by Candida antarctica Lipase B and Subtilisin. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 24(1), 41–47.  
<https://doi.org/10.1007/s12257-018-0379-1>
- Chassaing, S., Lefeuvre, D., Jacquet, R., Jourdes, M., Teissedre, P., Dangles, O., & Quideau, S. (2010). Physicochemical Studies of New Anthocyano-Ellagitannin Hybrid Pigments : About the Origin of the Influence of Oak C -Glycosidic Ellagitannins on Wine. *European Journal of Organic Chemistry*, 2010, 55–63.  
<https://doi.org/10.1002/ejoc.200901133>
- Chebil, L., Anthoni, J., Humeau, C., Gerardin, C., Engasser, J. M., & Ghoul, M. (2007). Enzymatic acylation of flavonoids: Effect of the nature of the substrate, origin of lipase, and operating conditions on conversion yield and regioselectivity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23), 9496–9502.  
<https://doi.org/10.1021/jf071943j>
- Cheetham, P. S. J., & Banister, N. (2000). Production and uses of caffeic acid and derivatives thereof. United States of America. Recuperado de <http://www.google.co.in/patents/US6066311>
- Cheyrier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1 Suppl), 223–229.  
<https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.223S>
- Christelle, B., Eduardo, B. D. O., Latifa, C., Elaine-Rose, M., Bernard, M., Evelyne, R. H., ... Catherine, H. (2011). Combined docking and molecular dynamics simulations to enlighten the capacity of Pseudomonas cepacia and Candida antarctica lipases to catalyze quercetin acetylation. *Journal of Biotechnology*, 156(3), 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.09.007>
- Christian, K. R., Nair, M. G., & Jackson, J. C. (2006). Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory activity of sorrel (Hibiscus sabdariffa). *Journal of Food Composition and*



- Analysis*, 19(8), 778–783. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.04.004>
- Cid-Ortega, S., & Guerrero-Beltrán, J. A. (2015). Roselle calyces (*Hibiscus sabdariffa*), an alternative to the food and beverages industries: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(11), 6859–6869. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1800-9>
- Coultate, T., & Blackburn, R. S. (2018). Food colorants: their past, present and future. *Coloration Technology*, 134(3), 165–186. <https://doi.org/10.1111/cote.12334>
- Cruz, Luís, Benohoud, M., Rayner, C. M., Mateus, N., de Freitas, V., & Blackburn, R. S. (2018). Selective enzymatic lipophilization of anthocyanin glucosides from blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) skin extract and characterization of esterified anthocyanins. *Food Chemistry*, 266, 415–419. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.06.024>
- Cruz, Luis, Fernandes, I., Guimarães, M., de Freitas, V., & Mateus, N. (2016). Enzymatic synthesis, structural characterization and antioxidant capacity assessment of a new lipophilic malvidin-3-glucoside–oleic acid conjugate. *Food Funct.*, 7(6), 2754–2762. <https://doi.org/10.1039/C6FO00466K>
- Cruz, Luis, Fernandes, V. C., Araújo, P., Mateus, N., & De Freitas, V. (2015). Synthesis, characterisation and antioxidant features of procyanidin B4 and malvidin-3-glucoside stearic acid derivatives. *Food Chemistry*, 174, 480–486. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.062>
- Cruz, Luís, Guimarães, M., Araújo, P., Évora, A., De Freitas, V., & Mateus, N. (2017). Malvidin 3-Glucoside-Fatty Acid Conjugates: From Hydrophilic toward Novel Lipophilic Derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(31), 6513–6518. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05461>
- Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I., & Heinrich, M. (2014). *Hibiscus sabdariffa* L . – A phytochemical and pharmacological review. *Food Chemistry*, 165, 424–443. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.002>
- de Castro, V. C., da Silva, P. H. A., de Oliveira, E. B., Desobry, S., & Humeau, C. (2014). Extraction, identification and enzymatic synthesis of acylated derivatives of anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) fruits. *International Journal of Food Science and Technology*, 49(1), 196–204.



<https://doi.org/10.1111/ijfs.12298>

- de Freitas, V., & Mateus, N. (2006). Chemical transformations of anthocyanins yielding a variety of colours (Review). *Environmental Chemistry Letters*, 4(3), 175–183. <https://doi.org/10.1007/s10311-006-0060-3>
- De Oliveira, E. B., Humeau, C., Chebil, L., Maia, E. R., Dehez, F., Maigret, B., ... Engasser, J. M. (2009). A molecular modelling study to rationalize the regioselectivity in acylation of flavonoid glycosides catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59(1–3), 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.01.011>
- De Oliveira, E. B., Humeau, C., Maia, E. R., Chebil, L., Ronat, E., Monard, G., ... Engasser, J. M. (2010). An approach based on Density Functional Theory (DFT) calculations to assess the *Candida antarctica* lipase B selectivity in rutin, isoquercitrin and quercetin acetylation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66(3–4), 325–331. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.06.009>
- Dettori, L., Jelsch, C., Guiavarc'h, Y., Delaunay, S., Framboisier, X., Chevalot, I., & Humeau, C. (2018). Molecular rules for selectivity in lipase-catalysed acylation of lysine. *Process Biochemistry*, 74(May), 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.07.021>
- Dewar, M. J. S., Zoebisch, E. G., Healy, E. F., & Stewart, J. J. P. (1985). Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *Journal of the American Chemical Society*, 107(13), 3902–3909. <https://doi.org/10.1021/ja00299a024>
- Di Meo, F., Sancho Garcia, J. C., Dangles, O., & Trouillas, P. (2012). Highlights on anthocyanin pigmentation and copigmentation: A matter of flavonoid  $\pi$ -stacking complexation to be described by DFT-D. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 8(6), 2034–2043. <https://doi.org/10.1021/ct300276p>
- Domagała, S., Munshi, P., Ahmed, M., Guillot, B., & Jelsch, C. (2011). Structural analysis and multipole modelling of quercetin monohydrate - A quantitative and comparative study. *Acta Crystallographica Section B: Structural Science*, 67(1), 63–78. <https://doi.org/10.1107/S0108768110041996>
- Escorcía, A. M., Daza, M. C., & Doerr, M. (2014). Computational study of the





- enantioselectivity of the O-acetylation of (R,S)-propranolol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 108, 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.06.010>
- Escorcia, A. M., Molina, D., Daza, M. C., & Doerr, M. (2013). Acetylation of (R,S)-propranolol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B: An experimental and computational study. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 98, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.09.019>
- Estévez, L., & Mosquera, R. (2007). A Density Functional Theory Study. *J. Phys. Chem*, (4), 047201. <https://doi.org/10.1088/1674-1056/21/4/047201>
- Ferrari, F., Paris, C., Maigret, B., Bidouil, C., Delaunay, S., Humeau, C., & Chevalot, I. (2014). Molecular rules for chemo- and regio-selectivity of *Candida antarctica* lipase B in peptide acylation reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 101, 122–132. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.12.007>
- Figuroa-Espinoza, M.-C., & Villeneuve, P. (2005). Phenolic acids enzymatic lipophilization. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(8), 2779–2787. <https://doi.org/10.1021/jf0484273>
- Fossen, T., & Andersen, Ø. M. (2006). Spectroscopic Techniques Applied to Flavonoids. En *FLAVONOIDS Chemistry, Biochemistry and Applications* (pp. 38–142). BOCA RATON.
- Freitas, A. a, Shimizu, K., & Quina, F. H. (2007). A Computational Study of Substituted Flavylium Salts and their Quinonoidal Conjugate- Bases: S<sub>0</sub> → S<sub>1</sub> Electronic Transition, Absolute pK. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18(8), 1537–1546. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532007000800014>
- Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., ... Fox, D. J. (2016). Gaussian 16, Revision B.01. Wallingford CT: Gaussian, Inc. Recuperado de <http://gaussian.com/citation/>
- Fulcrand, H., Atanasova, V., Salas, E., & Cheynier, V. (2004). The fate of anthocyanins in wine: Are there determining factors? *Red Wine Color: Revealing the Mysteries*, 886, 68–88. <https://doi.org/doi:10.1021/bk-2004-0886.ch006>
- Gayot, S., Santarelli, X., & Coulon, D. (2003). Modification of flavonoid using lipase



- in non-conventional media: effect of the water content, *101*, 29–36.
- Ghanem, A. (2007). Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron*, *63*(8), 1721–1754. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.09.110>
- Giusti, M. M., Rodríguez-saona, L. E., Griffin, D., & Wrolstad, R. E. (1999). Electrospray and Tandem Mass Spectroscopy As Tools for Anthocyanin Characterization. *Electrospray and Tandem Mass Spectroscopy As Tools for*, (February 2016), 4657–4664. <https://doi.org/10.1021/jf981242>
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, *00*(1), F.1.2.1-F1.2.13. <https://doi.org/10.1002/0471709085.ch18>
- Grajeda-Iglesias, C. (2016). *Valorisation d'extraits végétaux par la synthèse et caractérisation de composés phénoliques lipophilisés*. INSTITUT NATIONAL D'ÉTUDES SUPÉRIEURES AGRONOMIQUES DE MONTPELLIER.
- Grajeda-Iglesias, C., Figueroa-Espinoza, M. C., Barouh, N., Baréa, B., Fernandes, A., De Freitas, V., & Salas, E. (2016). Isolation and Characterization of Anthocyanins from Hibiscus sabdariffa Flowers. *Journal of Natural Products*, *79*(7), 1709–1718. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00958>
- Grajeda-Iglesias, C., Salas, E., Barouh, N., Baréa, B., & Figueroa-Espinoza, M. C. (2017). Lipophilization and MS characterization of the main anthocyanins purified from hibiscus flowers. *Food Chemistry*, *230*, 189–194. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.140>
- Grigoras, C. G., Destandau, E., Fougère, L., & Elfakir, C. (2013). Evaluation of apple pomace extracts as a source of bioactive compounds. *Industrial Crops and Products*, *49*, 794–804. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.06.026>
- Gu, B., Hu, Z. E., Yang, Z. J., Li, J., Zhou, Z. W., Wang, N., & Yu, X. Q. (2019). Probing the Mechanism of CAL-B-Catalyzed aza-Michael Addition of Aniline Compounds with Acrylates Using Mutation and Molecular Docking Simulations. *ChemistrySelect*, *4*(13), 3848–3854. <https://doi.org/10.1002/slct.201900112>
- Gu, J., Liu, J., & Yu, H. (2011). Quantitative prediction of enantioselectivity of *Candida antarctica* lipase B by combining docking simulations and quantitative structure-



- activity relationship (QSAR) analysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72(3–4), 238–247. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.06.011>
- Guimarães, M., Mateus, N., De Freitas, V., & Cruz, L. (2018). Improvement of the Color Stability of Cyanidin-3-glucoside by Fatty Acid Enzymatic Acylation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(38), 10003–10010. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03536>
- Hari Krishna, S., & Karanth, N. G. (2002). Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. *Catalysis Reviews - Science and Engineering*, 44(4), 499–591. <https://doi.org/10.1081/CR-120015481>
- Heřmánková-Vavříková, E., Křenková, A., Petrásková, L., Chambers, C. S., Zápál, J., Kuzma, M., ... Křen, V. (2017). Synthesis and antiradical activity of isoquercitrin esters with aromatic acids and their homologues. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms18051074>
- Higginbotham, K. L., Burris, K. P., Zivanovic, S., Davidson, P. M., & Stewart, C. N. (2014a). Antimicrobial Activity of Hibiscus sabdariffa Aqueous Extracts against Escherichia coli O157:H7 and Staphylococcus aureus in a Microbiological Medium and Milk of Various Fat Concentrations. *Journal of Food Protection*, 77(2), 262–268. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-313>
- Higginbotham, K. L., Burris, K. P., Zivanovic, S., Davidson, P. M., & Stewart, C. N. (2014b). Aqueous extracts of Hibiscus sabdariffa calyces as an antimicrobial rinse on hot dogs against Listeria monocytogenes and methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Food Control*, 40(1), 274–277. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.12.011>
- Hohenberg, P., & Kohn, W. (1964). Inhomogeneous electron gas. *Physical Review B*, 136, B864–B871. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.7.1912>
- IUPAC. (2008). *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology* (2nd ed., Vol. 1077). <https://doi.org/10.1351/goldbook.c01035>
- Jabeur, I., Pereira, E., Barros, L., Calhella, R. C., Soković, M., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Hibiscus sabdariffa L. as a source of nutrients, bioactive compounds and colouring agents. *Food Research International*,



- 100(August), 717–723. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.073>
- Jaroni, D., & Ravishankar, S. (2012). Bactericidal effects of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) against foodborne pathogens in vitro and on romaine lettuce and alfalfa sprouts. *Quality Assurance and Safety of Crops and Foods*, 4(1), 33–40. <https://doi.org/10.1111/j.1757-837X.2011.00117.x>
- Jensen, F. (2007). *Introduction to Computational Chemistry. Angewandte Chemie International Edition*. <https://doi.org/10.1007/s00214-013-1372-6>
- Justino, G. C., & Vieira, A. J. S. C. (2010). Antioxidant mechanisms of Quercetin and Myricetin in the gas phase and in solution – a comparison and validation of semi-empirical methods, 863–876. <https://doi.org/10.1007/s00894-009-0583-1>
- Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., & Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(11), 935–949. <https://doi.org/10.1038/nrd1549>
- Košir, I. J., & Kidrič, J. (2002). Use of modern nuclear magnetic resonance spectroscopy in wine analysis: Determination of minor compounds. *Analytica Chimica Acta*, 458(1), 77–84. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01549-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01549-5)
- Kouakou, T. H., Kouakou Kouakou, L., Decendit, A., Badoc, A., DA-Costa, G., Mérillon, J.-M., & Tégou, P. W. (2014). Preparative Purification of Delphinidin 3-O-sambubioside from Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Petals by fast Centrifugation Partition Chromatography. *Journal of Advances in Chemistry*, 6(2), 2146–2161.
- Kumaresan, J., Kothai, T., & Lakshmi, B. S. (2011). In silico approaches towards understanding CALB using molecular dynamics simulation and docking. *Molecular Simulation*, 37(12), 1053–1061. <https://doi.org/10.1080/08927022.2011.589050>
- Kurtin, W. E., & Song, P. S. (1968). Electronic structures and spectra of some natural products of theoretical interest-I. Molecular orbital studies of anthocyanidins. *Tetrahedron*, 24(5), 2255–2267. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(68\)88127-X](https://doi.org/10.1016/0040-4020(68)88127-X)
- Larraín, R. E., Krueger, C. G., Richards, M. P., & Reed, J. D. (2008). Color changes and lipid oxidation in pork products made from pigs fed with cranberry juice powder. *Journal of Muscle Foods*, 19(1), 17–33. <https://doi.org/10.1111/j.1745->



4573.2007.00114.x

- Locatelli, M., Carlucci, G., Genovese, S., Curini, M., & Epifano, F. (2011). Use of HPLC in the determination of the molar absorptivity of 4'-geranyloxyferulic acid and boropinic acid. *Chromatographia*, 73(9–10), 889–896.  
<https://doi.org/10.1007/s10337-011-1979-5>
- López Giraldo, L. J., Laguerre, M., Lecomte, J., Figueroa-Espinoza, M. C., Barouh, N., Baréa, B., & Villeneuve, P. (2007). Lipase-catalyzed synthesis of chlorogenate fatty esters in solvent-free medium. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(6–7), 721–726. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.06.004>
- Márquez-Rodríguez, A. S., Nevárez-Baca, S., Lerma-Hernández, J. C., Hernández-Ochoa, L. R., Nevárez-Moorillon, G. V., Gutiérrez-Méndez, N., ... Salas, E. (2020). In vitro antibacterial activity of hibiscus sabdariffa l. phenolic extract and its in situ application on shelf-life of beef meat. *Foods*, 9(8), 1–13.  
<https://doi.org/10.3390/foods9081080>
- Marston, A., & Hostettmann, K. (2006). Separation and Quantification of Flavonoids. En Ø. M. Andersen & K. R. Markham (Eds.), *FLAVONOIDS Chemistry, Biochemistry and Applications* (pp. 1–36). Boca Raton: CRC Press.  
<https://doi.org/0-8493-2021-6>
- Martins, N., Roriz, C. L., Morales, P., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. *Trends in Food Science and Technology*, 52, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.03.009>
- Mazzone, G., Malaj, N., Russo, N., & Toscano, M. (2013). Density functional study of the antioxidant activity of some recently synthesized resveratrol analogues. *Food Chemistry*, 141(3), 2017–2024. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.071>
- McCann, D., Barrett, A., Cooper, A., Crumpler, D., Dalen, L., Grimshaw, K., ... Stevenson, J. (2007). Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *Lancet*, 370(9598), 1560–1567.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61306-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61306-3)
- Melo Branco de Araújo, M. E., Moreira Franco, Y. E., Grando Alberto, T., Fernandes



- Messias, M. C., Wielewski Leme, C., Frankland Sawaya, A. C. H., & de Oliveira Carvalho, P. (2017). Kinetic study on the inhibition of xanthine oxidase by acylated derivatives of flavonoids synthesised enzymatically. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 978–985.  
<https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1347165>
- Mendoza, J., Pina, F., Basilio, N., Guimarães, M., de Freitas, V., & Cruz, L. (2018). Extending the stability of red and blue colors of malvidin-3-glucoside-lipophilic derivatives in the presence of SDS micelles. *Dyes and Pigments*, 151(December 2017), 321–326. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.01.007>
- Meng, X.-Y., Zhang, H.-X., Mezei, M., & Cui, M. (2011). Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided Drug Des.*, 7(2), 146–157. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Miertuš, S., Scrocco, E., & Tomasi, J. (1981). Electrostatic interaction of a solute with a continuum. A direct utilization of AB initio molecular potentials for the prevision of solvent effects. *Chemical Physics*, 55(1), 117–129.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0301-0104\(81\)85090-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0301-0104(81)85090-2)
- Millipore. (2017a). Biochromatography Portfolio Guide.
- Millipore. (2017b). Chromatography Purification Guide.
- Mosquera, R. A., Estévez, L., & García Bugarín, M. (2015). Advanced protocols in oxidative stress III. En *Advanced Protocols in Oxidative Stress III* (Vol. 1208, pp. 254–277). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1441-8>
- Mukesh, B., & Rakesh, K. (2011). ISSN 2229-3566 Review Article MOLECULAR DOCKING : A REVIEW Bachwani Mukesh \*, Kumar Rakesh. *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy*, 2(6), 1746–1751.
- Nakajima, J. I., Sato, Y., Hoshino, T., Yamazaki, M., & Saito, K. (2006). Mechanistic study on the oxidation of anthocyanidin synthase by quantum mechanical calculation. *Journal of Biological Chemistry*, 281(30), 21387–21398.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M600303200>
- Nave, F., Petrov, V., Pina, F., Teixeira, N., Mateus, N., & de Freitas, V. (2010). Thermodynamic and kinetic properties of a red wine pigment: catechin-(4,8)-malvidin-3-O-glucoside. *The journal of physical chemistry. B*, 114(42), 13487–



13496. <https://doi.org/10.1021/jp104749f>
- Nino, R., Toscano, M., & Uccella, N. (2000). S e m i e m p i r i c a l M o l e c u l a r M o d e l i n g i n t o Q u e r c e t i n R e a c t i v e S i t e : S t r u c t u r a l , C o n f o r m a t i o n a l , a n d E l e c t r o n i c F e a t u r e s. *Journal of agricultural and food chemistry*, *48*, 3232–3237. <https://doi.org/10.1021/jf990469h>
- Othman, A., Ismail, A., Abdul Ghani, N., & Adenan, I. (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry*, *100*(4), 1523–1530. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.021>
- Pagliara, A., Reist, M., Geinoz, S., Carrupt, P.-A., & Testa, B. (1999). Evaluation and Prediction of Drug Permeation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *51*(12), 1339–1357. <https://doi.org/10.1211/0022357991777164>
- Pascual-ahuir, J. L., Silla, E., & Tuñon, I. (1994). GEPOL: An improved description of molecular surfaces. III. A new algorithm for the computation of a solvent-excluding surface. *Journal of Computational Chemistry*, *15*(10), 1127–1138. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jcc.540151009>
- Pelillo, M., Cuvelier, M. E., Biguzzi, B., Gallina Toschi, T., Berset, C., & Lercker, G. (2004). Calculation of the molar absorptivity of polyphenols by using liquid chromatography with diode array detection: The case of carnosic acid. *Journal of Chromatography A*, *1023*(2), 225–229. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)01206-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01206-8)
- Pina, F. (1998). Thermodynamics and kinetics of flavylum salts Malvin revisited. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, *94*(15), 2109–2116. <https://doi.org/10.1039/a802602e>
- Pina, F. (2014). Anthocyanins and related compounds. Detecting the change of regime between rate control by hydration or by tautomerization. *Dyes and Pigments*, *102*, 308–314. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2013.10.033>
- Piovesana, A., Rodrigues, E., & Noreña, C. P. Z. (2019). Composition analysis of carotenoids and phenolic compounds and antioxidant activity from hibiscus calyces (*Hibiscus sabdariffa* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Phytochemical Analysis*, *30*(2), 208–217. <https://doi.org/10.1002/pca.2806>
- Plotto, A. (2004). Hibiscus: Post-Production Management for Improved Market





- Access. *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*.
- Poole, C. F. (2003). *The Essence of Chromatography* (First, Vol. 80). Amsterdam: Elsevier Science B.V. <https://doi.org/10.1021/ed080p883.1>
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységu, L. (2011). Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie - International Edition*, 50(3), 586–621. <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>
- Riaz, G., & Chopra, R. (2018). A review on phytochemistry and therapeutic uses of *Hibiscus sabdariffa* L. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 102(May 2017), 575–586. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.023>
- Ridley, J., & Zerner, M. (1973). An intermediate neglect of differential overlap technique for spectroscopy: Pyrrole and the azines. *Theoretica Chimica Acta*, 32(2), 111–134. <https://doi.org/10.1007/BF00528484>
- Roothaan, C. C. J. (1951). New developments in molecular orbital theory. *Reviews of Modern Physics*, 23(2), 69–89. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.23.69>
- Rothwell, J. A., Day, A. J., & Morgan, M. R. A. (2005). Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetin and related flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11), 4355–4360. <https://doi.org/10.1021/jf0483669>
- Rustioni, L., Di Meo, F., Guillaume, M., Failla, O., & Trouillas, P. (2013). Tuning color variation in grape anthocyanins at the molecular scale. *Food Chemistry*, 141(4), 4349–4357. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.006>
- Saik, A. Y. H., Lim, Y. Y., Stanslas, J., & Choo, W. S. (2016). Lipase-catalyzed acylation of quercetin with cinnamic acid. *Biocatalysis and Biotransformation*, 34(1), 33–43. <https://doi.org/10.1080/10242422.2016.1212844>
- Saik, A. Y. H., Lim, Y. Y., Stanslas, J., & Choo, W. S. (2017a). Enzymatic synthesis of quercetin oleate esters using *Candida antarctica* lipase B. *Biotechnology Letters*, 39(2), 297–304. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2246-5>
- Saik, A. Y. H., Lim, Y. Y., Stanslas, J., & Choo, W. S. (2017b). Enzymatic synthesis of quercetin oleate esters using *Candida antarctica* lipase B. *Biotechnology Letters*, 39(2), 297–304. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2246-5>





- Sakata, K., Saito, N., & Honda, T. (2006). Ab initio study of molecular structures and excited states in anthocyanidins. *Tetrahedron*, 62(15), 3721–3731.  
<https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.01.081>
- Sanchez-Bojorge, N. A., Rodriguez-Valdez, L. M., Glossman-Mitnik, D., & Flores-Holguin, N. (2015). Theoretical calculation of the maximum absorption wavelength for Cyanidin molecules with several methodologies. *Computational and Theoretical Chemistry*, 1067, 129–134.  
<https://doi.org/10.1016/j.comptc.2015.06.002>
- Sankar, R., Snehalatha, K., Firdose, S., & Babu, P. (2019). Applications in HPLC in pharmaceutical analysis. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 59(January), 117–124.
- Sáyago-Ayerdi, S. G., Arranz, S., Serrano, J., & Goñi, I. (2007). Dietary fiber content and associated antioxidant compounds in Roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 7886–7890.  
<https://doi.org/10.1021/jf070485b>
- Sáyago-Ayerdi, S. G., Velázquez-López, C., Montalvo-González, E., & Goñi, I. (2014). By-product from decoction process of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces as a source of polyphenols and dietary fiber. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(5), 898–904. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6333>
- Schwarz, M., Hillebrand, S., Habben, S., Degenhardt, A., & Winterhalter, P. (2003). Application of high-speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of anthocyanins. *Biochemical Engineering Journal*, 14(3), 179–189.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00219-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00219-X)
- SIAP. (2019). Cierre de la producción agrícola por cultivo. Recuperado el 26 de junio de 2020, de <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Sigurdson, G. T., Robbins, R. J., Collins, T. M., & Giusti, M. M. (2018). Impact of location, type, and number of glycosidic substitutions on the color expression of o-dihydroxylated anthocyanidins. *Food Chemistry*, 268(June), 416–423.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.079>
- Sigurdson, G. T., Tang, P., & Giusti, M. M. (2017). Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8(1),



261–280. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030216-025923>

- Silverstein, R. M., Webster, F. X., & Kiemble, D. J. (2005). Proton Magnetic Resonance Spectrometry. En *Spectrometric Identification of Organic Compounds* (seventh, p. 165). Massachusetts, United States of America: John Wiley & sons, Inc.
- Sindi, H. A., Marshall, L. J., & Morgan, M. R. A. (2014). Comparative chemical and biochemical analysis of extracts of Hibiscus sabdariffa. *Food Chemistry*, *164*, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.097>
- Sinela, A., Rawat, N., Mertz, C., Achir, N., Fulcrand, H., & Dornier, M. (2017). Anthocyanins degradation during storage of Hibiscus sabdariffa extract and evolution of its degradation products. *Food Chemistry*, *214*, 234–241. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.071>
- Sinopoli, A., Calogero, G., & Bartolotta, A. (2019). Computational aspects of anthocyanidins and anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, *297*(January). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.172>
- Stamatis, H., Sereti, V., & Kolisis, F. N. (1999). Studies on the enzymatic synthesis of lipophilic derivatives of natural antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *76*(12), 1505–1510. <https://doi.org/10.1007/s11746-999-0193-1>
- Stevenson, D. E., Wibisono, R., Jensen, D. J., Stanley, R. A., & Cooney, J. M. (2006). Direct acylation of flavonoid glycosides with phenolic acids catalysed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435®). *Enzyme and Microbial Technology*, *39*(6), 1236–1241. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.03.006>
- Sun, B., Leandro, C., Ricardo Da Silva, J. M., & Spranger, I. (1998). Separation of Grape and Wine Proanthocyanidins According to Their Degree of Polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(4), 1390–1396. <https://doi.org/10.1021/jf970753d>
- Taylor, R. D., Jewsbury, P. J., & Essex, J. W. (2002). A review of protein-small molecule docking methods. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, *16*(3), 151–166. <https://doi.org/10.1023/A:1020155510718>
- Teng, R. W., Bui, T. K. A., McManus, D., Armstrong, D., Mau, S. L., & Bacic, A.



- (2005). Regioselective acylation of several polyhydroxylated natural compounds by *Candida antarctica* lipase B. *Biocatalysis and Biotransformation*, 23(2), 109–116. <https://doi.org/10.1080/1024220500132508>
- Thovhogi, N., Park, E., Manikandan, E., Maaza, M., & Gurib-Fakim, A. (2016). Physical properties of CdO nanoparticles synthesized by green chemistry via *Hibiscus Sabdariffa* flower extract. *Journal of Alloys and Compounds*, 655, 314–320. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2015.09.063>
- Torsi, G., Chiavari, G., Laghi, C., & Asmundsdottir, A. M. (1990). Responses of different UV-visible detectors in high-performance liquid chromatographic measurements when the absolute number of moles of an analyte is measured. *Journal of Chromatography A*, 518(C), 135–140. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)93168-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)93168-1)
- Traversier, M., Gaslonde, T., Milesi, S., Michel, S., & Delannay, E. (2018). *Polar lipids in cosmetics: recent trends in extraction, separation, analysis and main applications*. *Phytochemistry Reviews* (Vol. 17). <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9588-7>
- Trouillas, P., Di Meo, F., Gierschner, J., Linares, M., Sancho-García, J. C., & Otyepka, M. (2015). Optical properties of wine pigments: theoretical guidelines with new methodological perspectives. *Tetrahedron*, 71(20), 3079–3088. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2014.10.046>
- Trouillas, P., Sancho-García, J. C., De Freitas, V., Gierschner, J., Otyepka, M., & Dangles, O. (2016). Stabilizing and Modulating Color by Copigmentation: Insights from Theory and Experiment. *Chemical Reviews*, 116(9), 4937–4982. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00507>
- Ueno, K. (1977). Cyanidin Bromide Monohydrate (3,5,7,3',4'-Pentahydroxyflavylium Bromide Monohydrate). *Acta Crystallographica*, 114, 114–116.
- University of Groningen. (2020). Molecular Docking with *Candida antarctica* lipase B. Recuperado el 14 de mayo de 2020, de <https://www.rug.nl/research/portal/files/14526847/c10.pdf>
- Uppenberg Jonas, Morgens, H., Shamkant, P., & Alwyn, J. T. (1994). The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B



- from *Candida antarctica*. *Structure*, 2(4), 293–308.  
[https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00031-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00031-9)
- Vallverdú-Queralt, A., Biler, M., Meudec, E., Guernevé, C. Le, Vernhet, A., Mazauric, J., ... Dangles, O. (2016). p -Hydroxyphenyl-pyranoanthocyanins : An Experimental and Theoretical Investigation of Their Acid — Base Properties and Molecular Interactions, 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms17111842>
- Veličkowska, S. K., & Mirhosseini, H. (2013). Isolation of Anthocyanins by High-Speed Countercurrent Chromatography and Application of the Color Activity Concept to Different Varieties of Red Grape Pomace from Macedonia. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 03(06). <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000243>
- Versari, A., Parpinello, G. P., & Fabiani, A. (2007). Comparison of two quantitation methods in HPLC: Standardless versus calibration with external standards. Application to the analysis of amino acids in fruit juices. *Journal of Chromatographic Science*, 45(8), 515–518.  
<https://doi.org/10.1093/chromsci/45.8.515>
- Vrhovsek, U., Palchetti, A., Reniero, F., Guillou, C., Masuero, D., & Mattivi, F. (2006). Concentration and mean degree of polymerization of Rubus ellagitannins evaluated by optimized acid methanolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12), 4469–4475. <https://doi.org/10.1021/jf060404w>
- Waters. (2020). Waters. Recuperado el 19 de agosto de 2020, de <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/misc/sep-pak-c18-cartridges.2.html?page=2>
- Wei, Y., Sardar, M. R., Sutherland, I. A., & Fisher, D. (2011). Separation of delphinidin-3-o-sambubioside, cyanidin-3-o-sambubioside and p-coumaric acid from cranberry by CCC followed by prep-HPLC using robotic CCC solvent system selection. *Chromatographia*, 74(5–6), 367–373.  
<https://doi.org/10.1007/s10337-011-2076-5>
- Woodford, J. N. (2005). A DFT investigation of anthocyanidins. *Chemical Physics Letters*, 410(4–6), 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2005.05.067>
- Xia, E. Q., Deng, G. F., Guo, Y. J., & Li, H. Bin. (2010). Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(2),



622–646. <https://doi.org/10.3390/ijms11020622>

Xie, Y., An, J., Yang, G., Wu, G., Zhang, Y., Cui, L., & Feng, Y. (2014). Enhanced enzyme kinetic stability by increasing rigidity within the active site. *Journal of Biological Chemistry*, 289(11), 7994–8006.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.536045>

Yang, W., Kortensniemi, M., Ma, X., Zheng, J., & Yang, B. (2019). Enzymatic acylation of blackcurrant (*Ribes nigrum*) anthocyanins and evaluation of lipophilic properties and antioxidant capacity of derivatives. *Food Chemistry*, 281(October 2018), 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.111>

Yang, W., Kortensniemi, M., Yang, B., & Zheng, J. (2018). Enzymatic Acylation of Anthocyanins Isolated from Alpine Bearberry (*Arctostaphylos alpina*) and Lipophilic Properties, Thermostability, and Antioxidant Capacity of the Derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(11), 2909–2916. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05924>

Zhen, J., Villani, T. S., Guo, Y., Qi, Y., Chin, K., Pan, M. H., ... Wu, Q. (2016). Phytochemistry, antioxidant capacity, total phenolic content and anti-inflammatory activity of *Hibiscus sabdariffa* leaves. *Food Chemistry*, 190, 673–680. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.006>

Zhong, Y., & Shahidi, F. (2011). Lipophilized epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives as novel antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(12), 6526–6533. <https://doi.org/10.1021/jf201050j>

Zhu, S., Li, Y., Li, Z., Ma, C., Lou, Z., Yokoyama, W., & Wang, H. (2014). Lipase-catalyzed synthesis of acetylated EGCG and antioxidant properties of the acetylated derivatives. *Food Research International*, 56, 279–286. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.026>



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS




## APÉNDICE DE ENTREGABLES

### ARTÍCULO PUBLICADO EN LA REVISTA MOLECULES



Article

## Theoretical Characterization by Density Functional Theory (DFT) of Delphinidin 3-O-Sambubioside and Its Esters Obtained by Chemical Lipophilization

Ana Selene Márquez-Rodríguez <sup>1</sup>, Claudia Grajeda-Iglesias <sup>2</sup> , Nora-Aydeé Sánchez-Bojorge <sup>1</sup>,  
María-Cruz Figueroa-Espinoza <sup>3</sup>, Luz-María Rodríguez-Valdez <sup>1</sup>,  
María Elena Fuentes-Montero <sup>1,\*</sup>  and Erika Salas <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua 31125, México; anaselene.marquez@gmail.com (A.S.M.-R.); norasanchez15@gmail.com (N.-A.S.-B.); lmrodrig@uach.mx (L.-M.R.-V.)

<sup>2</sup> Technion-Israel Institute of Technology, Haifa 31096, Israel; claugrajeda@gmail.com

<sup>3</sup> Montpellier SupAgro, 34060 Montpellier, France; maria-cruz.figueroa@cirad.fr

\* Correspondence: mfuentes@uach.mx (M.E.F.-M.); esalas@uach.mx (E.S.);  
Tel.: +52(614)-2366000 (ext. 4279) (M.E.F.-M.); +52(614)-2366000 (ext. 4286) (E.S.)

Academic Editors: M. Monica Giusti and Gregory T. Sigurdson

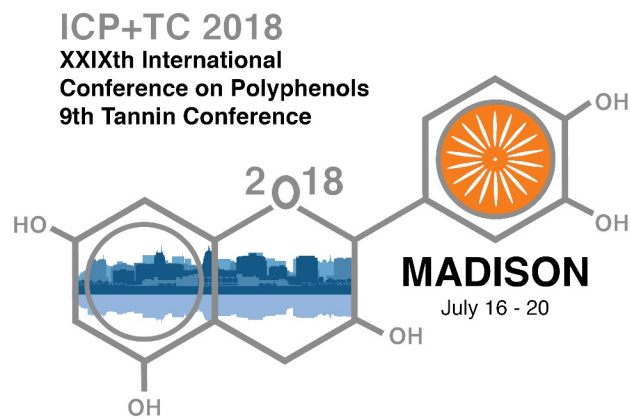
Received: 1 June 2018; Accepted: 27 June 2018; Published: 29 June 2018





FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

## PRESENTACIÓN ORAL EN EL XXIXTH INTERNATIONAL CONFERENCE ON POLYPHENOLS AND 9TH TANNIN CONFERENCE.



### Meeting Agenda

The International Conference on Polyphenols will take place at Memorial Union on the University of Wisconsin - Madison campus.

\*Tentative Agenda - Details Subject to Change\*

**Monday, July 16, 2018**

8:00 AM - 5:00 PM	Registration	Annex
8:30 AM - 8:50 AM	Opening Ceremony	Great Hall
8:50 AM - 9:05 AM	Ragai Ibrahim Tribute Lecture <i>Denis Barron</i>	Great Hall
9:05 AM - 9:55 AM	Opening Lecture <i>Navindra Seeram, USA</i>	Great Hall
Session Topic 1 9:55 AM	Chemical and Physical-Chemistry <i>Session Chairs: Stéphane Quideau &amp; Maria-Teresa Escribano &amp; Kristiina Wahala</i>	Great Hall
9:55 AM	Plenary: <i>Total Synthesis of Complex Natural Flavonoids and Isoflavonoids</i>	Keisuke Suzuki
10:40 AM	<i>Theoretical Study of the inhibition of p90 Ribosomal S6 Kinase by Flavonoid Compounds</i>	Serge Antonczak
10:55 AM	<i>Extending the blue color stabilization of anthocyanin derivatives</i>	Luis Cruz
11:10 AM	Coffee Break	Great Hall Foyer
11:40 AM	<i>Red cabbage anthocyanins: water addition, acid - base equilibria and chemical stability in acidic to mildly alkaline conditions</i>	Olivier Dangles
11:55 AM	<i>Using density functional theory (DFT) to understand the loss of red color intensity of anthocyanin esters obtained by chemical lipophilization of Delphinidin 3-O-Sambubioside</i>	Ana Selene Marquez

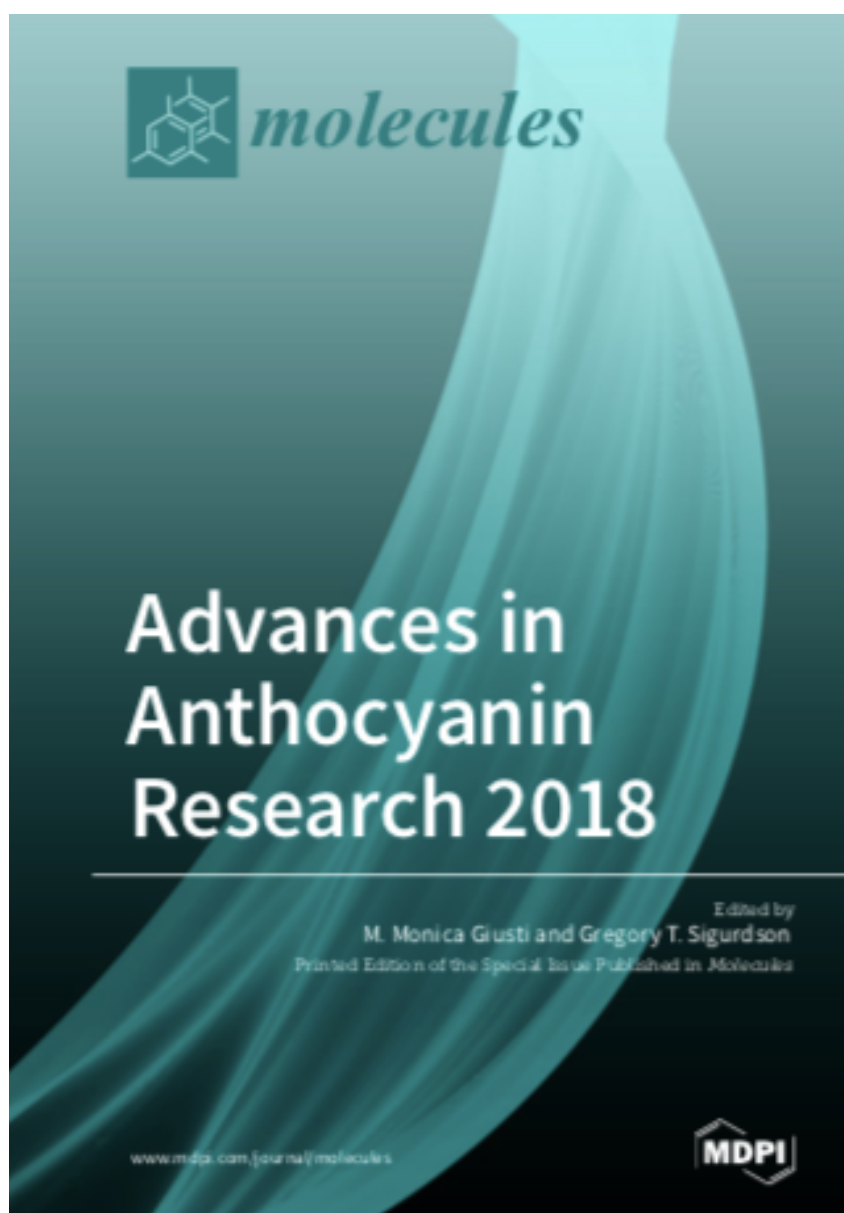


FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

## CAPÍTULO DE LIBRO ADVANCES IN ANTHOCYANIN REASERCH 2018

El artículo científico publicado en el 2018, con el título de “Theoretical characterization by Density Functional Theory (DFT) of Delphinidin 3-O-Sambubioside and Its Esters Obtained By Chemical Lipophilization” fue publicado en el libro titulado Advances in Anthocyanin Reaserch 2018.

Paginas 151-167 (2019) ISBN: 978-3-03897-523-6







FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

## PRESENTACIÓN ORAL EN EL 1ST INTERNATIONAL FOOD RESEARCH WORKSHOP IN THE CHIHUAHUA DESERT REGION OF NORTH AMERICA.

### 1st International Food Research Workshop in the Chihuahua Desert Region of North America



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
CHIHUAHUA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



NEW MEXICO STATE UNIVERSITY  
FAMILY AND CONSUMER SCIENCES

November 6-7, 2020

## November 7, 2020

Moderators:

Efrén Delgado, PhD.

Néstor Gutiérrez Méndez, DC.

**9.00 - 10.00** Plenary: Analysis of anthocyanins by mass spectrometry, Erika Salas Muñoz, DC.

**10.00 - 12.00** SESSION: Isolation and microencapsulation of bioactive compounds

**10.00 - 10.20** Improving shelf life of sugarcane bagasse phenolic compounds by microencapsulation, Victor Velázquez Martínez.

**10.20 - 10.40** Effect of plant-based, animal-based and algae supplemented feed sources in *L. vannamei* gut microbiota populations, Jorge Galarza.

**10.40 - 11.00** Extraction of dairy phospholipids using switchable solvents, Kaavya Rathnakumar.

**11.00 - 11.20** Physicochemical properties and enzymatic lipophilization of anthocyanin isolated from *Hibiscus sabdariffa*, Ana Selene Márquez Rodríguez.

**11.20 - 11.40** Experimental and theoretical analysis of the molecular interactions between ricin protein and the flavonol quercetin, Mayra Cristina Martínez Cenicerros.

**11.40 - 12.00** Ultrasonic assisted extraction of coenzyme Q10 produced by *Sporidiobolus johnsonii* ATCC 20490, Gerardo Alberto López Licerio.

**12.00 - 12.30** Break



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: <http://ees.elsevier.com>

Disaccharide anthocyanin delphinidin 3-O-sambubioside from *Hibiscus sabdariffa* L.:  
*Candida antarctica* lipase B-catalyzed fatty acid acylation and study of its color  
properties

A.S. Marquez-Rodriguez<sup>a</sup>, M. Guimarães<sup>b</sup>, N. Mateus<sup>b</sup>, V. de Freitas<sup>b</sup>, M.L. Ballinas-Casarrubias<sup>a</sup>,  
M.E. Fuentes-Montero<sup>a</sup>, E. Salas<sup>a</sup>, L. Cruz<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua 31125, Mexico

<sup>b</sup> REQUIMTE/LAQV, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre 687, 4169-007 Porto, Portugal

## ARTICLE INFO

**Keywords**

Disaccharide anthocyanin  
Lipophilization  
Fatty acid  
Color stability  
Chemical equilibria

## ABSTRACT

Enzymatic lipophilization is an important process to extend the use of anthocyanins in lipidic media. In this work delphinidin 3-O-sambubioside (Dp3sam) isolated from *Hibiscus sabdariffa* L. flower was esterified with octanoic acid using *Candida antarctica* lipase B. The physical-chemical properties of the new lipophilic pigment were studied by UV-vis spectroscopy. Dp3sam with chloride, acetate and formate as counter ions were employed to study the lipophilization reaction. The hydrolysis of the reagent was avoided with a formate counter ion and the expected product was achieved with a noteworthy change of solubility. 1D and 2D NMR characterization of Dp3sam-C8 confirmed that the lipophilization took place at the primary alcohol of the glucoside moiety. Overall, the Dp3sam-C8 ester presents a stabilization of the quinoidal base (blue color) at neutral or moderate alkaline pH, which foresees a potential use of this pigment as a broad kind of industries on lipo-soluble formulations.