

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

---



---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
**CHIHUAHUA**

**“DISEÑO DE COMPÓSITOS COLORANTES A PARTIR DE PIGMENTOS  
NATURALES”**

POR:

**I. Q. ARASAY MARÍA CARRIÓN ROMERO**

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

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN QUÍMICA**

**CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO**

**ENERO DE 2022**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
CHIHUAHUA

Chihuahua, Chih., a 31 de enero de 2022.

Oficio: 12/CA/SIP/22

**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: **“Diseño de compósitos colorantes a partir de pigmentos naturales”**, presentada por la **I.Q. Arasay María Carrión Romero**, alumna del programa de Maestría en Ciencias en Química.

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”**

**Dr. José Manuel Nápoles Duarte**  
Asesor de tesis

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

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

**Dra. María Elena Fuentes Montero**  
Directora de tesis

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



**FACULTAD DE**  
**CIENCIAS QUÍMICAS**  
SECRETARIA  
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>

***“La resiliencia se entiende como la capacidad del ser humano para hacer frente a las adversidades de la vida, superarlas y ser transformado positivamente por ellas”***

***Edith Grotberg***

## **Agradecimientos**

***Quiero expresar mi mayor agradecimiento a:***

***Mi familia, que me ha brindado todo el apoyo para llevar a delante mis estudios.***

***Todas mis amistades por su incondicional ayuda ante cualquier problema y por los momentos agradables que compartimos.***

***Los profesores que me han impartido todas las asignaturas durante estos dos años, las cuales serán la base para el conocimiento posterior.***

***Mis asesores por su guía y recomendaciones durante todo el desarrollo de este trabajo.***

***A la Universidad Autónoma de Chihuahua y a la Facultad de Ciencias Químicas por la oportunidad de desarrollar un posgrado.***

***Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado sin el cual no hubiese sido posible el desarrollo de la investigación.***

***De forma general muchas gracias a todos***

## ***Dedicatoria***

***Quiero dedicar este trabajo a mi familia que siempre confió en que cumpliría mis objetivos a pesar de cualquier situación que pudiera ocurrir. A ellos que me brindaron su apoyo incondicional desde el inicio de esta travesía.***



## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES .....	4
II.I. Generalidades sobre los pigmentos naturales .....	4
II.II. Características y estructura química de las antocianinas .....	5
II.III. Estabilidad de las antocianinas .....	7
II.IV. Características de los minerales porosos utilizados en el Azul Maya .....	9
II.V. Teoría del Funcional de la Densidad .....	11
III. Problema .....	14
IV. Hipótesis .....	14
V. OBJETIVOS.....	14
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
VI.I. Materiales y equipos:.....	15
VI.II. Métodos .....	15
VI.II.I. Cálculos teóricos .....	15
VI.II.II. Pruebas experimentales.....	18
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	23
VII.I. Cálculos teóricos .....	23
VII.I.I. Optimización de la geometría de las moléculas .....	23
VII.I.II. Cálculo de espectro infrarrojo (IR).....	26



VII.I.III. Cálculo de espectro de absorción (UV-Vis).....	29
VII.I.IV. Cálculo de reactividad química global.....	30
VII.II. Resultados experimentales.....	32
VII.II.I. Obtención del extracto con antocianinas.....	32
VII.II.II. Contenido de antocianinas.....	33
VII.II.III. Formación del pigmento compuesto.....	33
VII.II.IV. Caracterización del compuesto híbrido formado.....	34
VII.II.V. Análisis estadístico.....	61
VII.III. Discusión General.....	66
VIII. CONCLUSIONES.....	68
IX. RECOMENDACIONES.....	71
X.REFERENCIAS.....	72
APÉNDICES.....	76



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Validación de los métodos de cálculo para la molécula de Cianidina y Delfinidina utilizando las distancias y ángulos de enlace. ....	24
Tabla 2. Validación de diferentes conjuntos bases para el método DFT: B3LYP para la Cianidina y Delfinidina.....	25
Tabla 3. Frecuencias teóricas y experimentales más intensas para la molécula de Cianidina .....	28
Tabla 4. Principales contribuciones de las transiciones electrónicas y fuerzas del oscilador en la obtención de los valores de $\lambda$ (nm) para las antocianinas. ....	29
Tabla 5. Propiedades químicas moléculas de Cianidina y Delfinidina utilizando aproximación por orbitales. ....	30
Tabla 6. Propiedades químicas moléculas de Cianidina y Delfinidina utilizando aproximación por energía.....	31
Tabla 7. Comportamiento de la longitud de onda del máximo de absorción para las muestras de Extracto de Jamaica calentado y el Filtrado líquido del compuesto.42	
Tabla 8. Comparación entre los ángulos de los principales picos de las muestras de Sepiolita, Flor de Jamaica y Pigmento compuesto.....	51
Tabla 9. Comparación entre los ángulos de los principales picos de las muestras de Sepiolita, Flor de Jamaica y Filtrado líquido del compuesto.....	54
Tabla 10. Comparación entre los ángulos de los principales picos de las muestras de Sepiolita, Flor de Jamaica y Filtrado sólido del compuesto.....	57
Tabla 11. Ángulos de difracción para las diferentes muestras de Sepiolita, Sepiolita calentada y pigmento compuesto.....	60
Tabla 12. Valores de absorbancia (520 nm) con desviación estándar para las muestras de extracto de Jamaica calentado y filtrado líquido del compuesto.....	61



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Tabla 13. Valores de Luminosidad, a, b, Cromaticidad y Ángulo de tono con la desviación estándar para la muestras de extracto de Jamaica calentado, filtrado líquido del compuesto y pigmento compuesto. .... 63



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras de las principales antocianinas presentes en el Hibiscus (a) Dp-samb y (b) Cy-samb .....	1
Figura 2. Estructura del catión flavilio.....	5
Figura 3. Estructuras de las antocianinas más comunes. ....	6
Figura 4. Transformaciones estructurales de las antocianinas en agua por efecto del pH.....	8
Figura 5. Proceso para la optimización de las estructuras de las moléculas....	16
Figura 6. Diagrama de flujo para el proceso de formación del pigmento compuesto. ....	18
Figura 7. Difracción de Rayos X. Ley de Bragg.....	23
Figura 8. Estructuras sin optimizar dibujadas en GaussView 09, Cianidina (a) y Delfinidina (b) .....	24
Figura 9. Estructuras optimizadas para la molécula de Cianidina (a) y Delfinidina (b) con DFT: B3LYP/6-31G.....	26
Figura 10. Espectros IR (a) experimental (Dimitri et al., 2005) y (b) teórico (DFT:B3LYP/6-31G) para la molécula de Cianidina.....	27
Figura 11. Espectros infrarrojo moléculas de Cianidina y Delfinidina .....	28
Figura 12. Espectros UV-Vis para la molécula de Cianidina y Delfinidina .....	30
Figura 13. Orbitales Moleculares HOMO (a) y LUMO (b) para la Cianidina .....	31
Figura 14. Orbitales Moleculares HOMO (a) y LUMO (b) para la Delfinidina ...	31
Figura 15. Barrido espectral UV-Vis de los antocianos presentes en el <i>Hibiscus sabdariffa L.</i> .....	32
Figura 16. Comparación entre el color de extracto fenólico y el pigmento compuesto formado .....	34



Figura 17. Microscopía de barrido electrónico de las muestras de Sepiolita (a), Flor de Jamaica (b) y Pigmento compuesto (c). .....	35
Figura 18. Distribución de los diferentes tamaños de partícula para la muestra de Sepiolita.....	36
Figura 19. Distribución de los diferentes tamaños de partícula para la muestra de Flor de Jamaica.....	37
Figura 20. Distribución de los diferentes tamaños de partícula para la muestra de pigmento compuesto. ....	38
Figura 21. Cinéticas de degradación de los antocianos presentes en el Extracto de Jamaica calentado y en el Filtrado líquido del compuesto. ....	39
Figura 22. Transformación logarítmica de las concentración de los antocianos para las muestras de Extracto de Jamaica calentado y Filtrado Líquido del compuesto.	40
Figura 23. Barridos espectrales para el Extracto de Jamaica calentado.....	41
Figura 24. Barridos espectrales para el Filtrado líquido del compuesto. ....	41
Figura 25. Variación de la luminosidad con el tiempo para el Extracto de Jamaica calentado, Filtrado líquido del compuesto y Pigmento compuesto.....	43
Figura 26. Variación del parámetro a con el tiempo para el Extracto de Jamaica calentado, Filtrado líquido del compuesto y Pigmento compuesto.....	44
Figura 27. Variación del parámetro b con el tiempo para el Extracto de Jamaica calentado, Filtrado líquido del compuesto y Pigmento compuesto.....	45
Figura 28. Variación de la Cromaticidad con el tiempo para el Extracto de Jamaica calentado, Filtrado líquido del compuesto y Pigmento compuesto.....	46
Figura 29. Variación del Ángulo de tono con el tiempo para el Extracto de Jamaica calentado, Filtrado líquido del compuesto y Pigmento compuesto.....	47



Figura 30. Muestras para Difracción de Rayos X. (a) Flor de Jamaica, (b) Sepiolita, (c) Pigmento Compuesto, (d) Filtrado líquido del compuesto, (e) Filtrado sólido del compuesto.....	48
Figura 31. Difractogramas de Rayos X. (a) Flor de Jamaica, (b) Sepiolita, (c) Pigmento compuesto, (d) Filtrado líquido del compuesto, (e) Filtrado sólido del compuesto. ....	50
Figura 32. Difractogramas de Rayos X polvo. Flor de Jamaica (rojo), Sepiolita (negro), Pigmento compuesto (rosa). ....	51
Figura 33. Variaciones en la posición de los picos para las muestras de Pigmento compuesto, Sepiolita y Flor de Jamaica. ....	53
Figura 34. Difractogramas de Rayos X polvo. Flor de Jamaica (rojo), Sepiolita (negro), Filtrado líquido del compuesto (marrón). ....	54
Figura 35. Variaciones en la posición de los picos para las muestras de Filtrado líquido del compuesto, Sepiolita y Flor de Jamaica, (a) picos nuevos, (b) picos desplazados hacia la izquierda. ....	56
Figura 36. Difractogramas de Rayos X polvo. Flor de Jamaica (rojo), Sepiolita (negro), Filtrado sólido del compuesto (rosa). ....	57
Figura 37. Variaciones en la posición de los picos para las muestras de Filtrado líquido del compuesto, Sepiolita y Flor de Jamaica ....	59
Figura 38. Difractogramas de Rayos X polvo. Sepiolita (negro), Sepiolita calentada (azul) y pigmento compuesto (rosa). ....	60



## LISTA DE ABREVIATURAS

Dp-samb	Delfinidina-3-O-sambubiósido
Cy-samb	Cianidina-3-O-sambubiósido
DFT	Teoría del Funcional de la Densidad
TD	Dependiente del tiempo
UFF	Campo de Fuerza Universal
AM1	Método Amber 1
PM3	Método Parametrizado 3
HF	Hartree Fock
B3LYP	Funcional de Becke, Lee, Yang y Parr
B3PW91	Funcional de Becke, Perdew y Want, 91
PBE	Funcional de Perdew, Burke, y Ernzerhof
M06-2X	Funcional híbrido de Truhlar and Zhao
STO	Orbitales tipo Slater
CIEL *a*b*	Espacio de color L, a, b
HOMO	Orbital Molecular más Alto Ocupado
LUMO	Orbital Molecular más Bajo Desocupado
H → L	Transiciones de orbital HOMO a orbital LUMO
N	Molécula neutra
N+1	Molécula cargada negativamente (anión molecular)



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

N-1

Molécula cargada positivamente (catión molecular)



## RESUMEN

El Azul Maya es un pigmento desarrollado por esta antigua civilización que tiene gran estabilidad. En la actualidad las construcciones mayas conservan el azul brillante en sus murales, soportando ambientes húmedos y altas temperaturas. Además, se ha comprobado su persistencia frente a solventes químicos, ácidos y también es resistente a la biodegradación. Se conoce que este pigmento se encuentra estabilizado en arcillas. Por otro lado, varios estudios han demostrado que algunos pigmentos naturales presentes en vegetales, especias etc. presentan propiedades antioxidantes y anticancerígenas pero a su vez son muy sensibles a la luz, temperatura, hidratación, cambios en el pH y ataque iónico. Este trabajo tiene como objetivo estabilizar las antocianinas presentes en la flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L), utilizando una arcilla, siguiendo la metodología de civilizaciones antiguas. Las estructuras de las moléculas fueron optimizadas mediante métodos de química computacional, siendo el método DFT: B3LYP/6-31G el que mejor correlación reportó entre datos teóricos y experimentales para las dos moléculas, Cianidina y Delfinidina, con un valor de  $R^2$  de 0.917 y 0.916 respectivamente. Se determinaron propiedades químicas de potencial iónico, afinidad electrónica, potencial químico, electronegatividad, dureza y blandura de las moléculas lo cual indicó que la Cianidina es más estable que la Delfinidina. Se elaboró un compuesto colorante utilizando un extracto de la flor de Jamaica molido y polvo de Sepiolita natural utilizando técnicas de antiguas civilizaciones precolombinas. La microscopía de barrido electrónico permitió obtener imágenes donde se mostró que la muestra de Flor de Jamaica tiene un tamaño de partícula inferior a la muestra de Sepiolita, siendo en promedio 0.01 y 0.18  $\mu\text{m}$  respectivamente. El estudio de estabilidad realizado mediante mediciones espectrofotométricas indicó que los antocianos presentes en la flor de Jamaica se degradan a una velocidad menor en el pigmento compuesto que en un extracto fenólico, con valores de  $1.62 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  y  $1.85 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  respectivamente. Los análisis por Difracción de Rayos X mostraron evidencias de interacciones entre la molécula y la arcilla en el pigmento compuesto obtenido.



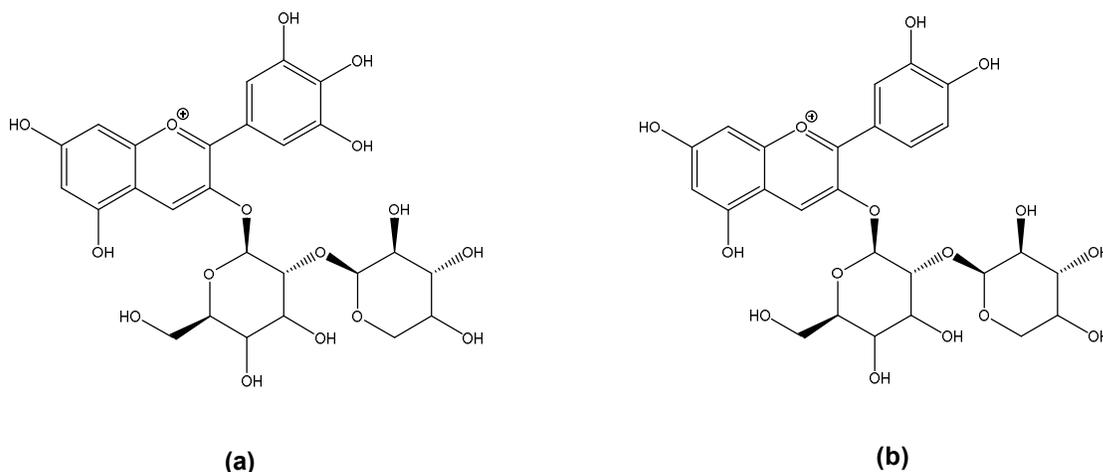
## ABSTRACT

Maya Blue is a pigment developed by this ancient civilization that has great stability. Currently, the Mayan constructions preserve the bright blue in their murals, withstanding humid environments and high temperatures. In addition, its persistence against chemical solvents and acids has been proven and it is also resistant to biodegradation. It is known that this pigment is stabilized in clays. On the other hand, several studies have shown that some natural pigments present in vegetables, spices, etc. They have antioxidant and anticancer properties but are also very sensitive to light, temperature, hydration, changes in pH and ionic attack. This work aims to stabilize the anthocyanins present in the Jamaica flower (*Hibiscus sabdariffa* L), using a clay, following the methodology of ancient civilizations. The structures of the molecules were optimized by computational chemistry methods, being the DFT method: B3LYP/6-31G the one that reported the best correlation between theoretical and experimental data for the two molecules, Cyanidin and Delphinidin, with an  $R^2$  value of 0.917 and 0.916 respectively. Chemical properties of ionic potential, electronic affinity, chemical potential, electronegativity, hardness and softness of the molecules were determined, which indicated that Cyanidin is more stable than Delphinidin. A coloring compound was elaborated using a ground Jamaica flower extract and natural Sepiolite powder using techniques from ancient pre-Columbian civilizations. Scanning electron microscopy allowed obtaining images showing that the Jamaica flower sample has a smaller particle size than the Sepiolite sample, being on average 0.01 and 0.18  $\mu\text{m}$ , respectively. The stability study carried out by means of spectrophotometric measurements indicated that the anthocyanins present in Jamaica flower degrade at a slower rate in the compound pigment than in a phenolic extract, with values of  $1.62 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  and  $1.85 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  respectively. X-Ray Diffraction analyzes showed evidence of interactions between the molecule and the clay in the composite pigment.

## I. INTRODUCCIÓN

La utilización de colorantes naturales alternativos a los sintéticos ha ido creciendo en los últimos tiempos, debido a que son una de las mejores opciones para el uso en alimentos, bebidas o ropas. Los colorantes artificiales, aunque no son peligrosos, pueden llegar a resultar nocivos para la salud, sobre todo cuando se abusa del consumo de los mismos. Las antocianinas son una de las moléculas colorantes que más se investigan en la actualidad debido a sus propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antivirales, entre otras.

*Hibiscus sabdariffa* L. (comúnmente conocido como flor de hibisco, roselle, bissap, flor de Jamaica) es un arbusto de la familia Malvaceae. Ésta planta es una fuente atractiva y barata de colorantes naturales, debido a que sus flores son ricas en antocianinas, las cuales son responsables del color rojo brillante de sus pétalos. Las principales antocianinas del Hibiscus son la Delfinidina-3-O-sambubiósido (Dp-samb) y la Cianidina-3-O-sambubiósido (Cy-samb), las cuales se muestran en la figura 1.



**Figura 1. Estructuras de las principales antocianinas presentes en el Hibiscus (a) Dp-samb y (b) Cy-samb**



Las antocianinas pertenecen a un grupo más grande de polifenoles, conocido como flavonoides, los cuales son capaces de absorber la luz en las regiones UV-Vis, con tonalidades de amarillo-anaranjado a verde-azulado (Grajeda-Iglesias et al., 2016). Estas moléculas son altamente inestables y fácilmente susceptibles a la degradación por efecto de factores como la luz, el pH, la temperatura, entre otros; debido a esto su utilización se ha visto limitada. Sin embargo, se han desarrollado numerosas investigaciones con el fin de aumentar su estabilidad (Cavalcanti et al., 2011).

Algunas investigaciones recientes han demostrado que la utilización de matrices inorgánicas como soporte a moléculas orgánicas, contribuye al aumento de la estabilidad de los pigmentos, concluyéndose que el mayor o menor grado de unión de las moléculas orgánicas depende de las características de la matriz inorgánica. Ésta área de investigación sigue en desarrollo (Wang et al., 2019).

Esta investigación está dirigida a aumentar la estabilidad de las antocianinas a partir de la creación de un pigmento híbrido, utilizando la Sepiolita, una arcilla blanca natural en polvo, conocida desde tiempos precolombinos en Mesoamérica, y en particular en la Península de Yucatán. Para esto se seguirá la metodología empleada por las antiguas civilizaciones Mayas en la elaboración de pigmentos, los cuales presentan extraordinarias propiedades de resistencia a los agresores químicos (ácidos, bases, disolventes) y a la biodegradación, lo que hace que ciertas obras de arte se hayan conservado en buenas condiciones durante siglos en un ambiente tan hostil como la selva tropical (Wang et al., 2019).

Para inferir las propiedades del pigmento compuesto a obtener se utilizarán pruebas y modelaciones basadas en la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT). Esta teoría se ha convertido en la herramienta más utilizada para describir la estructura electrónica de átomos, moléculas y sistemas extendidos, como las superficies y los sólidos; debido a que por un lado ofrece un buen balance entre la precisión requerida para la descripción de diversas propiedades así como el esfuerzo computacional para



alcanzarlas y por otro lado, proporciona un marco teórico idóneo para la fundamentación de conceptos básicos así como para la generación de nuevos criterios (Antony Selvam et al., 2020).

### ***Justificación***

Los pigmentos naturales presentan propiedades antioxidantes y anticancerígenas, pero a su vez son muy sensibles a diversos factores ambientales. En la actualidad se realizan numerosas investigaciones relacionadas con la elaboración de pigmentos híbridos, un amplio campo que se encuentra en continuo desarrollo, con resultados satisfactorios en cuanto a lograr la estabilidad del pigmento. Con esta investigación se busca estabilizar dichos pigmentos utilizando una arcilla, apoyándonos en la metodología para la elaboración del Azul Maya, el cual ha demostrado su gran estabilidad a lo largo del tiempo. Conociendo las disímiles aplicaciones que tienen los pigmentos en la industria alimentaria, cosmética, entre otras, se creará un compuesto a partir de cromóforos naturales (antocianinas) obtenidos de la flor de Jamaica y la Sepiolita, asumiendo que esto podría traer efectos positivos sobre la estabilidad del pigmento.



## II. ANTECEDENTES

### II.I. Generalidades sobre los pigmentos naturales

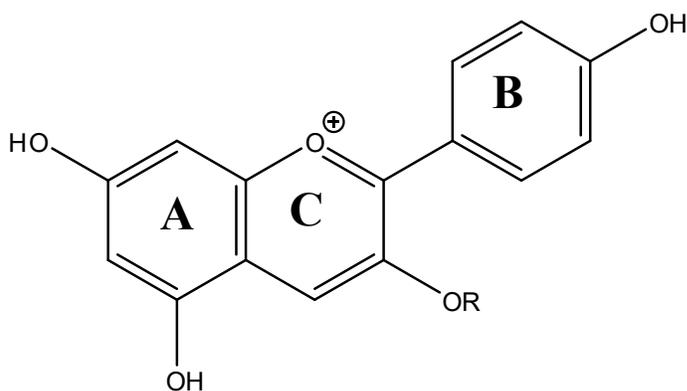
En la actualidad se ha observado un incremento considerable en la utilización de pigmentos naturales frente a los sintéticos debido a que desempeñan un papel potencial en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades justificado por su acción farmacológica, son biodegradables en un corto plazo cuando se encuentran como desechos y pueden ser utilizados como aditivos en alimentos, cosméticos, entre otros productos, por su escasa toxicidad. En la literatura se establece que el término pigmento se utiliza estrictamente para los colorantes no solubles, mientras que los colorantes solubles se denominan tintes (Trouillas et al., 2016).

Los polifenoles se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas y se conocen como compuestos conjugados del tipo  $\pi$  que contienen grupos hidroxilos unidos a anillos aromáticos. Dentro de los polifenoles se encuentran diferentes subclases como las antocianinas, flavonoles, flavanoles, ácidos fenólicos y algunas moléculas compuestas formadas por la unión entre estos grupos. Anouar et al., 2012 argumentó que el objetivo principal de estos compuestos es proteger a las plantas de la luz ultravioleta, ya que se sabe que la mayoría de ellas absorben en este rango espectroscópico y normalmente son sintetizados como parte del metabolismo secundario de las plantas, donde las chalconas son los principales precursores de los flavonoides.

La estructura química que presentan los polifenoles depende del número y la posición de las sustituciones, principalmente -OH, -OCH<sub>3</sub> y grupos glucósidos. En esta sección se incluirán las características generales de los flavonoides, que son la clase a la que pertenecen las moléculas objeto de interés en esta investigación.

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular básicamente formados por dos anillos fenólicos (que se distinguen como A y B) y un heterociclo oxigenado

representado como C. Todo este arreglo conforma la estructura básica de las antocianinas. Su forma protonada se conoce como ión flavilio, que generalmente se encuentra como un catión (ver figura 2). La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química. Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C (Trouillas et al., 2016).



**Figura 2. Estructura del catión flavilio.**

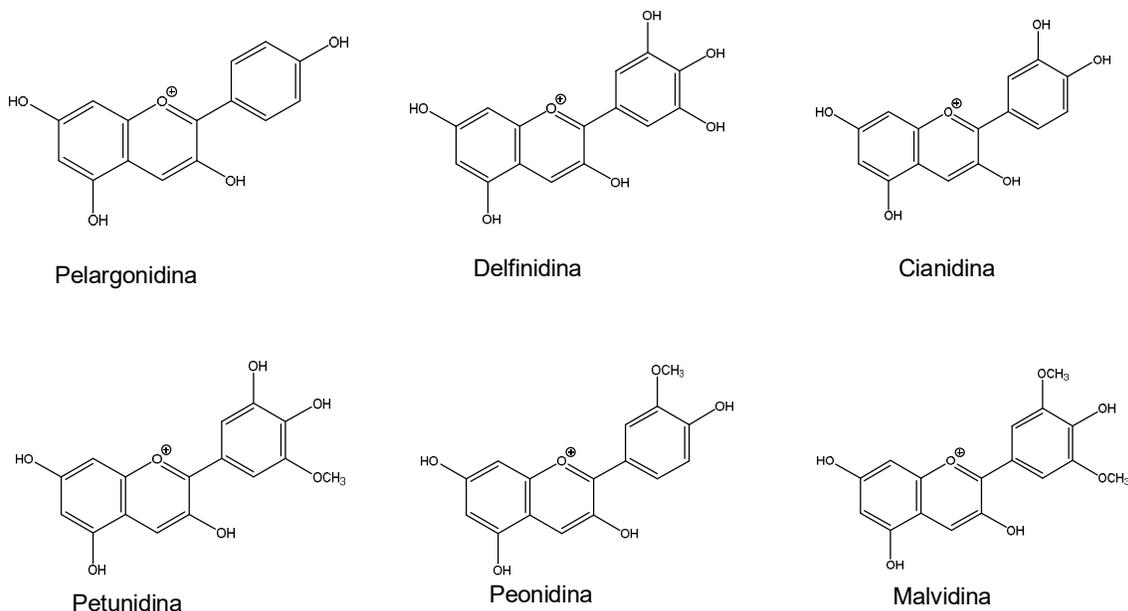
El descubrimiento inicial de los flavonoides fue en 1930 por Szent-Gyorgyi una vez que se aisló una nueva sustancia a partir de naranjas. En ese momento se creía que era una nueva clase de vitaminas, clasificada como vitamina P, pero posteriormente otras investigaciones confirmaron que la nueva sustancia era un flavonoide. A través de los años las investigaciones sobre este tema se han incrementado y hoy en día se cuentan más de 8000 flavonoides aislados de fuentes naturales como cerveza, vino, té verde, té negro, soja, frutas, semillas, flores y verduras (Ballester et al., 2010).

## **II.II. Características y estructura química de las antocianinas**

Los primeros estudios acerca del origen del color en la naturaleza fueron abordados por Richard Willstätter a inicios de la década de 1900, quien determinó que los colores mostrados en las flores dependían de la presencia de una combinación de diferentes antocianinas, en sus diferentes formas estructurales y concentraciones (Grajeda-

Iglesias et al., 2016). Debido a que las antocianinas se han convertido en el principal interés de algunas investigaciones (Silva et al., 2018), para evaluar su utilización como colorante natural en sustitución de colorantes sintéticos, en esta sección se realizará una breve revisión sobre: (1) la estructura de las antocianinas, (2) propiedades de estas biomoléculas y (3) usos que tienen en las diferentes áreas de la industria.

Teniendo en cuenta su estructura química las antocianinas se conocen como glucósidos de las antocianidinas, es decir, están constituidas por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace  $\beta$ -glucosídico. Las antocianidinas generalmente se encuentran como componentes traza de las reacciones de degradación. Las antocianidinas más importantes de las cuales se conoce hoy día son la pelargonidina, delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina (figura 3), nombres que derivan de la fuente vegetal de donde se aislaron por primera vez, la combinación de éstas con los diferentes azúcares genera aproximadamente 150 antocianinas (Aguilera-Otíz et al., 2011).



**Figura 3. Estructuras de las antocianinas más comunes.**

En los últimos tiempos se han reportado varias investigaciones que mencionan las diferentes propiedades que poseen las antocianinas entre las cuales se encuentran su



acción farmacológica y terapéutica que incluyen la reducción de la enfermedad coronaria, efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos; además del mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo (Aguilera-Otíz et al., 2011).

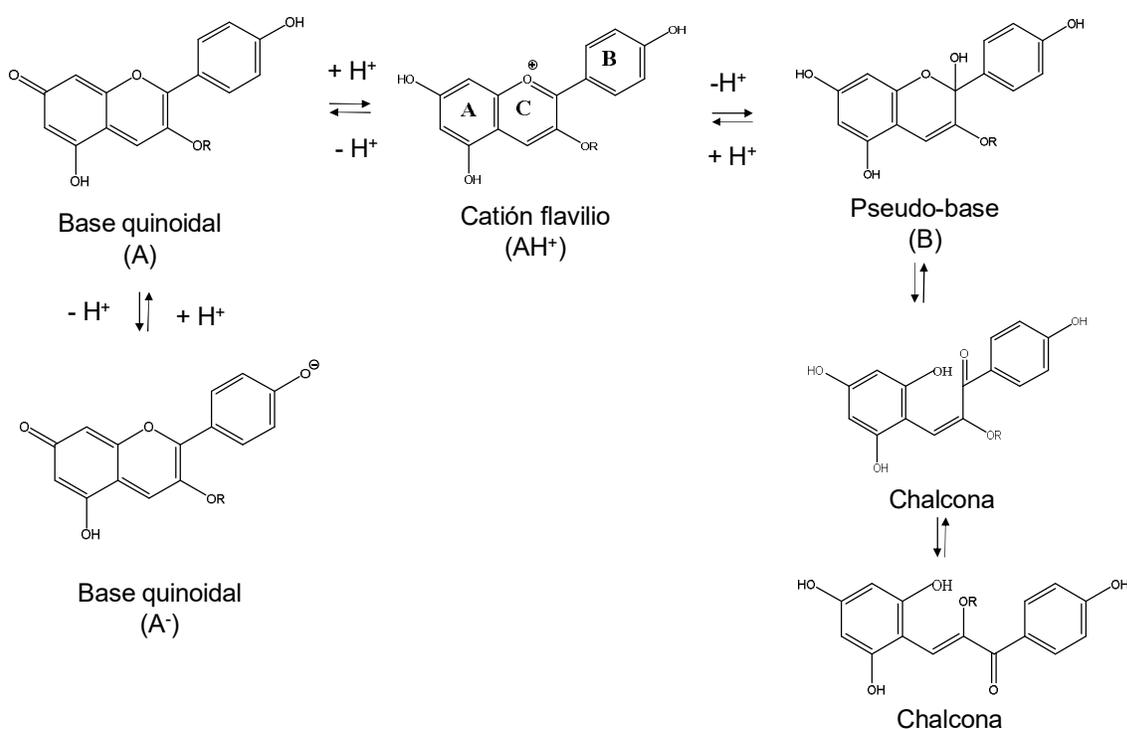
Debido sus propiedades colorantes, su gran biodisponibilidad y bajo costo, las antocianinas han sido utilizadas en la industria alimentaria y farmacéutica (Aguilera-Otíz et al., 2011). Extractos alimenticios ricos en antocianinas han sido incorporados como un suplemento dietético antioxidante con recomendaciones para promover la salud, apariencia más joven y una piel más radiante. Debido a su gran inestabilidad las aplicaciones de las antocianinas en los sistemas alimenticios son preferentemente usadas en alimentos de acidez intermedia para asegurar una predominancia del catión flavilio. Con esta investigación se pretende lograr la estabilización de las antocianinas en diferentes medios para así incrementar las áreas donde se puedan utilizar esta biomoléculas teniendo en cuenta sus variadas propiedades.

### **II.III. Estabilidad de las antocianinas**

Las antocianinas son moléculas con variadas aplicaciones en diferentes esferas de la industria pero debido a su relativa inestabilidad, su utilización se ha visto limitada, estas moléculas son fácilmente susceptibles a la degradación a través de factores físicos y químicos como la luz, el pH, la temperatura, la presencia de sulfito, ácido ascórbico, la presencia de ciertas enzimas, entre otros (Cavalcanti et al., 2011). A continuación se analizará cómo se ve afectada la estabilidad de estas biomoléculas por el efecto de la temperatura, pH y luz, factores que más influyen en las modificaciones a su estructura.

Las antocianinas presentan una mayor estabilidad a bajos valores de pH en medios ácidos que a altos valores de pH en medios básicos. Debido a la naturaleza del catión flavilio que forma parte de la estructura de la molécula, esta puede sufrir cambios estructurales bajo la influencia del pH, dando como resultado diferentes colores y tonalidades a la solución en la cual se encuentren. En soluciones ácidas existen 4

especies en equilibrio, el catión flavilio, la base quinoidal, la chalcona y la pseudo-base. Al aumentar el pH debido a la pérdida de protones  $H^+$ , existe un predominio de la base quinoidal y además se produce la hidratación del catión flavilio dando como resultado la formación de la pseudo-base, la cual podrá dar paso a la formación de la chalcona (figura 4). Todas estas estructuras existirán en diferentes cantidades según el pH del medio (Brouillard R, 1977).



**Figura 4. Transformaciones estructurales de las antocianinas en agua por efecto del pH.**

La influencia de la temperatura en la estabilidad de las antocianinas ha sido estudiada por diferentes investigadores, los cuales han concluido que las altas temperaturas tienen un efecto perjudicial en estas biomoléculas. Entre las investigaciones realizadas podemos citar a Sinela et al., 2017, quienes evaluaron como cambiaba el color y la concentración de antocianinas en un extracto fenólico durante el almacenamiento a diferentes temperaturas. Su estudio indicó que la concentración de antocianinas



disminuía al aumentar la temperatura, evidenciando la degradación de los pigmentos. Basado en estos resultados, en este trabajo se propone utilizar un método que logre estabilizar las antocianinas para luego dar lugar a la obtención de un pigmento que podría ser utilizado en diferentes áreas de la industria química.

La luz afecta a las antocianinas provocando un aumento en la velocidad de su degradación. Amr y Al-Tamimi, 2007 demostraron que la luz tiene un marcado efecto negativo sobre la estabilidad de las antocianinas durante su almacenamiento. El estudio concluyó que conservan mejor el color en condiciones oscuras que en presencia de la luz y a temperatura ambiente. Maier et al., 2009 estudiaron el comportamiento de la estabilidad de las antocianinas almacenadas bajo una luz de neón y en la oscuridad durante 24 semanas, obteniéndose que durante el almacenamiento el contenido de antocianos y ácidos fenólicos disminuye considerablemente bajo la luz.

Entre los fenómenos que favorecen la estabilidad de estas biomoléculas se encuentra la copigmentación, la cual se define en la literatura (Trouillas et al., 2016) como la formación (en presencia o ausencia de iones metálicos) de complejos no covalentes que involucran una antocianina o un pigmento derivado de la antocianina. Mediante la copigmentación las antocianinas se protegen de reacciones de hidratación por medio de las interacciones intermoleculares. También existen reportes de investigaciones que demuestran que la unión de azúcares le confiere mayor estabilidad a las antocianinas en condiciones extremas de pH y temperatura (Cavalcanti et al., 2011).

#### **II.IV. Características de los minerales porosos utilizados en el Azul Maya**

Desde hace algunos años se han incrementado las investigaciones vinculadas a los pigmentos elaborados por las antiguas civilizaciones mesoamericanas, debido a que estos presentan excelentes propiedades de resistencia frente a agresores químicos (ácidos, bases, disolventes) y a la biodegradación. Estas investigaciones reportan que las interacciones entre la arcilla y la molécula que forman estos pigmentos compuestos son la base de la estabilidad del complejo (Polette-Niewold et al., 2007). Debido a esto esta sección se centrará en: (1) las características de las arcillas, (2) utilización de las



arcillas en la elaboración de pigmentos compuestos y (3) los factores involucrados en la estabilidad de los pigmentos híbridos formados.

Las arcillas son partículas minerales pequeñas, de tamaño microscópico cuyas dimensiones son menores o iguales a dos micras (0.002 mm). En su mayoría son estructuras cristalinas reconocidas como filosilicatos, compuestos por Hidroxilo y Oxígeno unidos a elementos como Silicio, Aluminio, Magnesio y otros cationes. Debido a su extremadamente pequeño tamaño de partícula, su morfología laminar y a la presencia de cationes débilmente ligados en el espacio interlaminar se utilizan en diferentes aéreas como la cosmética, farmacéutica, remoción de contaminantes en aguas, elaboración de pigmentos entre otras (Uzunova & Mikosch, 2013). En la siguiente sección solo se hará referencia a las principales investigaciones vinculadas a la utilización de las arcillas en la elaboración de pigmentos debido a que es el principal objetivo de este trabajo.

El Azul Maya es uno de los pigmentos más antiguos elaborado a partir de un colorante natural y una arcilla, el cual conserva su color brillante debido a su gran resistencia frente a diferentes medios. En la actualidad se desarrollan numerosas investigaciones vinculadas a la creación de pigmentos que presenten gran estabilidad. En este sentido Wang et al., 2019 estudiaron las propiedades de color de pigmentos híbridos elaborados utilizando diferentes arcillas con el compuesto de amarillo de bismuto concluyendo que las propiedades de color de los pigmentos híbridos preparados con Atapulgita, Halloysita y Caolín fueron superiores a los preparados con la Sepiolita y la Montmorillonita. Además, la incorporación de la arcilla también mejoró la resistencia a altas temperaturas del amarillo de bismuto, especialmente la Halloysita y el Caolín.

Existen diferentes estudios donde se exponen los factores involucrados en la estabilidad de pigmentos híbridos. Polette-Niewold et al., 2007, desarrolló una investigación donde revisó los métodos sintéticos que se utilizan para la producción del Azul Maya con el objetivo de conocer las interacciones que se producen entre el Índigo y la arcilla a nivel atómico y macromolecular. Las pruebas de estabilidad realizadas concluyeron que existe una fuerte interacción química entre el Índigo y la



Palygorskita, la penetración dentro de los canales de la arcilla es mínima y que la mayor interacción entre la molécula orgánica y la arcilla ocurre en la superficie. Además, existen evidencias de enlaces entre cationes de aluminio y moléculas de oxígeno y nitrógeno del compuesto Dehidroíndigo. Este trabajo puede ser extendido a otras moléculas que no se evaluaron en el estudio, lo cual sienta las bases para la elaboración de pigmentos compuestos orgánicos-inorgánicos con propiedades nuevas para su aplicación en diferentes campos.

## **II.V. Teoría del Funcional de la Densidad**

La Química Computacional es un área de la Química, que utiliza programas computacionales para aplicar los métodos de química teórica, proporcionando el marco teórico para hacer predicciones sobre observaciones experimentales y para explicar fenómenos que involucran átomos, moléculas y materiales. La química computacional utiliza la fisicoquímica, la física molecular y la física cuántica para predecir todo tipo de propiedades moleculares de sistemas químicos, entre las cuales se encuentran la geometría molecular, energía de todo tipo de especies químicas, reactividad química y propiedades magnéticas y eléctricas. Los métodos utilizados en química computacional se dividen en mecánica molecular, dinámica molecular y teoría de estructura electrónica. Los métodos de estructura electrónica son los métodos más completos y que logran describir el sistema con mayor grado de detalle, por lo tanto, son los que se utilizarán en la presente investigación. Teniendo en cuenta lo anterior esta sección se concentrará en: (1) Generalidades de la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) y (2) Utilización de DFT para la predicción de propiedades de las antocianinas.

El método DFT es un procedimiento varacional alternativo a la solución de la ecuación de Schrödinger, donde el funcional de la energía electrónica es minimizado con respecto a la densidad electrónica. Un funcional es una función que toma funciones como su argumento, es decir es una función cuyo dominio es un conjunto de funciones (Antony Selvam et al., 2020). El método se basa en los famosos teoremas de Hohenberg y Kohn quienes demostraron que la energía de un sistema químico en



estado basal, es solamente función de la densidad electrónica la cual puede obtenerse a través del cuadrado de la función de onda e integrando sobre las coordenadas de los electrones. Para obtener una mejor representación de la molécula se realiza un aumento del conjunto base que es una descripción matemática de los orbitales de un sistema químico. Es muy importante la elección de la base de cálculo, en el caso de bases pequeñas se obtienen resultados rápidos sin utilizar muchos recursos de cálculo, pero esto se refleja en unos resultados poco precisos, ya que muestran una representación muy pobre de la realidad. Los conjuntos bases más grandes constituyen una aproximación más exacta de los orbitales por imponer pocas restricciones sobre la localización de los electrones en el espacio, hay que tener en cuenta que el coste computacional aumenta (Boyd, 2019). DFT es uno de los métodos más utilizados debido a que alcanza una exactitud similar a otros métodos de cálculo en menos tiempo y con una menor inversión desde el punto de vista computacional. En los últimos años se ha visto una creciente utilización de DFT para la predicción de propiedades de antocianinas que incluyen acción antioxidante, complejación con metales, reactividad, entre otras (Trouillas et al., 2015). La siguiente descripción, se centrará principalmente en las investigaciones realizadas sobre este tema en particular, sin dejar de mencionar que se utiliza este método en la predicción de propiedades de disímiles estructuras moleculares. Para predecir las propiedades de las antocianinas se necesita que el método de DFT que se seleccione sea lo suficientemente preciso debido a que la comparación con los datos de Difracción de Rayos X es bastante limitada ya que el empaquetamiento de cristales puede inducir graves restricciones que no existen cuando la molécula se encuentra en solución. Ge et al., 2015 determinaron las propiedades ópticas en fase gaseosa de las seis antocianinas más comunes utilizando DFT. Sus simulaciones TD-DFT, a nivel PBE de las propiedades ópticas de diferentes antocianinas en la fase gaseosa, mostraron una amplia gama de colores diferentes. En cambio, las antocianinas en soluciones muy ácidas mostraron una coloración rojiza/rosácea bastante uniforme. En estos casos, la adopción de un híbrido funcional mejoró considerablemente la uniformidad del color



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

predicho para diferentes moléculas. Esta investigación evidencia que la elección correcta del método DFT es esencial para la predicción de las propiedades de la molécula que se analice.



### **III. Problema**

No se conoce el efecto que traería sobre la estabilidad de las antocianinas la unión con la Sepiolita, sabiendo que estos son sustancias inestables.

### **IV. Hipótesis**

La complejación de las antocianinas obtenidas a partir de la flor de Jamaica con la Sepiolita, al igual que los métodos utilizados tradicionalmente por las antiguas civilizaciones, tendrá influencia sobre la estabilidad del pigmento.

### **V. OBJETIVOS**

#### ***General***

Evaluar la estabilidad de antocianinas obtenidas a partir de la flor de Jamaica, mediante la creación de un compósito cromóforo natural (antociano) – Sepiolita.

#### ***Específicos***

1. Obtener el cromóforo natural (antocianina) a partir de la flor de Jamaica.
2. Elaborar el compósito orgánico/inorgánico (antocianina-Sepiolita).
3. Caracterizar el compuesto híbrido formado.
4. Predecir las propiedades del pigmento compuesto obtenido, utilizando pruebas y modelaciones basadas en la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT).



## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### VI.I. Materiales y equipos:

Las flores de Jamaica secas utilizadas en el experimento fueron adquiridas en un mercado del estado de Chihuahua y luego se trituraron en una licuadora para lograr un menor tamaño de partícula.

Se utilizó ácido clorhídrico (HCl) para las extracciones de los antocianos marca J.T. Baker con una pureza de 37.5 %.

La Sepiolita utilizada para la formación del pigmento compuesto se obtuvo de Aldrich con una humedad menor de 10% y una concentración de 13 % de Magnesio (Mg).

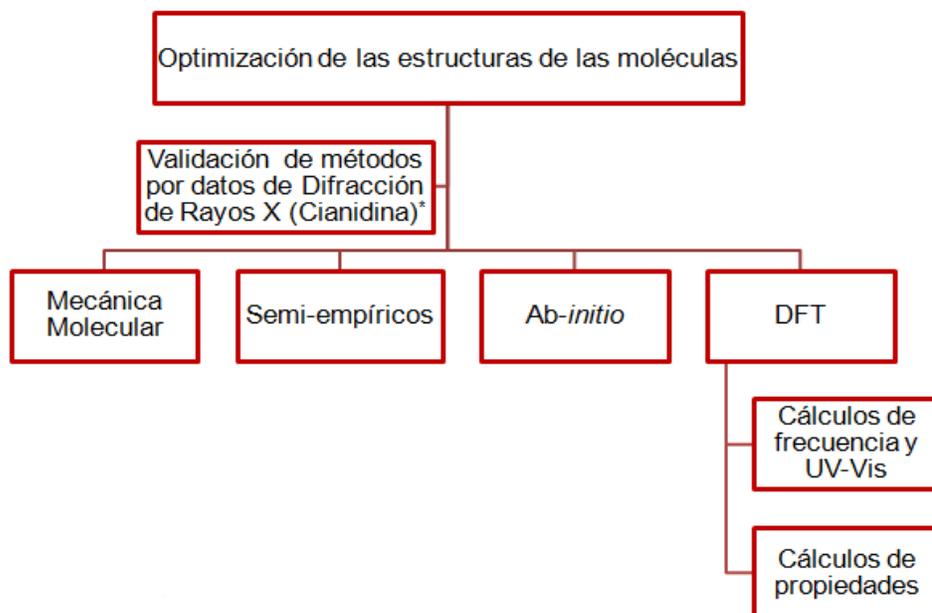
Se utilizaron los siguientes equipos durante la investigación:

- Licuadora (marca INTEX modelo TRENTO 4V)
- Espectrofotómetro UV/Vis Lambda 25 (marca PerkinElmer)
- Colorímetro (marca Konica Minolta modelo CR-400)
- Difractómetro de Rayos-X (marca Panalytical Empyrean)
- Microscopio de barrido electrónico (marca FEI modelo SEM 200)
- Laptop (marca Hewlett-Packard (HP) modelo 15-f039wm)

### VI.II. Métodos

#### VI.II.I. Cálculos teóricos

Los cálculos teóricos fueron realizados de acuerdo al diagrama que se muestra en la figura 5.



**Figura 5. Proceso para la optimización de las estructuras de las moléculas.**

#### **VI.II.I.I Optimización de la geometría de las estructuras de las moléculas**

Se dibujaron en el programa GaussView 5.0 las moléculas de Cianidina y Delfinidina y se validaron sus estructuras utilizando el programa Gaussian 09 con los métodos de cálculo a un nivel de teoría de Mecánica Molecular (UFF, Dreiding), Semi-empírico (AM1, PM3), *Ab-initio* (HF) y DFT (B3LYP, B3PW91, M06-2X). Para la validación del método DFT: B3LYP se emplearon 4 conjuntos de bases (STO-3G, 3-21G, 6-31G, 6-311G). Para el funcional M06-2X se utilizó la “keyword” m062x como instrucción para realizar el cálculo, además todos los cálculos se realizaron con carga +1 y multiplicidad de spin singulete.

Las distancias y ángulos de enlace obtenidos teóricamente utilizando cada uno de los métodos de cálculo, se compararon con los datos obtenidos por Difracción de Rayos X para la molécula de Bromuro de Cianidina (Ueno & Norio, 1977).

#### **VI.II.I.II Cálculo de espectro infrarrojo (IR)**

Se realizaron cálculos de frecuencia para comprobar la ausencia de frecuencias imaginarias luego de realizar la optimización de las moléculas y además obtener los



espectros IR de las moléculas para ver las frecuencias e intensidades. Este cálculo se realizó utilizando el método que mejor resultado brindó para la optimización de las estructuras de las moléculas.

#### VI.II.I.III. Cálculo de espectro de absorción (UV-Vis)

Los espectros UV-Vis teóricos de las moléculas se determinaron utilizando TD-DFT: B3LYP/6-31G. Estos cálculos permiten obtener valores de energías de excitación, fuerzas del oscilador y transiciones electrónicas favorables durante la excitación de las moléculas. Se calcularon 10 estados excitados para las transiciones electrónicas más importantes.

#### VI.II.I.IV. Cálculo de reactividad química global

Las propiedades de reactividad química global fueron determinadas utilizando el cálculo de energía (*single point*) efectuado con HF/6-31G sobre geometrías optimizadas con B3LYP/6-31G, así como la aproximación por orbitales basada en el teorema de Koopmans, que establece que el potencial de ionización y la afinidad electrónica son aproximadamente iguales al negativo de las energías de los orbitales HOMO (orbital molecular más alto ocupado) y LUMO (orbital molecular más bajo desocupado) respectivamente.

$$A = -E(LUMO) \quad (1)$$

$$I = -E(HOMO) \quad (2)$$

También se calcularon las propiedades de reactividad global utilizando el método de cálculo DFT:B3LYP/6-31G y la aproximación por energías utilizando las energías electrónicas para las moléculas N, N+1 y N-1 y las siguientes ecuaciones:

$$I = E(N-1) - E(N) \quad (3)$$

$$A = E(N) - E(N+1) \quad (4)$$

Las propiedades determinadas fueron el potencial químico ( $\mu$ ) a partir de la fórmula:

$$\mu = -\frac{1}{2}(I + A) \quad (5)$$

Donde:

I: Potencial de ionización

A: Afinidad Electrónica

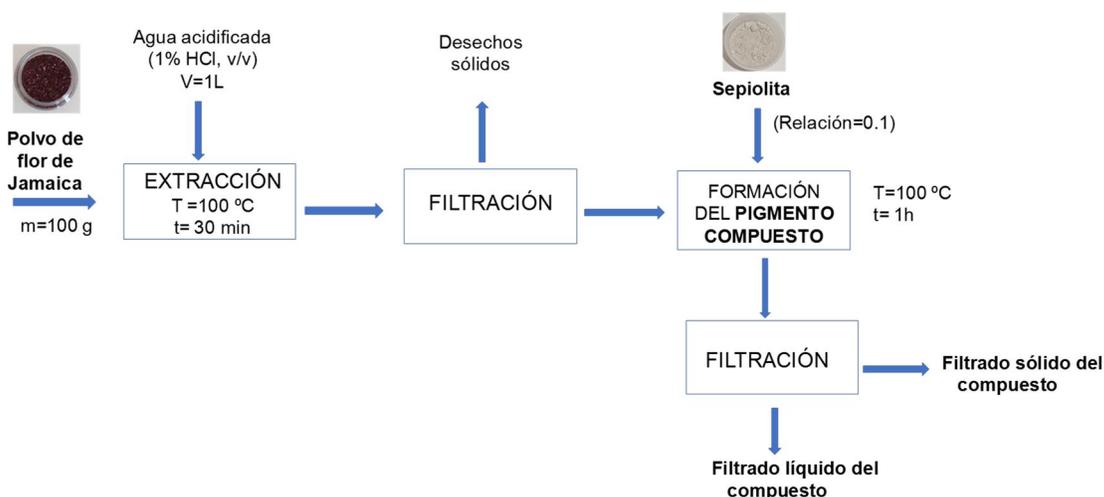
La electronegatividad se obtuvo como el negativo del potencial químico y la dureza química ( $\eta$ ) y la blandura (S) se determinaron a partir de las siguientes expresiones:

$$\eta = \frac{(I - A)}{2} \quad (6)$$

$$S = \frac{1}{(2 * \eta)} \quad (7)$$

### VI.II.II. Pruebas experimentales

Los experimentos se realizaron siguiendo el diagrama de flujo que se muestra a continuación (figura 6) basado en los métodos para la elaboración del Azul Maya desarrollados por Polette-Niewold et al., 2007:



**Figura 6. Diagrama de flujo para el proceso de formación del pigmento compuesto.**

#### VI.II.II.I. Obtención del extracto con antocianinas

Las flores de Jamaica secas se trituraron en una licuadora (INTEX modelo TRENTO 4V) para lograr un menor tamaño de partícula y facilitar el proceso de extracción. Seguidamente se adicionaron 100 g de polvo de flor de Jamaica a un 1L de solución



de agua acidificada (1% HCl, v/v), se calentó a 100 °C durante 30 minutos y se filtró la solución obtenida.

#### **VI.II.II.II. Cuantificación de antocianos**

El contenido de antocianinas se determinó mediante el método diferencial de pH basado en las reacciones que sufren los pigmentos de antocianinas con un cambio de pH (Mónica Giusti & Wrolstad, 2005). La concentración de antocianinas se calculó en base a la Cianidina 3-glucósido utilizando la siguiente fórmula:

$$C = \frac{(A * M * FD * 1000)}{\epsilon * l} \quad (8)$$

Donde:

C: Concentración de antocianina

A: absorbancia

M: peso molecular

FD: factor de dilución

$\epsilon$ : Absortividad molar (se tomó la absortividad molar para la Cianidina 3-glucósido de 26 900)

l: longitud del haz luminosos (1cm)

#### **VI.II.II.III. Formación del pigmento compuesto**

Para la obtención del pigmento compuesto se mezcló el extracto fenólico y la arcilla Sepiolita en una relación de 0.1 g de antocianinas totales / g de Sepiolita (Polette-Niewold et al., 2007). La mezcla se calentó a 100 °C durante 1h. Se separaron muestras de pigmento compuesto, filtrado líquido del compuesto y filtrado sólido del compuesto para realizar la caracterización del pigmento híbrido formado.

#### **VI.II.II.IV. Caracterización del compuesto híbrido formado**

##### **VI.II.II.IV.I. Microscopía de barrido electrónico**

Se tomó una muestra de pigmento compuesto y se dejó secar al sol durante 30 días aproximadamente. La microscopía de barrido electrónico se realizó a muestras de



polvo de Jamaica, Sepiolita y pigmento compuesto en estado sólido y con pequeño tamaño de partícula.

La microscopía de barrido electrónico es una técnica mediante la cual se utiliza un haz de electrones para formar una imagen ampliada del tamaño, forma, composición, cristalografía y otros elementos físicos y propiedades químicas de una muestra (Ural, 2021). Este instrumento permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos. Las aplicaciones del microscopio electrónico de barrido son muy variadas, y van desde la industria petroquímica o la metalurgia hasta la medicina forense.

#### **VI.II.IV.II. Mediciones espectrofotométricas**

Una muestra de filtrado líquido del compuesto se dejó a temperatura ambiente, en un frasco a la luz junto a otro frasco con extracto de Jamaica calentado por 1h (tiempo de formación del pigmento compuesto) para ser utilizado como control. Se realizaron barridos espectrales de 300 a 700 nm y mediciones de absorbancia, a una longitud de onda igual a 520 nm, semanalmente durante 2 meses para ver la estabilidad del pigmento formado.

Se obtuvieron las curvas de degradación a partir de la relación de la concentración de antocianos con respecto al tiempo siguiendo la siguiente expresión:

$$C = C_0 * e^{(-k*t)} \quad (9)$$

Donde

C: Concentración de antocianos en el tiempo

C<sub>0</sub>: Concentración inicial de antocianos

k: Constante de velocidad

t: tiempo

Luego se transformaron logarítmicamente las concentraciones de antocianos y se graficaron con respecto al tiempo, para por último determinar las constantes de velocidad a partir de la siguiente expresión:

$$\ln C = \ln C_0 - k * t \quad (10)$$



La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que posibilita determinar la concentración de un compuesto en solución. La técnica se fundamenta en que las moléculas absorben la radiación electromagnética y la cantidad de luz absorbida dependerá linealmente de la concentración de acuerdo a la ley de Lambert-Beer. Las mediciones se realizan en un espectrofotómetro, para esto se selecciona la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y se mide la cantidad de luz absorbida por la misma. Esta técnica tiene aplicaciones en diferentes campos como en el área de medio ambiente, farmacéutica y para el análisis de compuestos orgánicos o elementos individuales (Passos & Saraiva, 2019).

#### VI.II.IV.III. Mediciones colorimétricas

Muestras de pigmento compuesto, filtrado líquido del compuesto, filtrado sólido del compuesto y extracto de Jamaica calentado se dejaron a la luz y se le hicieron mediciones de color semanalmente durante 2 meses.

Las mediciones se realizaron por triplicado utilizando un colorímetro en escala CIEL\*a\*b\*. Se obtuvieron los valores L\* (luminosidad de color), a\* y b\* (coordenadas de cromaticidad). Los valores L corresponden a la luminosidad de las muestras, el valor +a\* significa que la muestra tiende al rojo; -a\* al verde; +b\* al amarillo y -b\* al azul. A partir de estos datos se calculó el ángulo de tono (Hue) y el índice de saturación de color (Croma) utilizando las siguientes ecuaciones:

$$Croma = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (11)$$

$$Hue = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (12)$$

La colorimetría es una técnica que se utiliza para describir y cuantificar la percepción que tienen los humanos del color, dependiendo de los aspectos físicos que estos tengan. El instrumento que se utiliza es el colorímetro el cual mide la cantidad de color de un medio dado (Milovanovic et al., 2021). Para ello existen varios tipos, que van desde los que se emplean en los laboratorios, hasta los que son usados en la industria



electrónica. El colorímetro tiene aplicaciones en la industria de la pintura, alimentaria y editorial, donde se utiliza este dispositivo para diferentes sustancias en los líquidos y soluciones.

#### **VI.II.II.IV.IV. Difracción de Rayos X**

Se tomaron muestras de pigmento compuesto, filtrado líquido del compuesto y filtrado sólido del compuesto y se dejaron secar al sol durante 30 días aproximadamente. El análisis de difracción de polvos se realizó a todas las muestras anteriores y además a muestras de polvo de flor de Jamaica y Sepiolita, en estado sólido y con pequeño tamaño de partícula.

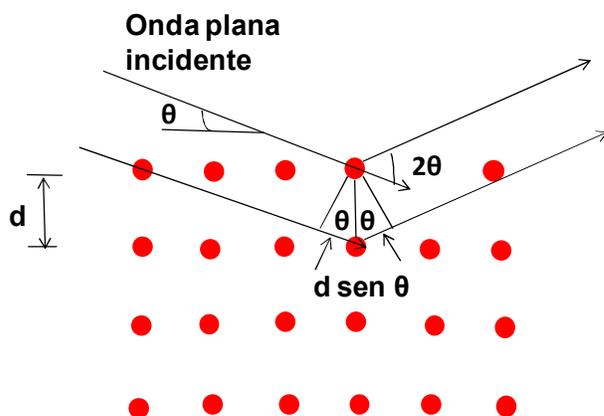
La técnica de difracción de rayos X se utiliza para la caracterización de materiales con una estructura cristalográfica definida. Los rayos X son irradiados a la muestra a analizar y se difractan con ángulos que dependen de las distancias interatómicas, para luego dar lugar a patrones de difracción que reflejan sus características estructurales (Khan et al., 2020).

El estudio de los difractogramas se realiza siguiendo la Ley de Bragg. Ver figura 7

$$n\lambda = 2d\sin\theta$$

Donde(13)

- $n$  es un número entero,
- $\lambda$  es la longitud de onda de los rayos X,
- $d$  es la distancia entre los planos de la red cristalina y,
- $\theta$  es el ángulo entre los rayos incidentes y los planos de dispersión.



**Figura 7. Difracción de Rayos X. Ley de Bragg**

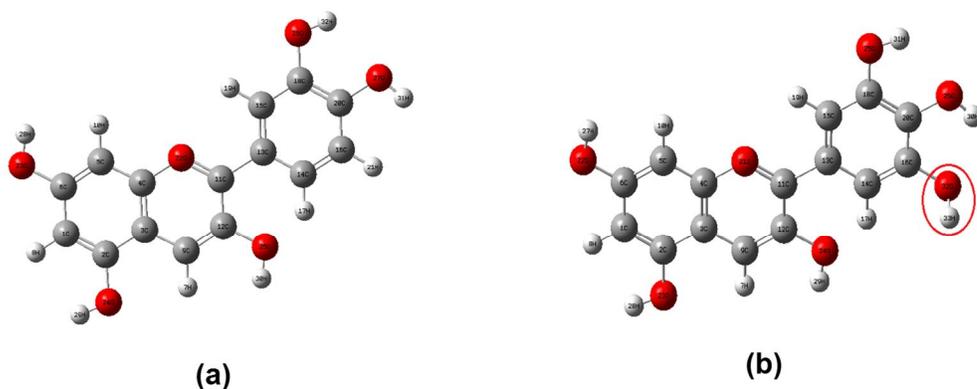
Esta ley nos muestra que el ángulo entre los rayos incidentes y los planos de dispersión ( $\theta$ ) es inversamente proporcional a la distancia entre planos de la red cristalina ( $d$ ), por lo tanto, si disminuyen los ángulos aumentan las distancias entre planos y viceversa.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### VII.I. Cálculos teóricos

#### VII.I.I. Optimización de la geometría de las moléculas

Las estructuras de las dos moléculas, Cianidina y Delfinidina, se dibujaron en el programa Gaussian para luego ser optimizadas. La figura 8 muestra las estructuras.



**Figura 8. Estructuras sin optimizar dibujadas en GaussView 09, Cianidina (a) y Delfinidina (b)**

Las moléculas de Cianidina y Delfinidina se optimizaron en fase gas utilizando los métodos de cálculo UFF, Dreiding, AM1, PM3, HF y DFT (B3LYP, B3PW91, M06-2X). De todos estos métodos la mejor optimización se obtuvo con el método DFT: B3LYP y por lo tanto se validaron 4 conjuntos de bases (STO-3G, 3-21G, 6-31G, 6-311G) siendo el 6-31G el que mejor resultados obtuvo para las dos moléculas una vez que fueron comparados con los datos de difracción de rayos X reportados (Ueno & Norio, 1977). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Márquez-Rodríguez y colaboradores en 2018 los cuales validaron diferentes métodos de DFT para optimizar la estructura de la molécula de Delfinidina-3-O-sambubiósido proveniente de la flor de Jamaica. A continuación, se muestran los resultados de la validación para la molécula de Cianidina y Delfinidina.

**Tabla 1. Validación de los métodos de cálculo para la molécula de Cianidina y Delfinidina utilizando las distancias y ángulos de enlace.**

Método		R <sup>2</sup>	
		Cianidina	Delfinidina
Mecánica Molecular	UFF	0.361	0.115
	Dreiding	0.452	0.433



Método		R <sup>2</sup>	
		Cianidina	Delfinidina
Semi-empíricos	AM1	0.836	0.837
	PM3	0.849	0.826
<i>Ab-initio</i>	HF	0.888	0.887
DFT (6-31G)	B3LYP	0.917	0.916
	B3PW91	0.914	0.886
	M06-2X	0.869	0.834

La tabla anterior muestra que para las dos moléculas Cianidina y Delfinidina el método con mejores resultados fue el DFT: B3LYP/6-31G con un valor de R<sup>2</sup> de 0.917 y 0.916 respectivamente. Este método fue el que mejor correlación mostró de todos los utilizados anteriormente. Las diferencias entre los valores experimentales y teóricos se deben a que las condiciones en las que se determinaron las distancias y ángulos de enlace experimentalmente fueron en estado sólido, mientras que los cálculos se llevaron a cabo con la molécula aislada en estado gaseoso. En las condiciones experimentales se cristaliza la molécula, por lo tanto, los átomos se unen y se acomodan de forma diferente, lo cual explica la diferencia entre los valores de distancia y ángulos de enlace obtenidos de forma experimental y teórica.

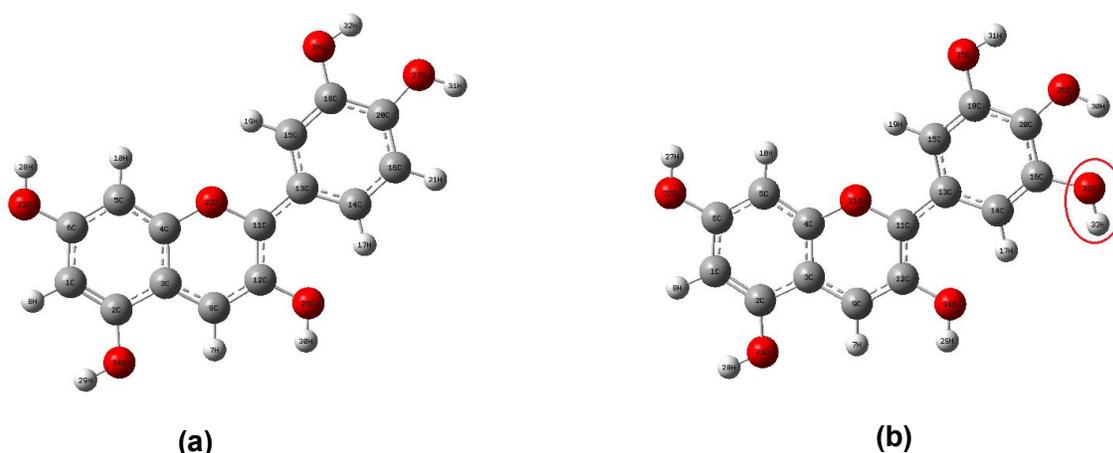
Además de estos métodos se validaron diferentes conjuntos de base con el funcional DFT: B3LYP que fue el que mejores resultados reportó (tabla 2).

**Tabla 2. Validación de diferentes conjuntos bases para el método DFT: B3LYP para la Cianidina y Delfinidina**

Conjunto base	R <sup>2</sup>	
	Cianidina	Delfinidina
STO-3G	0.830	0.790
3-21G	0.848	0.847
6-31G	0.917	0.917

Conjunto base	R <sup>2</sup>	
	Cianidina	Delfinidina
6-311G	0.901	0.909

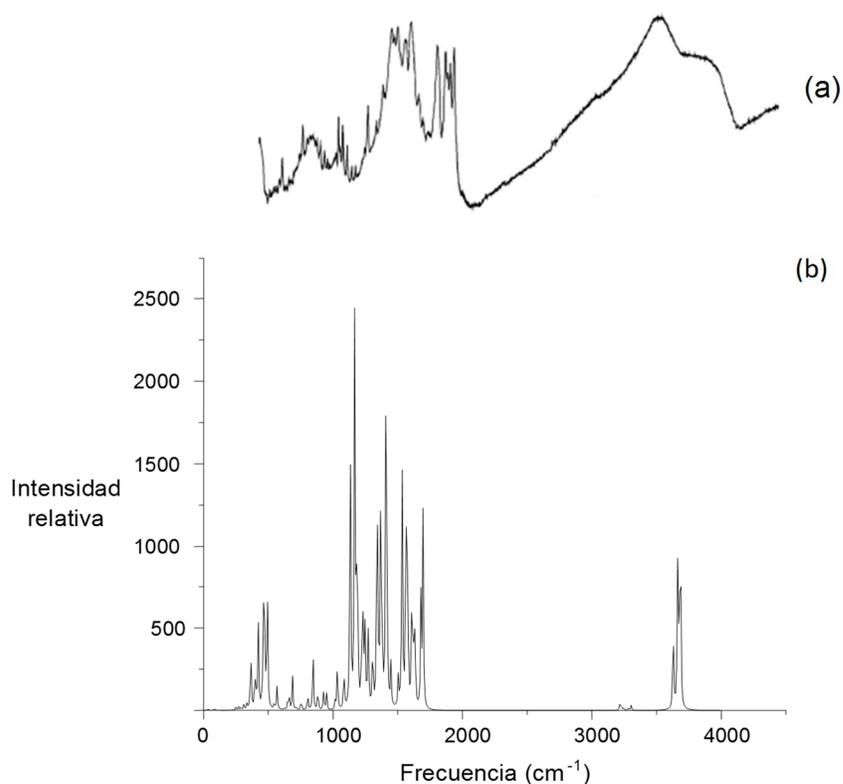
En la tabla anterior se observa que al validar con diferentes conjuntos bases se mantiene que el mejor método es el DFT:B3LYP/6-31G por lo tanto variar el conjunto base no reportó mejores valores de correlación entre datos experimentales y teóricos. En la figura 9 se observan las estructuras optimizadas de las dos moléculas:



**Figura 9. Estructuras optimizadas para la molécula de Cianidina (a) y Delfinidina (b) con DFT: B3LYP/6-31G.**

### VII.I.II. Cálculo de espectro infrarrojo (IR)

Los cálculos de frecuencia para las dos moléculas fueron realizados con el método DFT:B3LYP/6-31G. El cálculo de frecuencias comprobó que las geometrías optimizadas correspondían a mínimos globales en la superficie de energía potencial. El espectro teórico obtenido para la Cianidina fue comparado con el espectro experimental (Dimitri et al., 2005). Ver figura 10.



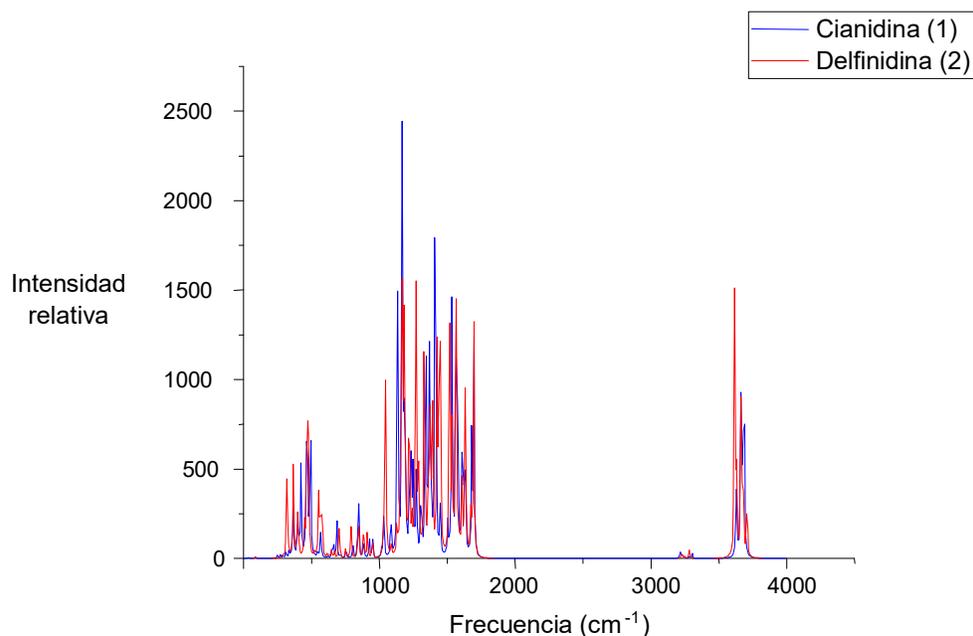
**Figura 10. Espectros IR (a) experimental (Dimitri et al., 2005) y (b) teórico (DFT:B3LYP/6-31G) para la molécula de Cianidina.**

Las bandas que aparecen entre los 200 y los 1800 $\text{cm}^{-1}$  en el espectro teórico guardan buena similitud con el espectro experimental. Las diferencias que puedan existir entre las frecuencias de los dos espectros son atribuidas a que en el estudio teórico las moléculas fueron analizadas como moléculas aisladas y en estado gaseoso, mientras que en el experimental se encuentran en fase sólida. En la tabla 3 se muestran las frecuencias teóricas y experimentales más intensas para la molécula de Cianidina.

**Tabla 3. Frecuencias teóricas y experimentales más intensas para la molécula de Cianidina**

Frecuencias Teóricas	Frecuencias Experimentales	Tipo de vibración a la que corresponde
3685	3565	Estiramiento O <sub>4</sub> '-H <sub>4</sub> '
1410	1418	Estiramiento de los enlaces C=C de los anillos aromáticos
1169	1161	Tensión C sp <sup>2</sup> del anillo aromático -O
467	489	Vibraciones de flexión (aleteo) fuera del plano C-C

Al comparar las frecuencias experimentales y las teóricas se observó que estas presentaron buena correlación, lo cual indicó que el método seleccionado para modelar el sistema fue el adecuado.



**Figura 11. Espectros infrarrojo moléculas de Cianidina y Delfinidina**



En la figura 11 se muestran los espectros para la molécula de Cianidina y Delfinidina en la cual se observó que los dos son muy similares debido a que las dos moléculas solo se diferencian en la posición del grupo -OH en el C5'. Estos resultados demuestran que el método DFT:B3LYP/6-31G es bueno para describir las propiedades vibracionales de la Cianidina y la Delfinidina.

### VII.I.III. Cálculo de espectro de absorción (UV-Vis)

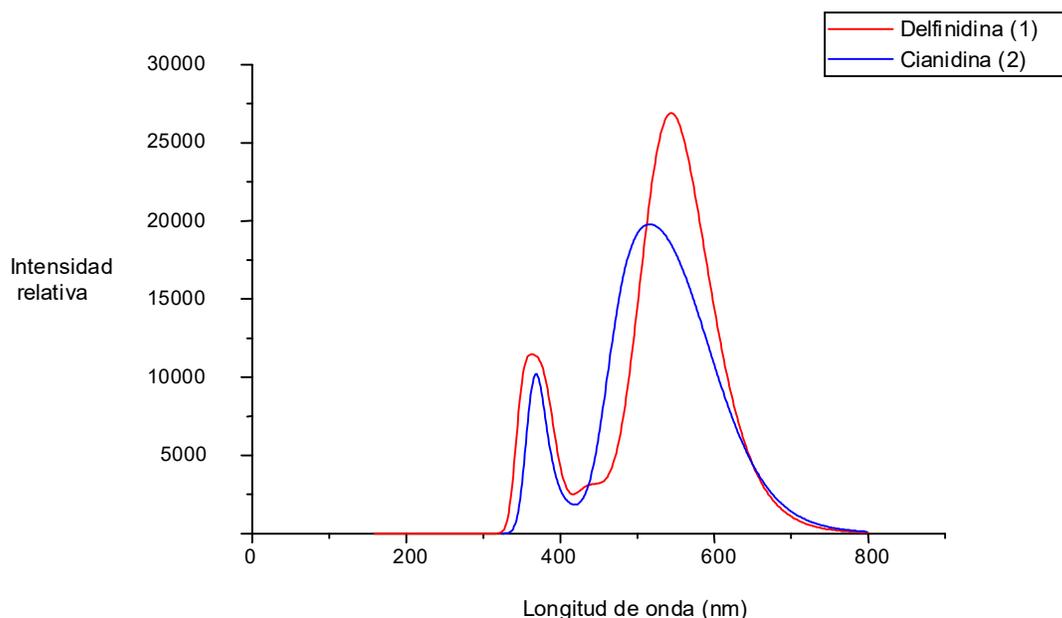
Los cálculos de espectro de absorción fueron realizados utilizando el método TD-DFT:B3LYP/6-31G para las dos moléculas. Se obtuvieron las energías electrónicas de transición vertical, la fuerza del oscilador y las contribuciones de los orbitales moleculares participantes en las transiciones electrónicas. Los cálculos fueron realizados en fase gas (tabla 4).

**Tabla 4. Principales contribuciones de las transiciones electrónicas y fuerzas del oscilador en la obtención de los valores de  $\lambda$  (nm) para las antocianinas.**

Molécula	Estados excitados	Energía (eV)	$\lambda$ (nm)	Fuerza del oscilador	Transiciones
Cianidina	1	2.3840	520.08	0.2068	H-2 $\blacktriangleright$ L0 (0.16776) H0 $\blacktriangleright$ L0 (0.63019)
	2	2.7214	455.59	0.2667	H-2 $\blacktriangleright$ L0 (0.19108) H-1 $\blacktriangleright$ L0 (0.63390) H0 $\blacktriangleright$ L0 (0.23285)
	3	3.1146	398.07	0.2999	H-2 $\blacktriangleright$ L0 (0.65121)
Delfinidina	1	2.3324	531.57	0.0272	H-1 $\blacktriangleright$ L0 (0.64934) H0 $\blacktriangleright$ L0 (0.27298)
	2	2.5738	481.12	0.6196	H-2 $\blacktriangleright$ L0 (0.18839) H0 $\blacktriangleright$ L0 (0.62329)
	3	2.8980	427.82	0.0493	H-2 $\blacktriangleright$ L0 (0.65551)

Como se puede observar en la tabla 4 los valores de  $\lambda_{\max}$  están aproximadamente cerca del valor experimental de  $\lambda_{\max}$  obtenidos para la Cianidina y Delfinidina de 515 nm y 522 nm respectivamente (Borkowski et al., 2005).

En la figura 12 se pueden observar los espectros UV-Vis para las dos moléculas, los cuales son muy similares debido a que las moléculas tienen estructuras parecidas.



**Figura 12. Espectros UV-Vis para la molécula de Cianidina y Delfinidina**

#### VII.I.IV. Cálculo de reactividad química global

Se calcularon las propiedades químicas de las moléculas para conocer aspectos sobre la reactividad química global. En las tablas 5 y 6 se pueden observar los valores de potencial iónico, afinidad electrónica, potencial químico, electronegatividad, dureza y blandura.

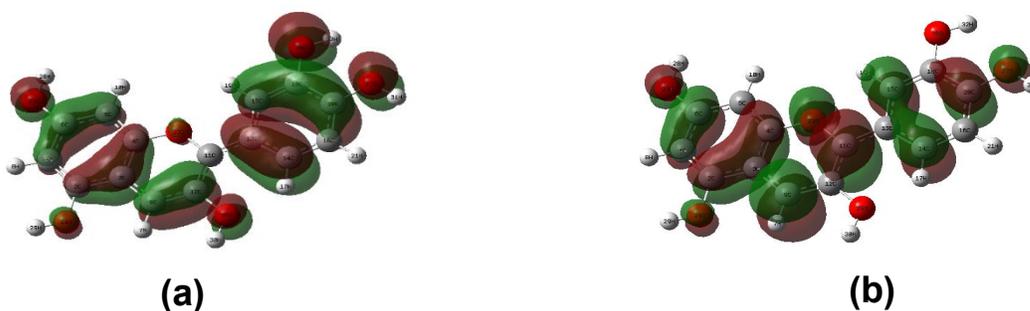
**Tabla 5. Propiedades químicas de las moléculas de Cianidina y Delfinidina utilizando aproximación por orbitales.**

Molécula	E(H)	E(L)	I	A	$\mu$	$\chi$	$\eta$	S
Cianidina	-11.42	-3.59	11.42	3.59	-7.51	7.51	3.91	0.12
Delfinidina	-11.43	-3.70	11.43	3.70	-7.56	7.56	3.86	0.12

**Tabla 6. Propiedades químicas de las moléculas de Cianidina y Delfinidina utilizando aproximación por energía.**

Molécula	$E_0$	$E_c$	$E_a$	$I$	$A$	$\mu$	$\chi$	$\eta$	$S$
Cianidina	-28000.98	-27990.39	-28006.01	10.59	5.02	-7.80	7.80	2.78	0.17
Delfinidina	-30047.05	-30036.52	-30052.10	10.52	5.05	-7.78	7.78	2.73	0.18

Las propiedades calculadas por los dos métodos son muy similares, demostrándose que los dos métodos pueden utilizarse para las dos moléculas. Los valores de dureza para las dos moléculas analizadas evidencian que la Cianidina es más estable que la Delfinidina, debido a que presenta una mayor dureza y menor blandura.



**Figura 13. Orbitales Moleculares HOMO (a) y LUMO (b) para la Cianidina**



**Figura 14. Orbitales Moleculares HOMO (a) y LUMO (b) para la Delfinidina**

En la figura 13 y 14 se muestran los orbitales HOMO y LUMO en las moléculas de Cianidina y Delfinidina respectivamente obtenidas a un nivel de cálculo DFT: B3LYP/6-

31G. Los orbitales LUMO de las dos moléculas son iguales, las diferencias solo radican en los orbitales HOMO específicamente en el área del anillo B debido a que en la molécula de Delfinidina existe un grupo -OH de más en la posición C5'.

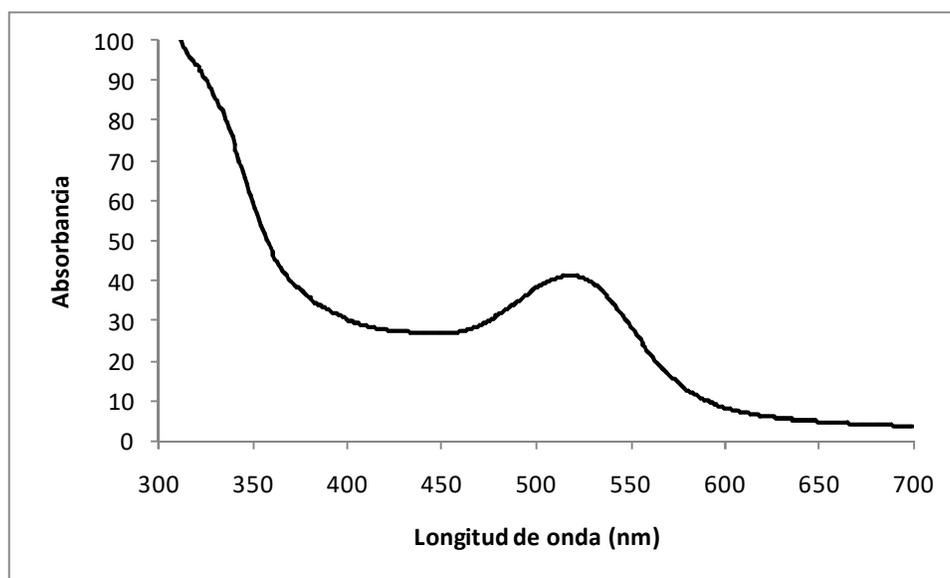
Los cálculos no se realizaron con las estructuras de Cianidina 3-O-sambubiósido y Delfinidina 3-O-sambubiósido debido a la imposibilidad de trabajar con el clúster de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Por esta misma razón los cálculos se postergaron hasta que dicho equipo esté disponible.

## VII.II. Resultados experimentales

### VII.II.I. Obtención del extracto con antocianinas

Como resultado de la extracción se obtuvo un líquido concentrado con un color rojo intenso. Se realizaron mediciones de absorbancia a 520 nm y barridos espectrales de 300 nm a 700 nm para observar los compuestos fenólicos presentes en el extracto.

Ver figura 15



**Figura 15. Barrido espectral UV-Vis de los antocianos presentes en el *Hibiscus sabdariffa L***

Los valores de absorbancia presentes en el espectro fueron ajustados al factor de dilución utilizado.



En el gráfico se puede observar la presencia de los dos principales antocianos presentes en la flor de Jamaica, la Delfinidina 3-O-sambubiósido y la Cianidina 3-O-sambubiósido, los cuales absorben a una longitud de onda de 520 nm aproximadamente.

#### **VII.II.II. Contenido de antocianinas**

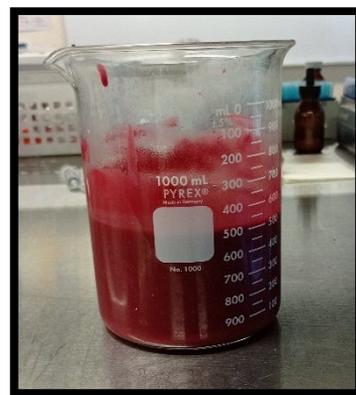
El contenido de antocianinas se determinó mediante el método diferencial de pH. La concentración de antocianinas totales es de 0.70 mg/mL (equivalentes de Cianidina 3-glucósido) de extracto fenólico. La concentración de antocianinas obtenida se aproxima a los valores reportados por Sinela et al. 2017 de 0.78-0.46 mg/mL en cálices de *Hibiscus sabdariffa* pertenecientes a la variedad Vimto, cultivada en el pueblo de Thiaré, Senegal.

#### **VII.II.III. Formación del pigmento compuesto**

Aplicando la metodología descrita en el epígrafe VI.II.II para la formación del pigmento compuesto se obtuvo un compuesto híbrido formado por la arcilla Sepiolita y los compuestos presentes en la flor de Jamaica. El nuevo compuesto híbrido presentó un color más claro que el extracto fenólico previamente obtenido (figura 16).



Extracto fenólico

Pigmento  
compuesto

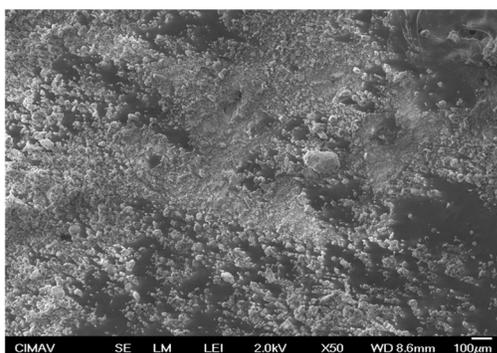
**Figura 16. Comparación entre el color de extracto fenólico y el pigmento compuesto formado**

Este cambio de color se debe a la presencia de la arcilla Sepiolita en el pigmento compuesto y no siendo así en el extracto fenólico, por lo que se observa en la muestra de pigmento compuesto un rojo menos intenso que en la muestra de extracto fenólico.

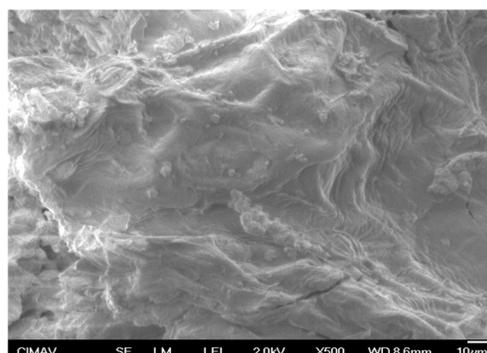
#### **VII.II.IV. Caracterización del compuesto híbrido formado**

##### **VII.II.IV.I. Microscopía de barrido electrónico**

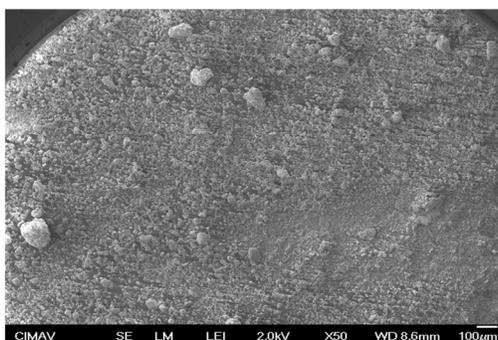
Para conocer el tamaño de partícula de las muestras de Sepiolita, Flor de Jamaica y pigmento compuesto se realizó la microscopía de barrido electrónico. Las muestras fueron analizadas en estado sólido y las imágenes obtenidas se muestran en la figura 17.



(a)



(b)

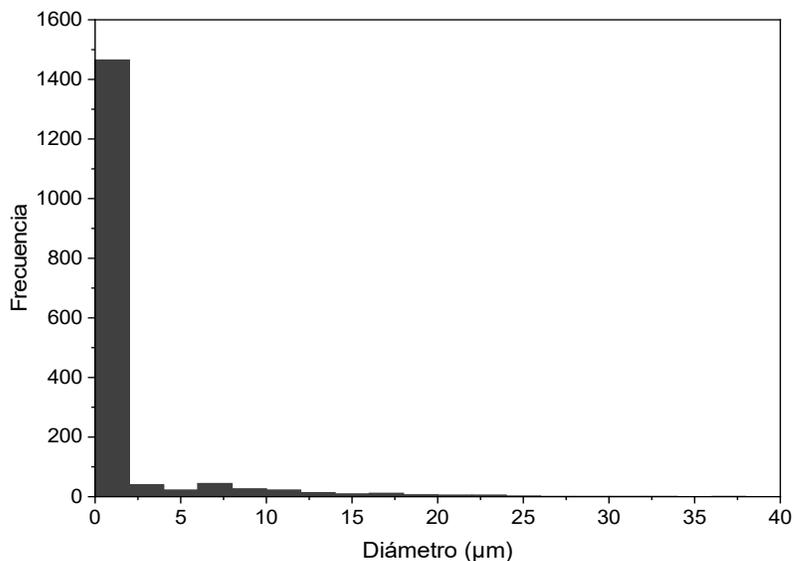


(c)

**Figura 17. Microscopía de barrido electrónico de las muestras de Sepiolita (a), Flor de Jamaica (b) y Pigmento compuesto (c).**

Para el procesamiento de las imágenes se utilizó el programa ImageJ a partir del cual se realizó el conteo de partículas para todas las muestras. Los datos de diámetro de partícula fueron procesados estadísticamente en OriginPro para luego obtener el tamaño de partícula promedio de cada muestra analizada.

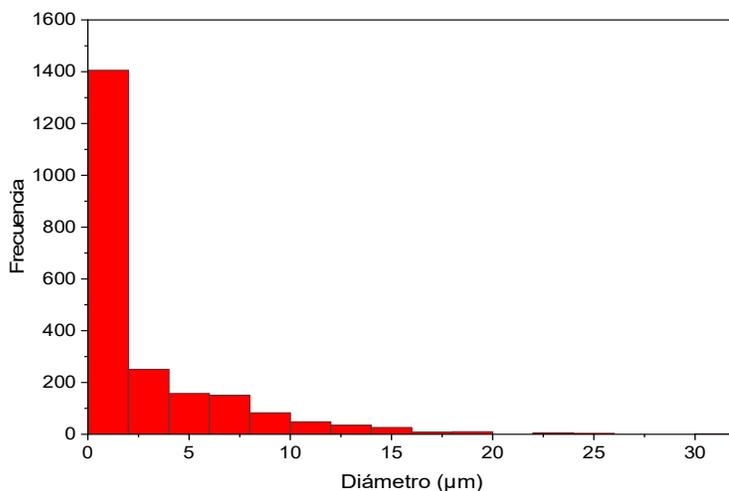
En la figura 18 se muestra la distribución de tamaños de partículas para la Sepiolita, muestra analizada.



**Figura 18. Distribución de los diferentes tamaños de partícula para la muestra de Sepiolita.**

Al analizar la figura se observa que la mayoría de las partículas de la muestra presentan un tamaño inferior a 2  $\mu\text{m}$ , valor que corresponde al tamaño de partículas de las arcillas en general. La muestra de Sepiolita tiene un tamaño de partícula promedio de 0.18  $\mu\text{m}$ .

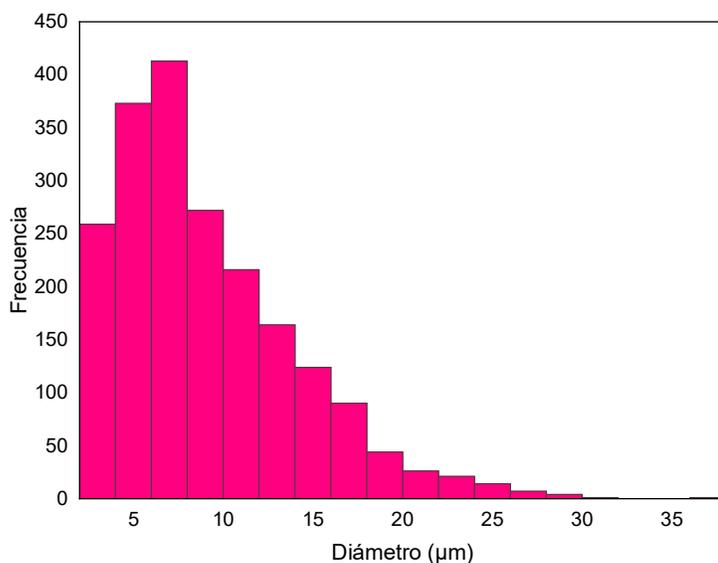
En la figura 19 se muestra la distribución de tamaños de partículas para la muestra de Flor de Jamaica.



**Figura 19. Distribución de los diferentes tamaños de partícula para la muestra de Flor de Jamaica.**

Al analizar la figura se observa que la mayoría de las partículas de la muestra presentan un tamaño inferior a  $2.5 \mu\text{m}$ . La muestra de Flor de Jamaica tiene un tamaño de partícula promedio de  $0.01 \mu\text{m}$ .

En la figura 20 se muestra la distribución de tamaños de partículas para la muestra de pigmento compuesto.



**Figura 20. Distribución de los diferentes tamaños de partícula para la muestra de pigmento compuesto.**

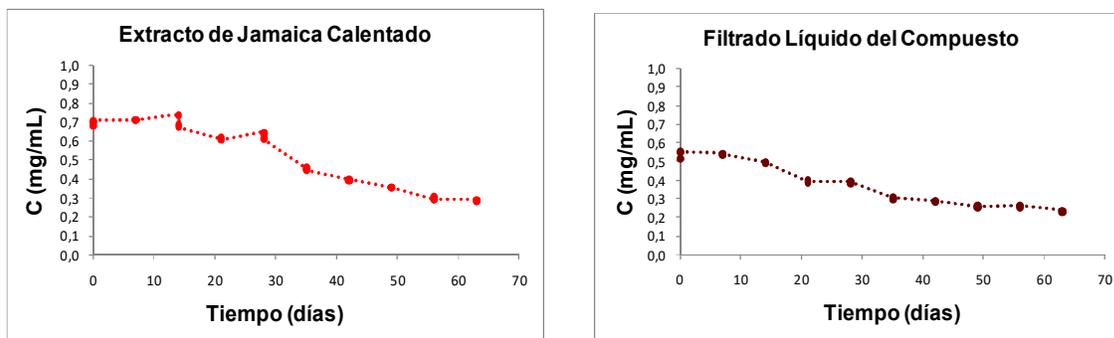
Al analizar la figura se observa que la mayoría de las partículas de la muestra presentan un tamaño entre 6-9  $\mu\text{m}$ . La muestra de pigmento compuesto tiene un tamaño de partícula promedio de 8.34 $\mu\text{m}$ .

Comparando las tres muestras de Sepiolita, Flor de Jamaica y pigmento compuesto vemos que la muestra de Flor de Jamaica tiene un tamaño de partícula inferior a la muestra de Sepiolita. La muestra de pigmento compuesto tiene un tamaño de partícula mayor al de la Sepiolita y la Flor de Jamaica, esto puede explicarse debido a que durante la formación del pigmento compuesto las partículas de Flor de Jamaica se unen a las partículas de Sepiolita y entonces se obtiene una partícula con un tamaño mayor.

#### **VII.II.IV.II. Mediciones espectrofotométricas**

Se realizaron mediciones de absorbancia a la muestra de Filtrado líquido del compuesto y a una muestra de Extracto de Jamaica calentado, con el objetivo de evaluar la estabilidad del pigmento compuesto elaborado, teniendo en cuenta las

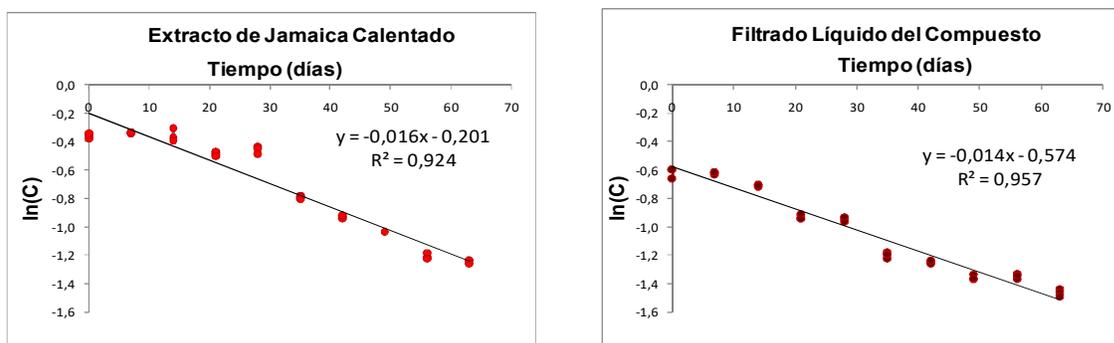
velocidades de degradación de los antocianos en las muestras. Las mediciones fueron realizadas semanalmente, durante dos meses. En la figura 21 se muestra el comportamiento de la concentración de antocianos con respecto al tiempo.



**Figura 21. Cinéticas de degradación de los antocianos presentes en el Extracto de Jamaica calentado y en el Filtrado líquido del compuesto.**

Al analizar los gráficos se puede observar que la concentración de antocianos para las dos muestras decrece al transcurrir el tiempo, indicando la degradación de los pigmentos. A los 63 días se había perdido el 72 % de los antocianos presentes en el Extracto de Jamaica calentado, mientras que para el Filtrado Líquido del compuesto se perdió el 60 %.

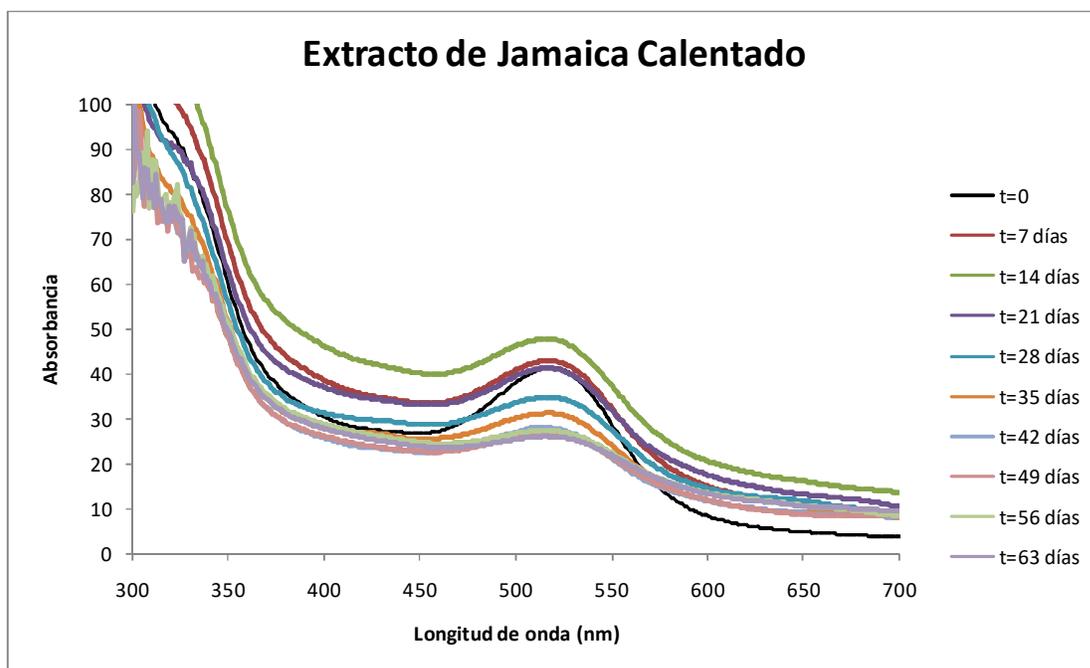
La determinación de las constantes de velocidad de los antocianos presentes en las muestras se realizó a partir de los siguientes gráficos.



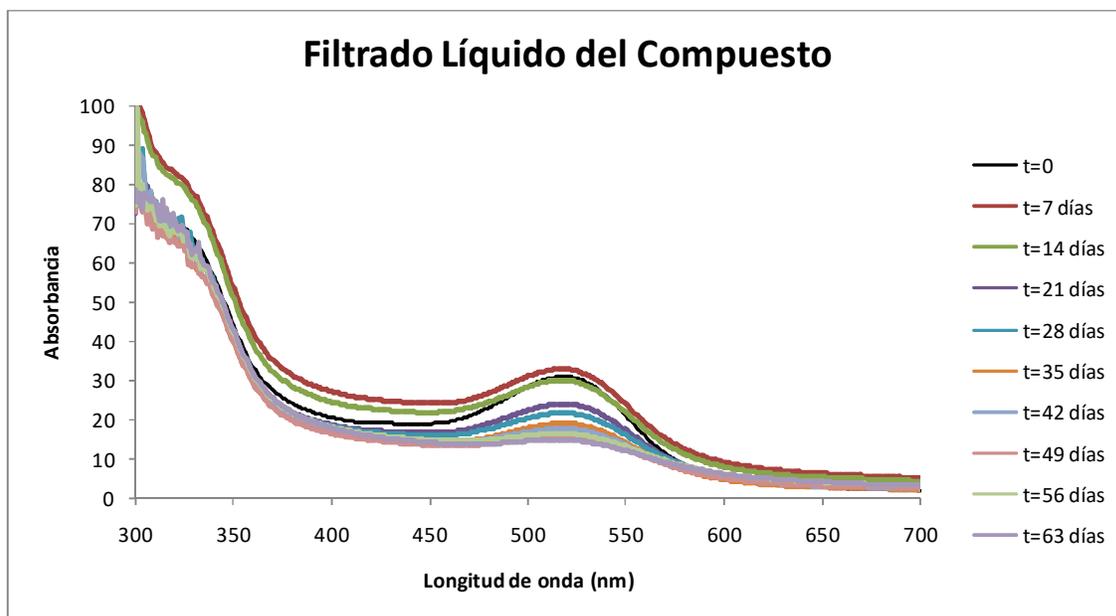
**Figura 22. Transformación logarítmica de las concentración de los antocianos para las muestras de Extracto de Jamaica calentado y Filtrado Líquido del compuesto.**

Las gráficas muestran un comportamiento lineal entre el logaritmo de la concentración y el tiempo. Se calculó la constante de velocidad a partir de la pendiente de la recta obtenida, siendo de  $1.85 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  y  $1.62 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  para el Extracto de Jamaica calentado y el Filtrado Líquido del compuesto respectivamente. Por lo tanto, la degradación de los antocianos presentes en el Extracto de Jamaica calentado es más rápida que la degradación de los antocianos presentes en el Filtrado líquido del compuesto, debido a que la constante de velocidad en el Extracto de Jamaica calentado es mayor que la constante de velocidad en el Filtrado líquido del compuesto. Esto se explica debido a que la Sepiolita presente en el Filtrado líquido del compuesto estabiliza los antocianos y retrasa su degradación con respecto al Extracto de Jamaica calentado.

Adicionalmente se realizaron barridos espectrales de 300 a 700 nm para observar la formación de nuevos compuestos debido a la degradación de los antocianos presentes en las muestras, los resultados se pueden observar en las figuras 23 y 24.



**Figura 23. Barridos espectrales para el Extracto de Jamaica calentado.**



**Figura 24. Barridos espectrales para el Filtrado líquido del compuesto.**

Los valores de absorbancia presentes en el espectro fueron ajustados al factor de dilución utilizado.



En el barrido espectral se tiene la presencia de diferentes compuestos en el Extracto de Jamaica calentado y en el Filtrado líquido del compuesto, los cuales absorben a distintas longitudes de onda. Al analizar los barridos se observa que en las dos muestras están presentes los antocianos de la flor de Jamaica los cuales absorben a 520 nm aproximadamente, estos se van degradando al pasar el tiempo y se observa que la absorbancia va disminuyendo. También aparecen ácidos fenólicos en las dos muestras, estos absorben entre longitudes de onda de 280 a 320 nm.

En la tabla 7 se observa el comportamiento de la longitud de onda del máximo de absorción para las muestras de Extracto de Jamaica calentado y el Filtrado líquido del compuesto durante el paso de los días.

**Tabla 7. Comportamiento de la longitud de onda del máximo de absorción para las muestras de Extracto de Jamaica calentado y el Filtrado líquido del compuesto.**

Extracto de Jamaica Calentado			Filtrado Líquido del Compuesto		
Tiempo(días)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Absorbancia	Tiempo (días)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Absorbancia
0	519	41.34	0	518	30.98
7	517	47.90	7	518	32.88
14	515	42.81	14	518	30.03
21	516	41.31	21	518	24.02
28	515	34.79	28	518	21.68
35	515	31.21	35	518	19.03
42	513	28.10	42	518	17.78
49	513	27.71	49	518	16.74
56	513	27.39	56	517	16.45
63	513	26.02	63	517	14.84

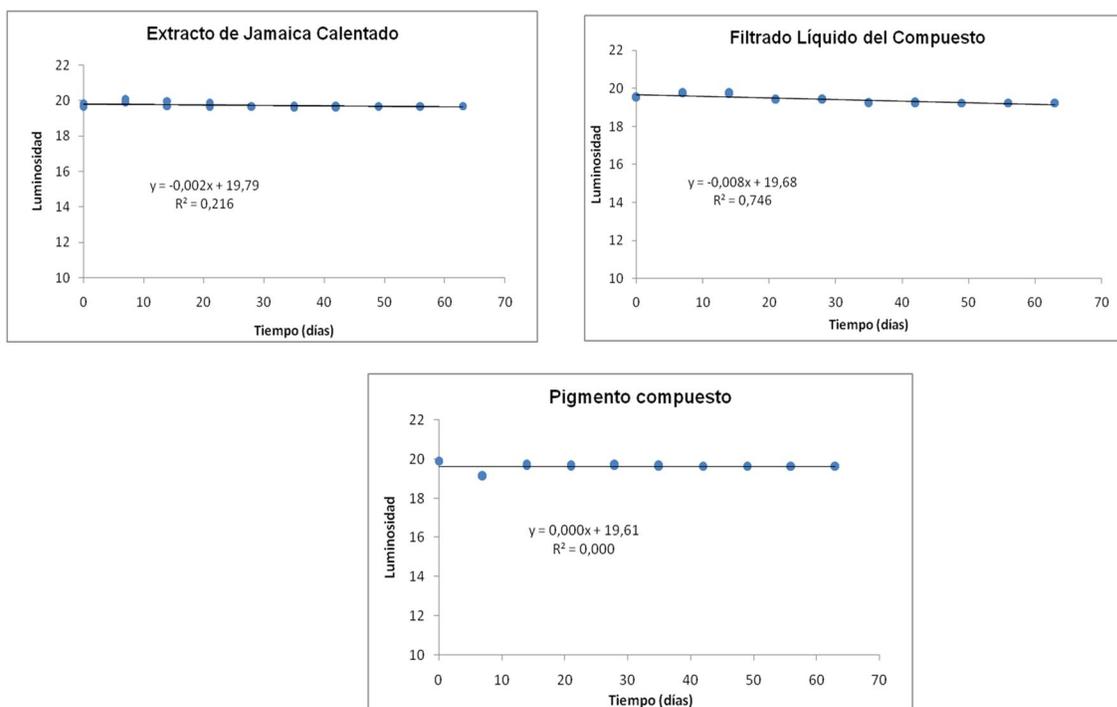
Los valores de absorbancia presentes en las tablas fueron ajustados al factor de dilución utilizado.

Al analizar los valores anteriores podemos ver como para el Extracto de Jamaica calentado existe un desplazamiento de la longitud de onda del máximo de absorción hacia longitudes de onda más cortas, al degradarse el extracto con el paso de los días, esto se conoce como efecto hipsocrómico. A diferencia del Extracto de Jamaica calentado, en el Filtrado líquido del compuesto no se observan efectos de desplazamiento de longitud de onda del máximo de absorción, lo cual es un indicio de

que el color de la muestra se mantiene estable debido a que los antocianos presentes en la muestra no se están degradando.

### VII.II.IV.III. Mediciones colorimétricas

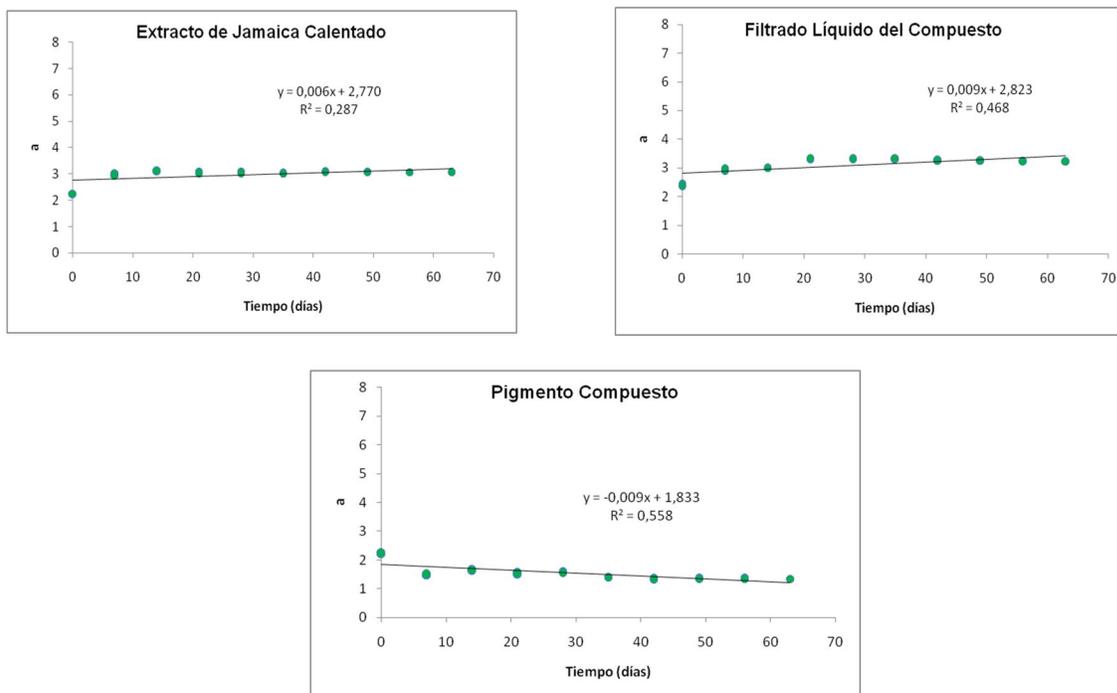
Las mediciones de color se les realizaron a muestras de Pigmento compuesto, Filtrado líquido del compuesto, Filtrado sólido del compuesto y Extracto de Jamaica calentado. Los resultados para los parámetros de Luminosidad, a, b, Cromaticidad y Ángulo de tono se muestran en las figuras 25, 26, 27, 28 y 29:



**Figura 25. Variación de la luminosidad con el tiempo para el Extracto de Jamaica calentado, Filtrado líquido del compuesto y Pigmento compuesto.**

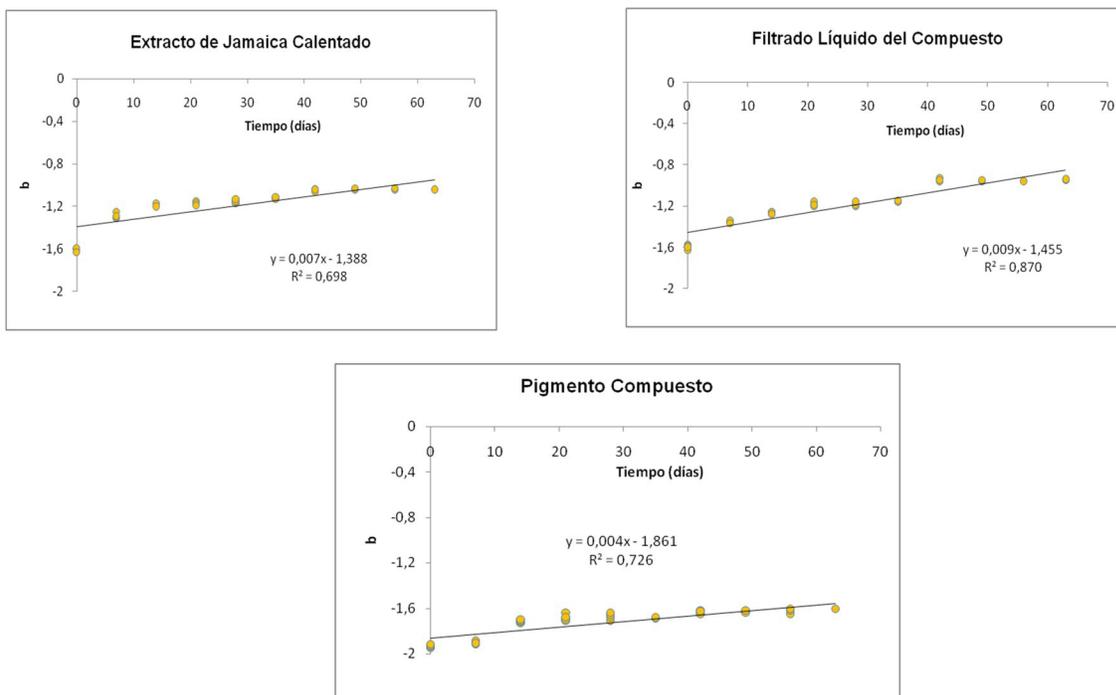
Para el parámetro de Luminosidad, se observó un ligero aumento en los primeros 10 días para las muestras de Extracto de Jamaica calentado y Filtrado líquido del compuesto, no siendo así para la muestra de Pigmento compuesto, la cual disminuyó (figura 25). Con el paso de los días las muestras no tuvieron una variación apreciable

y se mantuvo prácticamente constante el parámetro de Luminosidad. Un aumento en el valor de este parámetro indicaría que las muestras se hacen más claras, lo que es una indicación de degradación de los antocianos. Sin embargo, una disminución en el valor de este parámetro indicaría que las muestras se hacen más oscuras.



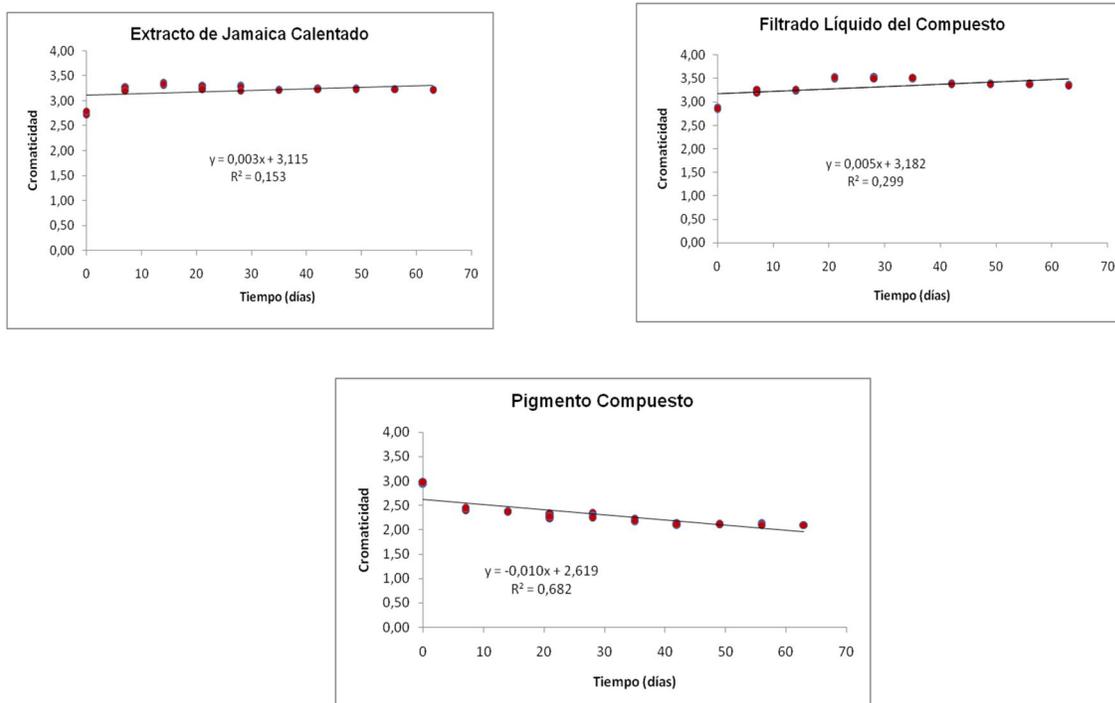
**Figura 26. Variación del parámetro a con el tiempo para el Extracto de Jamaica calentado, Filtrado líquido del compuesto y Pigmento compuesto.**

Los valores del parámetro “a” aumentaron para las muestras de Extracto de Jamaica calentado y Filtrado líquido del compuesto (figura 26). El mayor aumento se observó para la muestra de Filtrado líquido del compuesto, indicando un desplazamiento del color hacia rojos más intensos. Sin embargo, los valores de “a” disminuyeron para la muestra de Pigmento compuesto; por lo tanto, hubo una pérdida de la intensidad del color rojo en este último. Esto implica un desplazamiento hacia el color verde en el pigmento compuesto, indicando procesos de degradación de los antocianos.



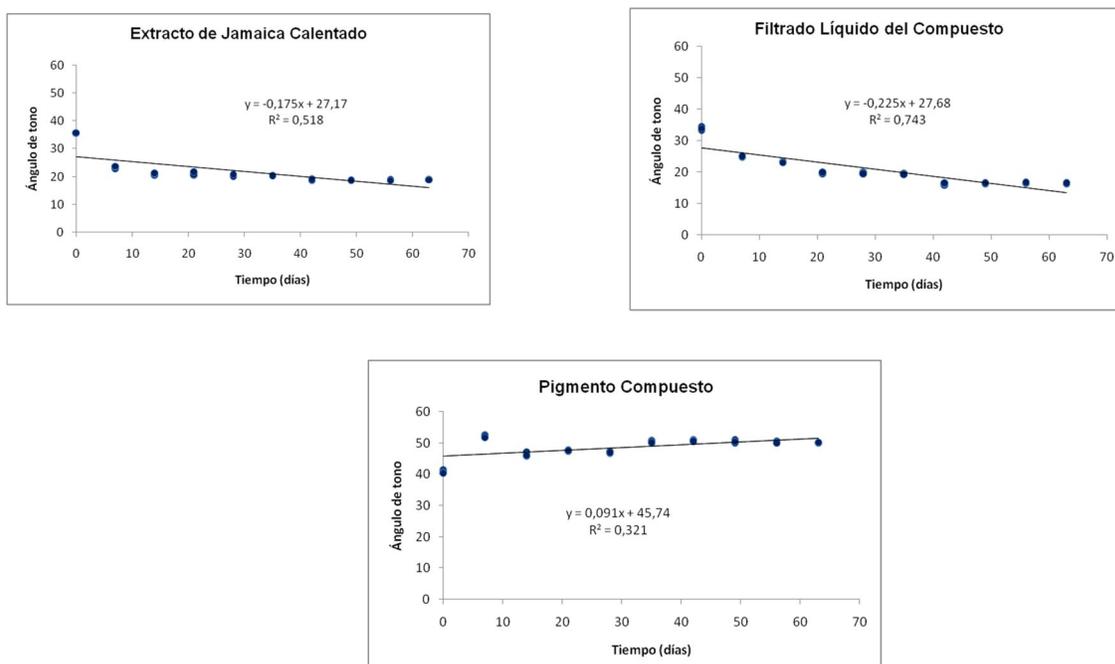
**Figura 27. Variación del parámetro b con el tiempo para el Extracto de Jamaica calentado, Filtrado líquido del compuesto y Pigmento compuesto.**

El parámetro “b” tuvo un aumento para las tres muestras analizadas (figura 27). La muestra de Filtrado líquido del compuesto experimentó un mayor aumento con respecto a las otras muestras. Esto significa que hubo una pérdida de intensidad del color rojo, es decir un desplazamiento hacia el color amarillo.



**Figura 28. Variación de la Cromaticidad con el tiempo para el Extracto de Jamaica calentado, Filtrado líquido del compuesto y Pigmento compuesto.**

Los valores de cromaticidad aumentaron para las muestras de Extracto de Jamaica calentado y Filtrado líquido del compuesto, siendo esta última la que mayores valores de cromaticidad reportó. Para la muestra de Pigmento compuesto los valores de cromaticidad disminuyeron, significando esto una pérdida del color por la degradación de los pigmentos (figura 28).



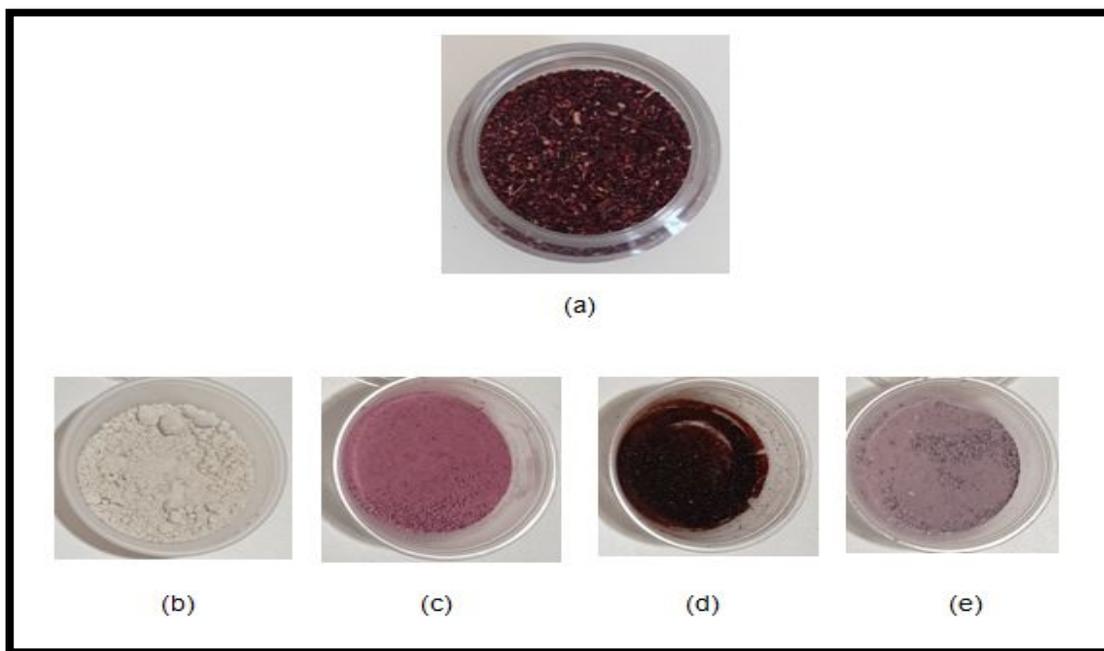
**Figura 29. Variación del Ángulo de tono con el tiempo para el Extracto de Jamaica calentado, Filtrado líquido del compuesto y Pigmento compuesto.**

Los valores de ángulo de tono disminuyeron para las muestras de Extracto de Jamaica calentado y Filtrado líquido del compuesto, siendo esta última la que menores valores de ángulo de tono reportó, lo cual indica que la muestra tiende a rojos menos intensos (figura 29). Para la muestra de Pigmento compuesto los valores de ángulo de tono aumentaron, significando esto una desviación hacia rojos más intensos.

#### VII.II.IV.IV. Difracción de Rayos X

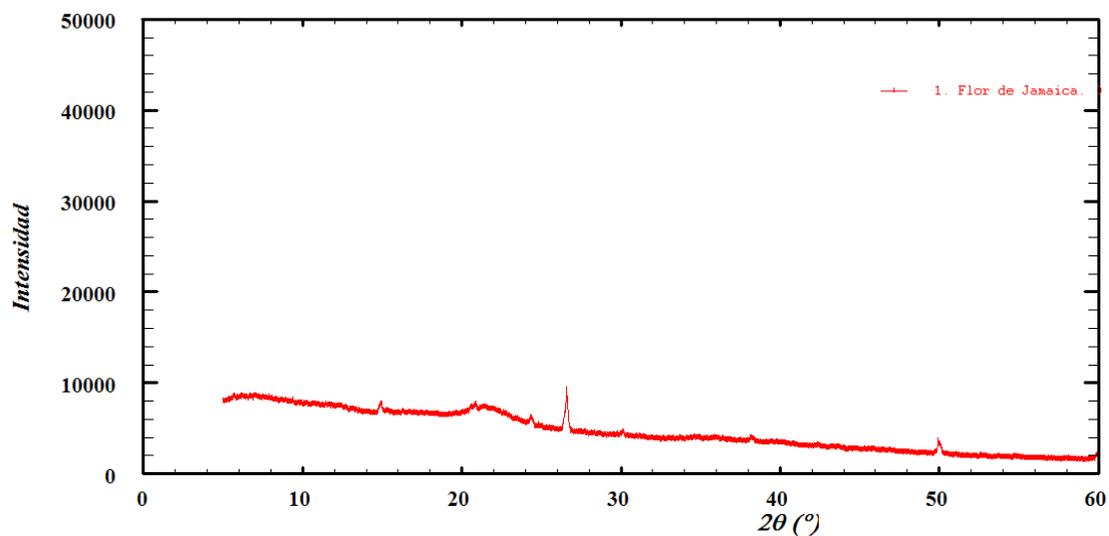
El pigmento compuesto obtenido anteriormente se filtró y se separaron muestras de filtrado líquido del compuesto y filtrado sólido del compuesto, las cuales se dejaron secando al sol y luego se molieron para obtener un polvo fino.

La Difracción por Rayos X se le realizó a muestras de pigmento compuesto, filtrado líquido del compuesto, filtrado sólido del compuesto, Sepiolita y Flor de Jamaica (figura 30). Todas estas en forma de polvo fino.

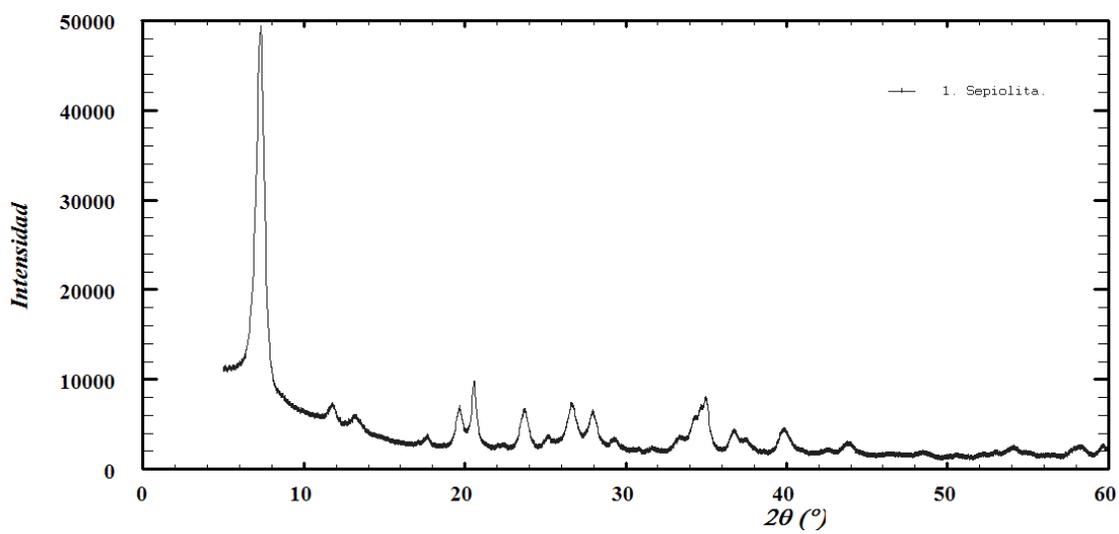


**Figura 30. Muestras para Difracción de Rayos X. (a) Flor de Jamaica, (b) Sepiolita, (c) Pigmento Compuesto, (d) Filtrado líquido del compuesto, (e) Filtrado sólido del compuesto.**

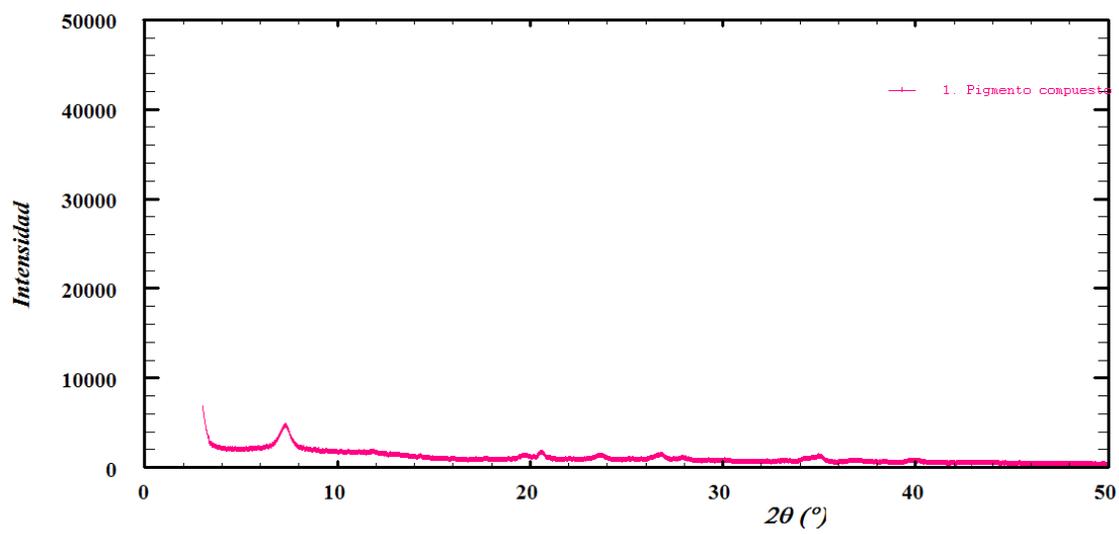
Los resultados de la Difracción por Rayos X se muestran en la figura 31



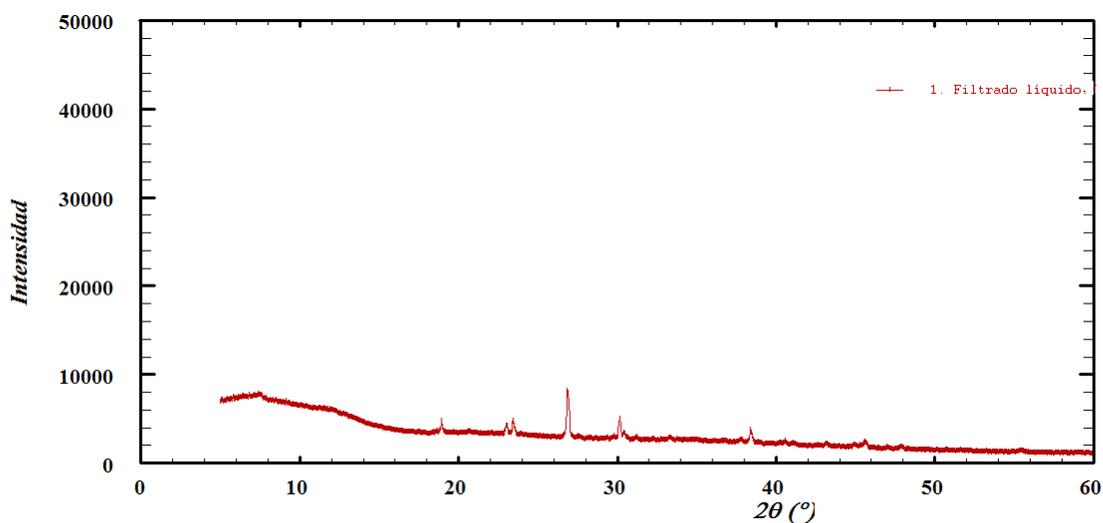
(a)



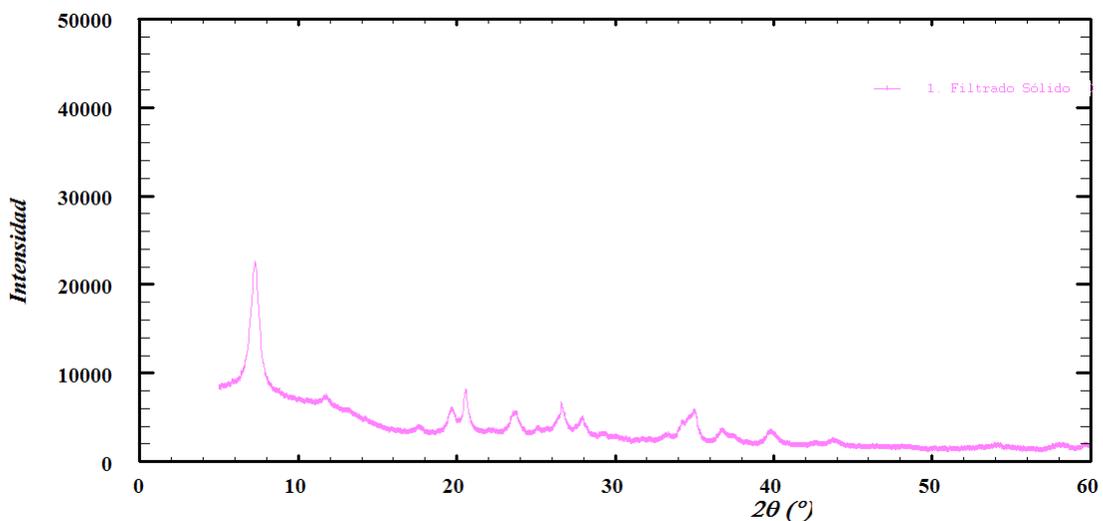
(b)



(c)



(d)



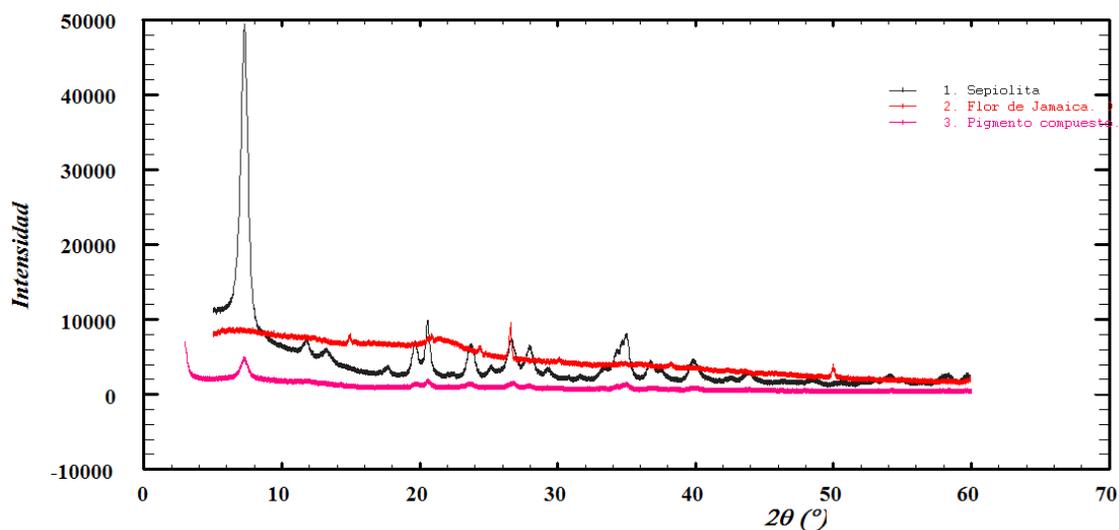
(e)

**Figura 31. Difractogramas de Rayos X. (a) Flor de Jamaica, (b) Sepiolita, (c) Pigmento compuesto, (d) Filtrado líquido del compuesto, (e) Filtrado sólido del compuesto.**

El estudio de los difractogramas nos dará información sobre qué tipo de interacción existe entre las moléculas de antocianos presentes en el extracto de Jamaica y la arcilla Sepiolita, durante la formación del pigmento, para esto se compararon los

ángulos de los principales picos de las muestras de Pigmento compuesto, Filtrado líquido del compuesto y Filtrado sólido del compuesto con las muestras de Flor de Jamaica y Sepiolita, siguiendo la Ley de Bragg.

La comparación de los difractogramas del Pigmento compuesto, la Flor de Jamaica y la Sepiolita se muestran en la figura 32.



**Figura 32. Difractogramas de Rayos X polvo. Flor de Jamaica (rojo), Sepiolita (negro), Pigmento compuesto (rosa).**

Al analizar los tres difractogramas podemos observar que existen picos similares entre las muestras, algunos coinciden exactamente en las tres muestras, pero otros se encuentran corridos a la izquierda o derecha. Para un mayor análisis se determinaron los ángulos de los principales picos de las muestras para compararlos y observar con mayor precisión las variaciones en la posición de los picos. Los resultados se muestran en la tabla 8

**Tabla 8. Comparación entre los ángulos de los principales picos de las muestras de Sepiolita, Flor de Jamaica y Pigmento compuesto.**

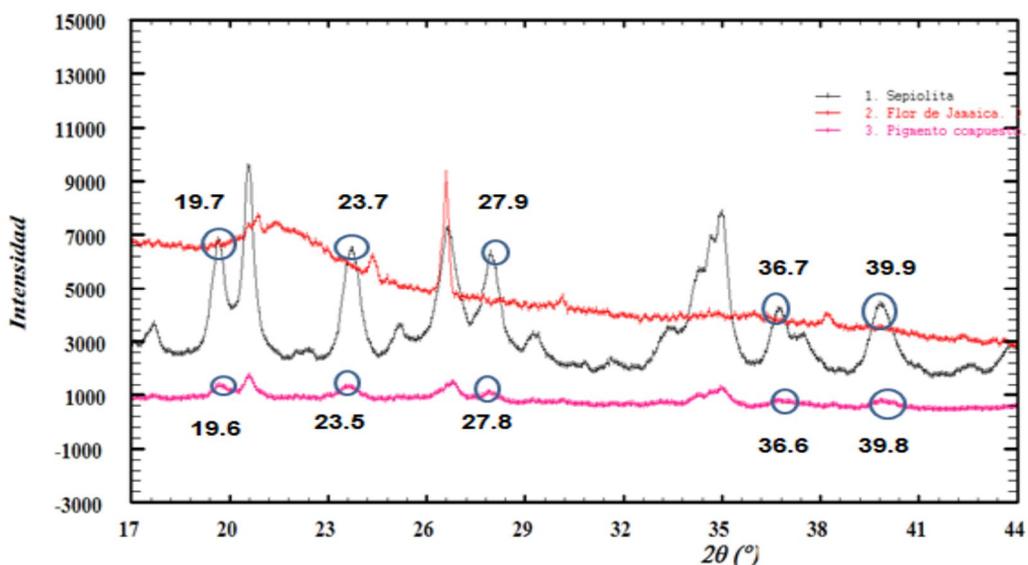
Sepiolita		Flor de Jamaica		Pigmento compuesto	
Ángulo	Intensidad	Ángulo	Intensidad	Ángulo	Intensidad
7.28933	49027.7	7.01957	8616.4	7.26270	4630.5
11.76375	7211.5			11.85874	1517.7



Sepiolita		Flor de Jamaica		Pigmento compuesto	
		14.91802	7745.6	14.27509	1268.7
		16.28378	6899.0	16.04089	997.1
<i>17.67071</i>	<i>3621.1</i>			<i>17.62082</i>	<i>1019.8</i>
<u>19.66425</u>	<u>6841.2</u>			<u>19.66543</u>	<u>1336.6</u>
<u>20.57279</u>	<u>9606.7</u>	<u>20.84181</u>	<u>7708.2</u>	<u>20.68773</u>	<u>1585.6</u>
<i>23.71083</i>	<i>6472.0</i>			<i>23.56877</i>	<i>1336.6</i>
<u>26.64784</u>	<u>7219.7</u>	<u>26.58426</u>	<u>9225.7</u>	<u>26.72862</u>	<u>1427.2</u>
<i>27.95927</i>	<i>6298.6</i>			<i>27.84387</i>	<i>1087.7</i>
		30.10951	4610.3	30.07435	793.4
<i>34.96748</i>	<i>7781.6</i>	<i>34.86150</i>	<i>4000.3</i>	<i>34.90707</i>	<i>1223.5</i>
<i>36.74722</i>	<i>4208.3</i>			<i>36.67286</i>	<i>816.1</i>
		38.20437	3994.9	38.34572	657.7
<i>39.83902</i>	<i>4337.5</i>	<i>39.42879</i>	<i>3564.3</i>	<i>39.83271</i>	<i>748.2</i>
<i>43.82833</i>	<i>2852.7</i>	<i>43.60570</i>	<i>3020.6</i>	<i>43.73606</i>	<i>567.1</i>
				<b>58.32714</b>	<b>431.4</b>
<i>59.68782</i>	<i>2532.3</i>			<i>59.53532</i>	<i>408.7</i>
				<b>61.02230</b>	<b>499.2</b>

negrita(interacciones nuevas), cursiva (corrimientos hacia la izquierda), subrayado (corrimientos hacia la derecha)

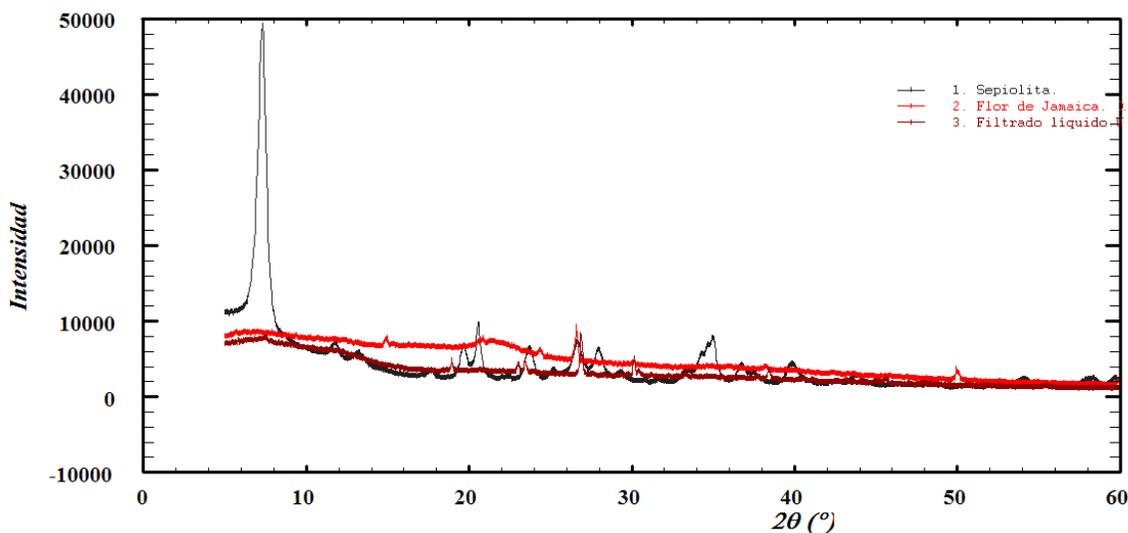
En la tabla 8 se observan variaciones en los valores de los ángulos de las muestras. Los números en cursiva, que representan picos en el pigmento compuesto que se corrieron hacia la izquierda con respecto a los picos en la Sepiolita, son mayores que los números subrayados, que representan los picos que se corrieron hacia la derecha, por lo tanto, se puede decir que hay un predominio de la disminución del valor de los ángulos y aumento de las distancias entre planos, siendo esto un indicio de interacción entre la molécula y la arcilla (figura 33).



**Figura 33. Variaciones en la posición de los picos para las muestras de Pigmento compuesto, Sepiolita y Flor de Jamaica.**

Por otro lado, los valores que se encuentran en negrita representan nuevos picos, que posiblemente son producto de nuevas interacciones que se están dando entre la molécula y la arcilla.

La comparación de los difractogramas del filtrado líquido del compuesto, la flor de Jamaica y la Sepiolita se muestran en la figura 34.



**Figura 34. Difractogramas de Rayos X polvo. Flor de Jamaica (rojo), Sepiolita (negro), Filtrado líquido del compuesto (marrón).**

Al analizar los difractogramas se observa que la muestra de Flor de Jamaica y el Filtrado líquido del compuesto presentan picos similares ubicados en posiciones muy cercanas. Para un mayor análisis se determinaron los ángulos de los principales picos de las muestras para compararlos y observar con mayor precisión las variaciones en la posición de los picos. Los resultados se muestran en la tabla 9:

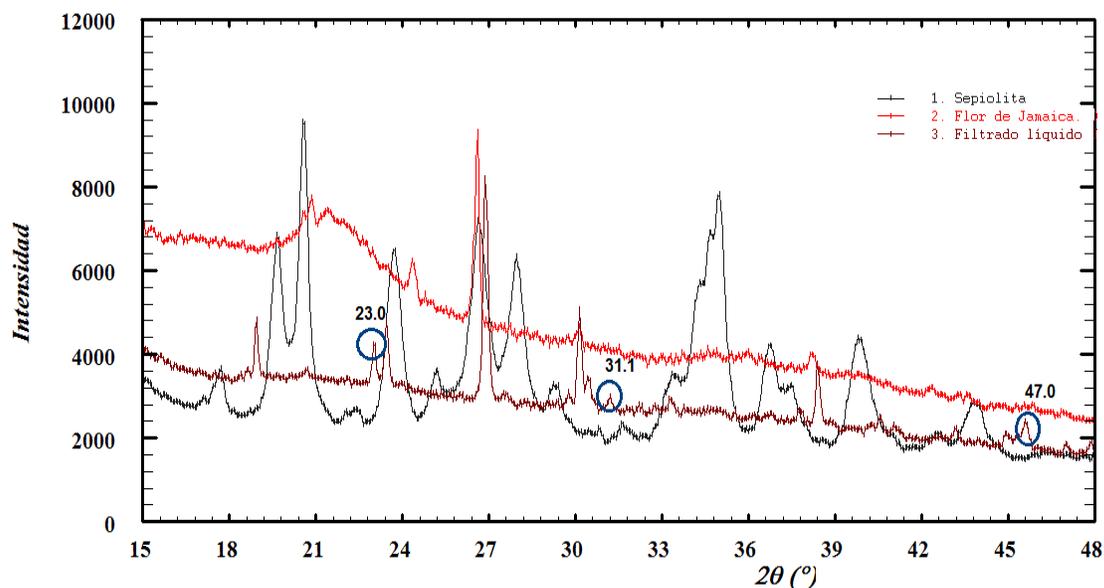
**Tabla 9. Comparación entre los ángulos de los principales picos de las muestras de Sepiolita, Flor de Jamaica y Filtrado líquido del compuesto.**

Sepiolita		Flor de Jamaica		Filtrado líquido del compuesto	
Ángulo	Intensidad	Ángulo	Intensidad	Ángulo	Intensidad
<u>7.28933</u>	<u>49027.7</u>	<u>7.01957</u>	<u>8616.4</u>	<u>7.41909</u>	<u>7784.1</u>
<u>17.67071</u>	<u>3621.1</u>			<u>17.50426</u>	<u>3551.9</u>
				<b><u>18.93492</u></b>	<b><u>4833.1</u></b>
<u>20.57279</u>	<u>9606.7</u>	<u>20.84181</u>	<u>7708.2</u>	<u>20.66601</u>	<u>3618.9</u>
				<b><u>23.01760</u></b>	<b><u>4270.2</u></b>
<u>23.71083</u>	<u>6472.0</u>			<u>23.44586</u>	<u>4814.2</u>
<u>26.64784</u>	<u>7219.7</u>	<u>26.58426</u>	<u>9225.7</u>	<u>26.88302</u>	<u>8162.2</u>
<u>27.95927</u>	<u>6298.6</u>			<u>27.54893</u>	<u>2956.7</u>
<u>29.28361</u>	<u>3240.5</u>			<u>29.77465</u>	<u>3070.9</u>
		<u>30.10951</u>	<u>4610.3</u>	<u>30.15027</u>	<u>5063.3</u>
				<b><u>30.45010</u></b>	<b><u>3390.0</u></b>
				<b><u>31.19258</u></b>	<b><u>2967.1</u></b>
				<b><u>32.22722</u></b>	<b><u>2732.1</u></b>

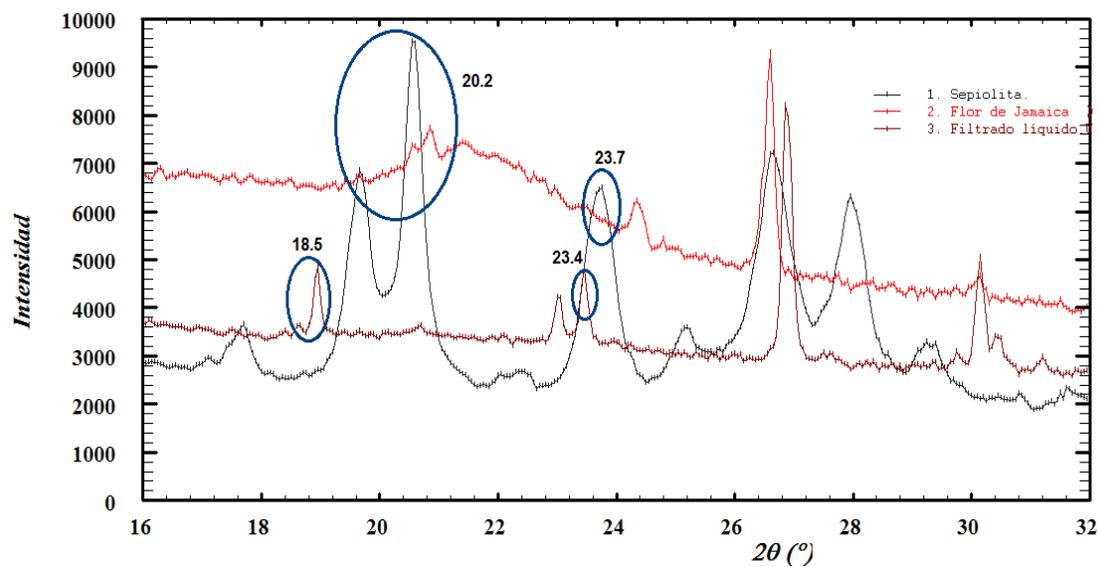
Sepiolita		Flor de Jamaica		Filtrado líquido del compuesto	
		32.66656	3950.5	32.77925	2722.7
		33.73882	3999.5	33.30709	2909.5
<u>36.74722</u>	<u>4208.3</u>			36.76482	2583.0
				<b>37.79052</b>	<b>2637.7</b>
		38.20437	3994.9	38.40595	3730.3
				<b>40.26397</b>	<b>2318.2</b>
				<b>40.56393</b>	<b>2510.4</b>
				<b>41.06279</b>	<b>2299.4</b>
<i>43.82833</i>	<i>2852.7</i>	<i>43.28458</i>	<i>3020.3</i>	<i>43.17309</i>	<i>2228.4</i>
				<b>44.95868</b>	<b>2082.1</b>
		45.83718	2788.6	45.60018	2391.9
				<b>47.02300</b>	<b>1858.1</b>
				<b>47.88486</b>	<b>1903.2</b>
				<b>50.13716</b>	<b>1533.5</b>
				<b>55.42274</b>	<b>1422.5</b>

negrita (interacciones nuevas), cursiva (corrimientos hacia la izquierda), subrayado (corrimientos hacia la derecha)

En la tabla 9 se observan variaciones en los valores de los ángulos de las muestras. Los números en negrita, que representan picos nuevos en el filtrado líquido, son mayores que los números subrayados, que representan los picos que se corrieron hacia la derecha y los números en cursiva, que representan los picos que se corrieron hacia la izquierda, por lo tanto se puede decir que hay un predominio de la formación de nuevas interacciones entre la molécula y la arcilla, en la muestra de filtrado líquido del compuesto (figura 35).



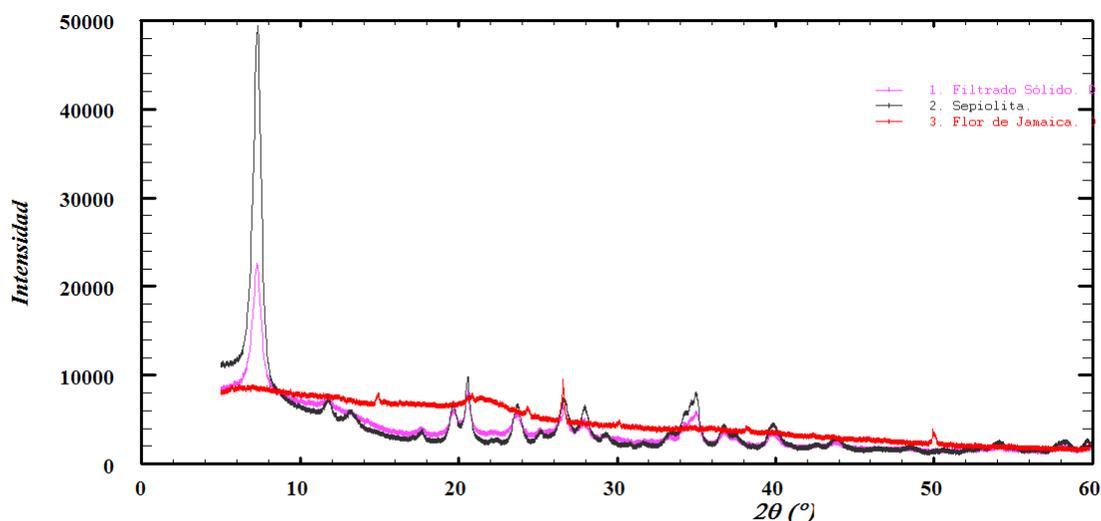
(a)



(b)

**Figura 35. Variaciones en la posición de los picos para las muestras de Filtrado líquido del compuesto, Sepiolita y Flor de Jamaica, (a) picos nuevos, (b) picos desplazados hacia la izquierda.**

La comparación de los difractogramas del Filtrado sólido del compuesto, la Flor de Jamaica y la Sepiolita se muestran en la figura 36.



**Figura 36. Difractogramas de Rayos X polvo. Flor de Jamaica (rojo), Sepiolita (negro), Filtreado sólido del compuesto (rosa).**

Al analizar los difractogramas se observa que la muestra de Sepiolita y el Filtreado sólido del compuesto guardan similitud. Para un mayor análisis se determinaron los ángulos de los principales picos de las muestras para compararlos y observar con mayor precisión las variaciones en la posición de los picos. Los resultados se muestran en la tabla 10.

**Tabla 10. Comparación entre los ángulos de los principales picos de las muestras de Sepiolita, Flor de Jamaica y Filtreado sólido del compuesto.**

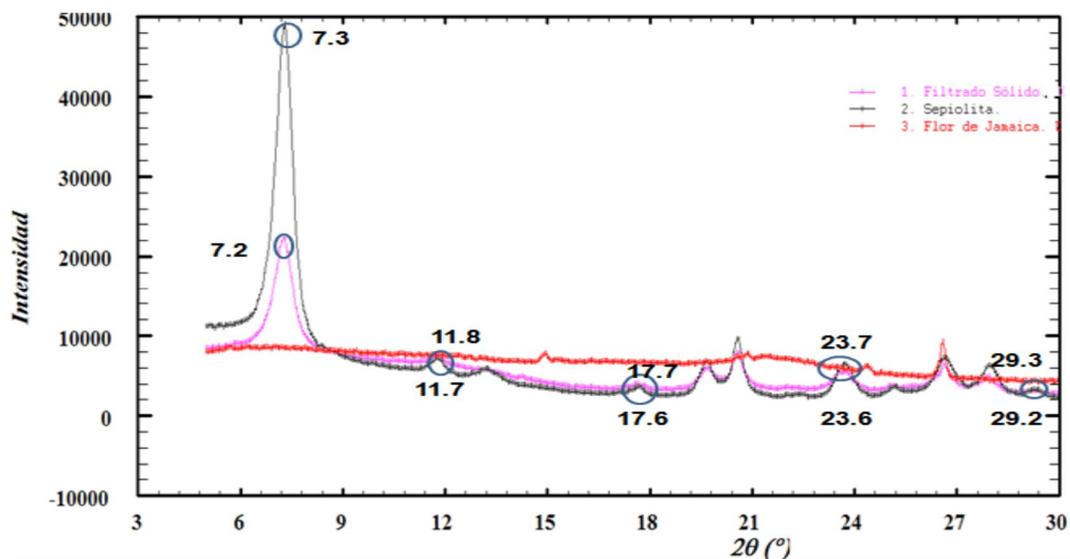
Sepiolita		Flor de Jamaica		Filtreado sólido del compuesto	
Ángulo	Intensidad	Ángulo	Intensidad	Ángulo	Intensidad
7.28933	49027.7	7.01957	8616.4	7.26250	22330.2
11.76375	7211.5			11.75091	7330.0
17.67071	3621.1			17.62862	3962.6
19.66425	6841.2			19.68276	5964.6
20.57279	9606.7	20.84181	7708.2	20.56617	7916.7
23.71083	6472.0			23.68089	5420.0
25.17889	3595.8			25.11187	3765.4
26.64784	7219.7	26.58426	9225.7	26.63273	6433.6
27.95927	6298.6			27.91507	4856.2
29.28361	3240.5			29.20314	3146.1
		30.10951	4610.3	30.05204	2840.1
				<b>31.72131</b>	<b>2572.9</b>
		32.99461	3904.7	32.18547	2554.8



Sepiolita		Flor de Jamaica		Filtrado sólido del compuesto	
		33.73882	3999.5	33.31905	2994.7
		34.61269	4123.2	34.29010	4404.9
34.96748	7781.6	<u>34.86150</u>	<u>4000.3</u>	34.98073	5627.2
<u>36.74722</u>	<u>4208.3</u>			<u>36.76192</u>	<u>3525.3</u>
39.83902	4337.5	39.42879	3564.3	39.82930	3397.8
43.82833	2852.7	<i>43.60570</i>	<i>3020.6</i>	<i>43.77620</i>	<i>2392.7</i>
		54.91708	1945.9	54.19361	1872.1
59.68782	2532.3			59.70319	1924.7

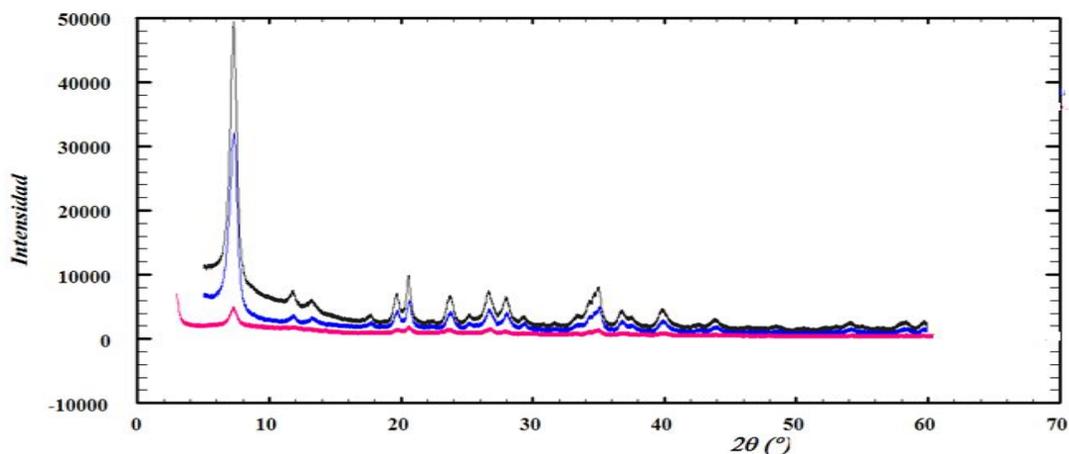
Negrita (interacciones nuevas), cursiva (corrimientos hacia la izquierda), subrayado (corrimientos hacia la derecha)

En la tabla 10 se observan variaciones en los valores de los ángulos de las muestras. Los números en cursiva, que representan picos en el pigmento compuesto que se corrieron hacia la izquierda con respecto a los picos en la Sepiolita, son mayores que los números subrayados, que representan los picos que se corrieron hacia la derecha, por lo tanto, se puede decir que hay un predominio de la disminución del valor de los ángulos y aumento de las distancias entre planos, siendo esto un indicio de interacción entre la molécula y la arcilla (figura 37).



**Figura 37. Variaciones en la posición de los picos para las muestras de Filtrado líquido del compuesto, Sepiolita y Flor de Jamaica**

También se comparó una muestra de Sepiolita con otras dos muestras de Sepiolita calentada y pigmento compuesto, en la siguiente figura se muestran los 3 difractogramas.



**Figura 38. Difractogramas de Rayos X polvo. Sepiolita (negro), Sepiolita calentada (azul) y pigmento compuesto (rosa).**

En la tabla 11 se muestra la comparación de los ángulos de difracción para las tres muestras analizadas.

**Tabla 11. Ángulos de difracción para las diferentes muestras de Sepiolita, Sepiolita calentada y pigmento compuesto.**

Picos	Sepiolita	Sepiolita calentada	Pigmento compuesto
1	7.28933	<b>7.31179</b>	<u>7.26270</u>
2	17.67071	<b>17.70811</b>	<u>17.62082</u>
3	23.71083	<b>23.76318</b>	<u>23.56877</u>
4	27.95927	<b>28.01541</b>	<u>27.84387</u>
5	34.96748	<b>35.02228</b>	<u>34.90707</u>
6	36.74722	<b>36.81532</b>	<u>36.67286</u>
7	39.83902	<b>39.91135</b>	<u>39.83271</u>

Negrita (corrimientos hacia la derecha), subrayada (corrimientos hacia la izquierda)

De la tabla anterior podemos observar como al calentar la Sepiolita los ángulos aumentan por lo tanto disminuye la distancia entre planos atómicos volviéndose más pequeño el tamaño del poro del material. Sin embargo, para el pigmento compuesto,



los ángulos disminuyen con respecto a la Sepiolita, lo cual significa que aumenta el tamaño del poro del material, indicio de la posible interacción entre la molécula de antociano y la arcilla Sepiolita.

#### VII.II.V. Análisis estadístico

Con el objetivo de conocer si el tiempo influye significativamente en los resultados de las pruebas de estabilidad y colorimetría, se realizó un análisis estadístico a los valores obtenidos.

Para esto se utilizó el programa Minitab versión 20.3 y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y prueba Tuckey con un intervalo de confianza del 95%. Para el análisis se consideró un factor con 10 niveles:

**Factor:** tiempo

**Niveles (días):** 0 7 14 21 28 35 42 49 56 63

**Variables dependientes:** Absorbancia, luminosidad, a, b, Cromaticidad y Hue

Las muestras analizadas fueron extracto de Jamaica calentado, filtrado líquido del compuesto y pigmento compuesto.

En la tabla 12 se muestra la desviación estándar para los resultados de las mediciones de absorbancia para las muestras de extracto de Jamaica calentado y filtrado líquido del compuesto.

**Tabla 12. Valores de absorbancia (520 nm) con desviación estándar para las muestras de extracto de Jamaica calentado y filtrado líquido del compuesto.**

Días	Muestras	
	Extracto de Jamaica calentado	Filtrado líquido del compuesto
0	41.70± 0.76	32.36± 1.21
7	42.70± 0.15	32.25± 0.25



Días	Muestras	
	Extracto de Jamaica calentado	Filtrado líquido del compuesto
14	41.95 ± 1.90	29.48± 0.27
21	36.72± 0.55	23.60± 0.41
28	37.89± 1.01	23.26± 0.36
35	27.13± 0.36	18.03± 0.42
42	23.63± 0.25	17.12 ± 0.19
49	21.30± 0.02	15.39± 0.30
56	17.87± 0.42	15.53± 0.32
63	17.27± 0.25	13.82± 0.32

Las cifras que se muestran en la tabla representan la absorbancia de las muestras, medidas por triplicado, con la desviación estándar. Los resultados de la prueba Tuckey mostraron un valor p menor que 0.05, lo cual indica que el tiempo tiene una influencia significativa en la absorbancia para un 95 % de confianza.

En la tabla 13 se muestran los valores de Luminosidad, a, b, Cromaticidad y Ángulo de tono con la desviación estándar para las muestras de extracto de Jamaica calentado, filtrado líquido del compuesto y pigmento compuesto.

**Tabla 13. Valores de Luminosidad, a, b, Cromaticidad y Ángulo de tono con la desviación estándar para las muestras de extracto de Jamaica calentado, filtrado líquido del compuesto y pigmento compuesto.**

Días	Muestras		
	Extracto de Jamaica calentado	Filtrado líquido del compuesto	Pigmento compuesto
0	L 19.74±0.11 a 2.24 ±0.03 b -1.60 ±0.02 Croma 2.75 ±0.02 Hue 35.67 ±0.20	L 19.56±0.04 a 2.38±0.03 b -1.60 ±0.03 Croma 2.87±0.02 Hue 33.90 ±0.70	L 19.89±0.01 a 3.70±0.06 b -1.24 ±0.01 Croma 3.78 ±0.26 Hue 18.54 ±0.14
7	L 19.97±0.12 a 3.00 ±0.02 b -1.28 ±0.03 Croma 3.27 ±0.20 Hue 23.20±0.43	L 19.76±0.02 a 2.92 ±0.02 b -1.35 ±0.01 Croma 3.22 ±0.03 Hue 24.85±0.05	L 19.15±0.02 a 1.47 ±0.01 b -1.91 ±0.02 Croma 2.41 ±0.02 Hue 52.51 ±0.14
14	L 19.79±0.16 a 3.12 ±0.03 b -1.19 ±0.02 Croma 3.34 ±0.03 Hue 20.87 ±0.30	L 19.75±0.02 a 2.98 ±0.01 b -1.27 ±0.01 Croma 3.24 ±0.01 Hue 23.02 ±0.15	L 19.71±0.06 a 1.64 ±0.03 b -1.72 ±0.01 Croma 2.37 ±0.01 Hue 46.39 ±0.62
21	L 19.66±0.04 a 3.08 ±0.02 b -1.16 ±0.01 Croma 3.29 ±0.02 Hue 20.63 ±0.11	L 19.43±0.02 a 3.31 ±0.01 b -1.18 ±0.02 Croma 3.51 ±0.02 Hue 19.70 ±0.28	L 19.66±0.04 a 1.54 ±0.04 b -1.68 ±0.04 Croma 2.28 ±0.05 Hue 47.51 ±0.19
28	L 19.68±0.05 a 3.09 ±0.01 b -1.15 ±0.02 Croma 3.30 ±0.01 Hue 20.40 ±0.30	L 19.43±0.02 a 3.32 ±0.01 b -1.18 ±0.02 Croma 3.52 ±0.01 Hue 19.64 ±0.29	L 19.69±0.04 a 1.57 ±0.01 b -1.68 ±0.03 Croma 2.30 ±0.03 Hue 47.07 ±0.25
35	L 19.62±0.02 a 3.02 ±0.01	L 19.24±0.01 a 3.31 ±0.01	L 19.63±0.05 a 1.39 ±0.02

Días	Muestras		
	Extracto de Jamaica calentado	Filtrado líquido del compuesto	Pigmento compuesto
	<b>b</b> $-1.12 \pm 0.01$ <b>Croma</b> $3.22 \pm 0.01$ <b>Hue</b> $20.39 \pm 0.18$	<b>b</b> $-1.16 \pm 0.01$ <b>Croma</b> $3.51 \pm 0.01$ <b>Hue</b> $19.27 \pm 0.14$	<b>b</b> $-1.69 \pm 0.01$ <b>Croma</b> $2.19 \pm 0.02$ <b>Hue</b> $50.47 \pm 0.42$
42	<b>L</b> $19.65 \pm 0.05$ <b>a</b> $3.08 \pm 0.01$ <b>b</b> $-1.05 \pm 0.01$ <b>Croma</b> $3.26 \pm 0.00$ <b>Hue</b> $18.74 \pm 0.23$	<b>L</b> $19.25 \pm 0.03$ <b>a</b> $3.26 \pm 0.01$ <b>b</b> $-0.95 \pm 0.02$ <b>Croma</b> $3.40 \pm 0.01$ <b>Hue</b> $16.20 \pm 0.29$	<b>L</b> $19.61 \pm 0.01$ <b>a</b> $1.34 \pm 0.02$ <b>b</b> $-1.64 \pm 0.02$ <b>Croma</b> $2.11 \pm 0.02$ <b>Hue</b> $50.79 \pm 0.23$
49	<b>L</b> $19.67 \pm 0.02$ <b>a</b> $3.08 \pm 0.01$ <b>b</b> $-1.04 \pm 0.01$ <b>Croma</b> $3.25 \pm 0.01$ <b>Hue</b> $18.59 \pm 0.03$	<b>L</b> $19.23 \pm 0.01$ <b>a</b> $3.25 \pm 0.01$ <b>b</b> $-0.95 \pm 0.01$ <b>Croma</b> $3.39 \pm 0.01$ <b>Hue</b> $16.37 \pm 0.08$	<b>L</b> $19.62 \pm 0.01$ <b>a</b> $1.35 \pm 0.02$ <b>b</b> $-0.55 \pm 1.88$ <b>Croma</b> $2.12 \pm 0.02$ <b>Hue</b> $50.45 \pm 0.49$
56	<b>L</b> $19.67 \pm 0.01$ <b>a</b> $3.06 \pm 0.01$ <b>b</b> $-1.04 \pm 0.00$ <b>Croma</b> $3.24 \pm 0.01$ <b>Hue</b> $18.74 \pm 0.03$	<b>L</b> $19.22 \pm 0.01$ <b>a</b> $3.25 \pm 0.00$ <b>b</b> $-0.96 \pm 0.00$ <b>Croma</b> $3.39 \pm 0.00$ <b>Hue</b> $16.46 \pm 0.00$	<b>L</b> $19.62 \pm 0.01$ <b>a</b> $1.35 \pm 0.01$ <b>b</b> $-1.63 \pm 0.02$ <b>Croma</b> $2.12 \pm 0.02$ <b>Hue</b> $50.32 \pm 0.28$
63	<b>L</b> $19.69 \pm 0.01$ <b>a</b> $3.06 \pm 0.01$ <b>b</b> $-1.04 \pm 0.00$ <b>Croma</b> $3.22 \pm 0.01$ <b>Hue</b> $18.80 \pm 0.03$	<b>L</b> $19.20 \pm 0.01$ <b>a</b> $3.23 \pm 0.00$ <b>b</b> $-0.95 \pm 0.01$ <b>Croma</b> $3.37 \pm 0.01$ <b>Hue</b> $16.34 \pm 0.10$	<b>L</b> $19.60 \pm 0.01$ <b>a</b> $1.35 \pm 0.01$ <b>b</b> $-1.61 \pm 0.00$ <b>Croma</b> $2.09 \pm 0.01$ <b>Hue</b> $50.12 \pm 0.13$

La coordenada L varía entre 100 (blanco perfecto) y cero (negro). De la tabla anterior se observa como el parámetro L muestra valores entre los 19.97 y 19.20 para las tres muestras analizadas. No se observaron variaciones significativas de este parámetro entre las tres muestras analizadas durante el período de estudio.



El parámetro  $a$  pasa de rojo (+) a colores verdes (-). Para el parámetro el mismo se observaron valores positivos para las tres muestras, con cifras entre 3.70 y 1.34. Los mayores valores de  $a$  se observaron en la muestra de filtrado líquido del compuesto; significando que fue la que menos pérdida del color rojo experimentó, a diferencia de la muestra de pigmento compuesto para la cual se observó una mayor disminución de este parámetro.

Los valores de  $b$  varían de amarillo (+) a azul (-). En este estudio solo se obtuvieron valores de  $b$  negativos entre -1.91 y -0.55, para todas las muestras. Los valores más negativos se observaron en la muestra de pigmento compuesto. Esta es la muestra que menos desplazamiento hacia el color amarillo experimentó. Dicho comportamiento se explica, debido a que es la muestra con mayor contenido de Sepiolita, favoreciendo la estabilización de la molécula.

Se encontró que la Cromaticidad estuvo entre valores de 3.78 y 2.09, para las tres muestras. Para la muestra de pigmento compuesto se observó una disminución de la Cromaticidad, no siendo así para la muestra de filtrado líquido del compuesto, la cual reportó un aumento de este parámetro.

“Hue” es un parámetro que indica el tono o matiz, y varía entre  $360^\circ$  y  $0^\circ$  (rosa). Dicho parámetro se comportó entre valores de 52.5 y 16.2, para las mediciones realizadas en las tres muestras. La muestra de pigmento compuesto reportó los mayores valores de tonalidad, y los menores valores se observaron en la muestra de filtrado líquido.

Los resultados de la prueba Tuckey mostraron un valor  $p$  menor que 0.05 para casi todos los parámetros. Esto indica que el tiempo tiene una influencia significativa en los valores de Luminosidad,  $a$ ,  $b$ , Cromaticidad y Hue, para un 95 % de confianza. Solo para el parámetro  $b$  de la muestra de pigmento compuesto se reportó un valor  $p$  mayor a 0.05, indicando que el tiempo no tuvo una influencia significativa en este parámetro.



### VII.III. Discusión General

El pigmento compuesto se obtuvo a partir de un extracto fenólico rico en antocianos con una concentración de 0.70 mg/mL (equivalentes de Cianidina 3-glucósido), siendo la Cianidina 3-O-sambubiósido y Delfinidina 3-O-sambubiósido los antocianos mayoritarios, lo cual se puede comprobar a partir de los picos detectados en valores alrededor de los 520 nm aproximadamente en el espectro UV-Vis. Sinela et al., 2017 reportó resultados similares para un extracto de *Hibiscus sabdariffa* donde se identificaron estos dos antocianos como los principales, con valores alrededor de los 570 nm en el espectro UV-Vis y concentraciones entre 0.46-0.78 mg/mL.

La metodología utilizada para la elaboración del pigmento compuesto no afectó en gran medida el color original del extracto fenólico, el color rojo cambió a un color más claro debido a la combinación de la molécula con la arcilla Sepiolita. Luego de diferentes pruebas de estabilidad el color del pigmento compuesto se mantuvo estable. Los análisis de microscopía de barrido electrónico reportaron que el tamaño de partícula de la muestra de extracto de Jamaica (0.01  $\mu\text{m}$ ) es menor que el tamaño de partícula de la Sepiolita (0.18  $\mu\text{m}$ ), lo cual puede ser favorable para la formación del pigmento compuesto. Estos resultados se corresponden con las mediciones espectrofotométricas realizadas al pigmento compuesto, utilizando como control una muestra de extracto de Jamaica calentado a la misma temperatura y por el mismo tiempo que el utilizado para la formación del pigmento compuesto.

Al realizar una comparación de las cinéticas de degradación del extracto de Jamaica calentado y el pigmento compuesto luego de mantenerlos bajo las mismas condiciones por 63 días, se observa que la concentración de antocianos en el extracto de Jamaica calentado disminuye más rápido que en el pigmento compuesto siendo las velocidades de degradación de  $1.85 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$  y  $1.62 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$  respectivamente. Además, los barridos espectrales realizados a las dos muestras, indican desplazamientos de la longitud de onda del máximo de absorción en el extracto de Jamaica calentado hacia longitudes de ondas más cortas, lo cual es debido a la degradación de los antocianos en la



muestra. Sin embargo, para la muestra de pigmento compuesto no se observó prácticamente desplazamientos de la longitud de onda del máximo de absorción, lo cual puede deberse a una posible estabilización de los antocianos por medio de la arcilla Sepiolita.

Las mediciones de color al igual que las mediciones espectrofotométricas también indican una posible estabilización de los antocianos presentes en el pigmento compuesto, debido a que fue la muestra que menos pérdidas de color experimentó. Los parámetros de  $a$  y  $b$  reportaron menores variaciones en las muestras que contenían Sepiolita, al igual que los colores más vivos, es decir mayores valores de tonalidades (Hue), se observaron en estas muestras.

Los estudios de difracción de rayos X realizados, al igual que las pruebas anteriores mostraron indicios de interacciones entre la molécula y la arcilla. Al analizar los difractogramas podemos notar que existe un corrimiento de los ángulos de difracción en la muestra de pigmento compuesto hacia valores más pequeños con respecto a los ángulos de difracción presentes en la muestra de Sepiolita. Una disminución de los ángulos de difracción indica un aumento de las distancias entre planos del material cristalino, lo cual puede significar una posible interacción de la molécula de antociano con la arcilla, provocando la transformación de la estructura del cristal.

Teniendo en cuenta el resultado de todas las pruebas realizadas al pigmento compuesto obtenido, la metodología utilizada puede ser considerada como una posible variante de estabilización de los antocianos presentes en la flor de Jamaica. La purificación del extracto fenólico, con el objetivo de tener en este, solo las moléculas de interés, podría arrojar mejores resultados a este estudio.



## VIII. CONCLUSIONES

El método que mejor correlación reportó entre datos teóricos y experimentales para las dos moléculas Cianidina y Delfinidina fue el DFT:B3LYP/6-31G con un valor de  $R^2$  de 0.917 y 0.916 respectivamente.

Los cálculos de frecuencia para las dos moléculas fueron realizados con el método DFT:B3LYP/6-31G y se comprobó que las geometrías optimizadas correspondían a mínimos globales en la superficie de energía potencial.

Los cálculos de espectro de absorción fueron realizados utilizando el método TD-DFT:B3LYP/6-31G para las dos moléculas reportando que los valores de  $\lambda_{\max}$  calculados se aproximan a los valores experimentales de  $\lambda_{\max}$  reportados para la Cianidina y Delfinidina de 515 nm y 522 nm respectivamente.

Se calcularon las propiedades químicas de potencial iónico, afinidad electrónica, potencial químico, electronegatividad, dureza y blandura de estas moléculas para conocer aspectos sobre la reactividad química global, concluyéndose que la Cianidina es más estable que la Delfinidina, debido a que presenta una mayor dureza y menor blandura.

Se elaboró un compósito colorante a partir de los antocianos presentes en la Flor de Jamaica y una matriz inorgánica (Sepiolita) utilizando las técnicas de antiguas civilizaciones precolombinas.

La microscopía de barrido electrónico reportó que la muestra de Flor de Jamaica tiene un tamaño de partícula inferior a la muestra de Sepiolita, siendo 0.01 y 0.18  $\mu\text{m}$  respectivamente, mientras que la muestra de pigmento compuesto tiene un tamaño de partícula mayor siendo de 8.34  $\mu\text{m}$ .



El estudio de estabilidad realizado mediante mediciones espectrofotométricas indicó que los antocianos presentes en la flor de Jamaica se degradan a una velocidad menor en el pigmento compuesto que en un extracto fenólico, con valores de  $1.62 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  y  $1.85 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ .

Los barridos espectrales de 300 a 700 nm para el extracto de Jamaica calentado y el filtrado líquido del compuesto muestran la existencia de los antocianos presentes en la flor de Jamaica y ácidos fenólicos, absorbiendo a longitudes de onda de 520 y 320 nm aproximadamente.

Para el extracto de Jamaica calentado se observaron efectos hipsocrómicos en los barridos espectrales, a diferencia de la muestra de filtrado líquido del compuesto, en la cual la longitud de onda del máximo de absorción no se desplazó con el paso de los días.

Las mediciones de color realizadas evidencian que las muestras de extracto de Jamaica calentado, filtrado líquido del compuesto y pigmento compuesto se encuentran en el cuadrante 4 ( $+a^*$ ,  $-b^*$ ) de la gráfica del color, que es el cuadrante que va del rojo al azul.

Para el parámetro **L**, la caracterización mostró valores entre los 19.97 y 19.20 para las tres muestras analizadas, y no se observaron variaciones significativas de este parámetro entre ellas durante el período de estudio.

Los mayores valores de **a** se observaron en la muestra de filtrado líquido del compuesto, significando que fue la que menos pérdida del color rojo experimentó, a diferencia de la muestra de pigmento compuesto para la cual se observó una mayor disminución de este parámetro.



Los valores de **b** más negativos se observaron en la muestra de pigmento compuesto, muestra que menos desplazamiento hacia el color amarillo experimentó.

La Cromaticidad estuvo entre valores de 3.78 y 2.09 para las tres muestras. Para la muestra de pigmento compuesto se observó una disminución de la Cromaticidad no siendo así para la muestra de filtrado líquido del compuesto que reportó un aumento de este parámetro.

El parámetro "Hue" se comportó entre valores de 52.5 y 16.2 para las mediciones realizadas de las tres muestras. La muestra de pigmento compuesto reportó los mayores valores de tonalidad, y los menores valores se observaron en la muestra de filtrado líquido.

Los análisis de Difracción de Rayos X realizados a las muestras de Pigmento compuesto, filtrado líquido del compuesto y filtrado sólido del compuesto mostraron indicios de interacciones entre la molécula y la arcilla durante la formación del compuesto colorante.

Los resultados de los análisis estadísticos indican que el tiempo influye de manera significativa en la absorbancia de las muestras de extracto de Jamaica calentado y filtrado líquido del compuesto para la prueba de estabilidad, al igual que en los valores de L, a, b, "Croma" y "Hue" para las muestras de extracto de Jamaica calentado, filtrado líquido del compuesto y pigmento compuesto en las mediciones de color.



## **IX. RECOMENDACIONES**

Desarrollar los cálculos teóricos con las moléculas de Cianidina-3-O-sambubiósido y Delfinidina-3-O-sambubiósido.

Realizar el estudio de Ríelved de los resultados de Difracción de Rayos X para las muestras de Sepiolita y Pigmento Compuesto.

Obtener el pigmento compuesto utilizando un extracto purificado que solo contenga las moléculas de interés.

Realizar Resonancia Magnética Nuclear (RMN) a las muestras obtenidas y analizar si existen cambios entre ellas.

Utilizar otras moléculas de antocianos para la elaboración de pigmentos compuestos que tengan un tamaño apropiado en comparación con la Sepiolita.



## X.REFERENCIAS

- Aguilera-Otíz, M., Reza-Vargas, M. del C., Chew-Madinaveita, R. G., & Meza-Velázquez, J. A. (2011). Propiedades Funcionales De Las Antocianinas. *BIOtecnica*, 13(2), 16. <https://doi.org/10.18633/bt.v13i2.81>
- Amr, A., & Al-Tamimi, E. (2007). Stability of the crude extracts of *Ranunculus asiaticus* anthocyanins and their use as food colourants. *International Journal of Food Science and Technology*, 42(8), 985–991. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01334.x>
- 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>
- Antony Selvam, L., Prathap, S., Muthu, S., Balamurugan, N., & Victor Antony Raj, M. (2020). Quantum chemical computational studies on 2,4-difluoroaniline calculated by DFT method. *Materials Today: Proceedings*, xxxx. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.08.685>
- Ballester, A. R., Molthoff, J., de Vos, R., Hekkert, B. te L., Orzaez, D., Fernández-Moreno, J. P., Tripodi, P., Grandillo, S., Martin, C., Heldens, J., Ykema, M., Granell, A., & Bovy, A. (2010). Biochemical and molecular analysis of pink tomatoes: Dereglated expression of the gene encoding transcription factor SLMYB12 leads to pink tomato fruit color. *Plant Physiology*, 152(1), 71–84. <https://doi.org/10.1104/pp.109.147322>
- Borkowski, T., Szymusiak, H., Gliszcz, A., & Tyrakowska, B. (2005). The effect of 3-O-glucosylation on structural transformations of anthocyanidins. *Food Research International*, 38, 1031–1037. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.02.020>
- Boyd, R. J. (2019). Theoretical and Computational Chemistry. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.11689-0>



- Brouillard R, D. B. (1977). Chemistry of anthocyanin pigments. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin 3-glucoside. *J Am Chem Soc*, 99(26), 8461–8.
- Cavalcanti, R. N., Santos, D. T., & Meireles, M. A. A. (2011). Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems-An overview. *Food Research International*, 44(2), 499–509. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.007>
- Dimitri, J. M., Baranac, J. M., & Brdaric, T. P. (2005). Electronic and infrared vibrational analysis of cyanidin – quercetin copigment complex. *Spectrochimica Acta Part A*, 62, 673–680. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2005.02.036>
- Ge, X., Calzolari, A., & Baroni, S. (2015). Optical properties of anthocyanins in the gas phase. *Chemical Physics Letters*, 618, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2014.09.025>
- Grajeda-Iglesias, C., Figueroa-Espinoza, M. C., Barouh, N., Barela, B., Fernandes, A., Freitas, V., & Salas, E. (2016). Isolation and Characterization of Anthocyanins from Hibiscus sabdariffa Flowers. *Journal of Natural Products*, 79, 1709–1718.
- Khan, H., Yerramilli, A. S., D'Oliveira, A., Alford, T. L., Boffito, D. C., & Patience, G. S. (2020). Experimental methods in chemical engineering: X-ray diffraction spectroscopy—XRD. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 98(6), 1255–1266. <https://doi.org/10.1002/cjce.23747>
- Maier, T., Fromm, M., Schieber, A., Kammerer, D. R., & Carle, R. (2009). Process and storage stability of anthocyanins and non-anthocyanin phenolics in pectin and gelatin gels enriched with grape pomace extracts. *European Food Research and Technology*, 229(6), 949–960. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1134-9>
- Milovanovic, B., Tomovic, V., Djekic, I., Miocinovic, J., Solowiej, B. G., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., & Tomasevic, I. (2021). Colour assessment of milk and milk products using computer vision system and colorimeter. *International Dairy*



- Journal*, 120, 105084. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105084>
- Mónica Giusti, M., & Wrolstad, R. E. (2005). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-visible Spectroscopy. *Handbook of Food Analytical Chemistry*, 2–2, 19–31. <https://doi.org/10.1002/0471709085.ch18>
  - Passos, M. L. C., & Saraiva, M. L. M. F. S. (2019). Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies. Name: Marieta L. C. Passos. *Measurement*, 135(0263–2241), 896–904. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2018.12.045>
  - Polette-Niewold, L. A., Manciu, F. S., Torres, B., Alvarado, M., & Chianelli, R. (2007). Ancient colors Maya Blue. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101, 1958–1973. <https://doi.org/10.2752/bewdf/edch2006>
  - Selene, A., Id, C. G., & Nora-ayde, S. (2018). Theoretical Characterization by Density Functional Theory (DFT) of Delphinidin 3-O-Sambubioside and Its Esters Obtained by Chemical Lipophilization. *Molecules*, 23, 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules23071587>
  - Silva, G. T. M., Silva, C. P., Gehlen, M. H., Oake, J., Bohne, C., & Quina, F. H. (2018). Organic/inorganic hybrid pigments from flavylum cations and palygorskite. *Applied Clay Science*, 162(June), 478–486. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2018.07.002>
  - 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>
  - 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., & Norio, S. (1977). Cyanidin Bromide Monohydrate (3, 5, 7, 3', 4'-Pentahydroxyflavylium Bromide Monohydrate). *Acta Cryst*, 8, 114–116.
- Ural, N. (2021). The significance of scanning electron microscopy (SEM) analysis on the microstructure of improved clay: An overview. *Open Geosciences*, 13(1), 197–218. <https://doi.org/10.1515/geo-2020-0145>
- Uzunova, E. L., & Mikosch, H. (2013). Adsorption and activation of ethene in transition metal exchanged zeolite clinoptilolite: A density functional study. *ACS Catalysis*, 3(12), 2759–2767. <https://doi.org/10.1021/cs4005997>
- Wang, X., Mu, B., Wang, W., Wang, Q., & Wang, A. (2019). A comparative study on color properties of different clay minerals/BiVO<sub>4</sub> hybrid pigments with excellent thermal stability. *Applied Clay Science*, 181(June), 105221. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.105221>



## APÉNDICES

### Anexo I

Validación de los métodos de Mecánica Molecular (MM) para la molécula de Cianidina y Delfinidina utilizando las distancias de enlace.

Distancias (Å)	Experimental*	UFF Cianidina	Dreiding Cianidina	UFF Delfinidina	Dreiding Delfinidina
C2-C1'	1.453	1.510	1.410	1.481	1.410
C4a-C5	1.432	1.486	1.429	1.486	1.429
C1'-C2'	1.409	1.355	1.407	1.343	1.407
C6-C7	1.413	1.477	1.418	1.477	1.419
C2-C3	1.396	1.507	1.422	1.491	1.424
C3'-C4'	1.400	1.346	1.406	1.351	1.406
C4-C4a	1.382	1.461	1.422	1.467	1.422
C6'-C1'	1.404	1.496	1.424	1.483	1.423
C4a-C8a	1.408	1.345	1.411	1.351	1.411
C7-C8	1.387	1.345	1.403	1.345	1.403
C4'-C5'	1.378	1.478	1.418	1.491	1.422
C8-C8a	1.376	1.479	1.414	1.478	1.414
C5'-C6'	1.383	1.338	1.402	1.345	1.404
C3-C4	1.380	1.337	1.404	1.335	1.403
C2'-C3'	1.371	1.479	1.420	1.478	1.419
C5-C6	1.366	1.345	1.405	1.345	1.405
C8a-O1	1.361	1.413	1.372	1.416	1.372
O1-C2	1.349	1.285	1.362	1.282	1.362
R <sup>2</sup>	-	0.184	0.300	0.139	0.291

\* Datos experimentales (Ueno & Norio, 1977)



**Anexo II. Validación de los métodos de Mecánica Molecular (MM) para la molécula de Cianidina y Delfinidina utilizando los ángulos de enlace.**

Ángulos	Experimental <sup>*</sup>	UFF Cianidina	Dreiding Cianidina	UFF Delfinidina	Dreiding Delfinidina
C2-C1'-C2'	119.4	118.7	120.1	120.1	120.2
C1'-C2-C3	129.2	124.0	123.1	120.2	123.0
C2-C3-C4	119.5	118.7	118.7	118.6	118.7
C3-C4-C4a	121.3	119.8	121.3	119.1	121.3
C4-C4a-C8a	118.4	118.3	117.8	118.5	117.8
C8a-C4a-C5	117.1	120.4	119.3	120.4	119.3
C4a-C5-C6	120.0	119.4	119.7	119.4	119.7
C5-C6-C7	120.0	120.5	120.6	120.6	120.6
C6-C7-C8	122.1	119.6	119.7	119.6	119.7
C7-C8-C8a	116.7	120.6	120.1	120.6	120.1
C8a-O1-C2	123.7	120.5	123.7	119.0	123.6
O1-C2-C1'	112.4	115.7	118.1	117.6	118.3
C1'-C2'-C3'	120.3	122.1	120.6	121.0	120.6
C2'-C3'-C4'	120.4	119.7	119.9	119.9	120.0
C3'-C4'-C5'	119.5	119.3	119.8	119.6	119.8
C4'-C5'-C6'	120.9	120.9	120.3	119.7	119.9
C5'-C6'-C1'	119.9	121.0	120.4	120.7	120.6
C6'-C1'-C2'	118.9	117.0	119.1	119.1	119.1
R <sup>2</sup>	-	0.538	0.604	0.091	0.575

\* Datos experimentales (Ueno & Norio, 1977)



**Anexo III. Validación de los métodos Semi-empíricos para la molécula de Cianidina y Delfinidina utilizando las distancias de enlace.**

Distancias (Å)	Experimental <sup>*</sup>	AM1 Cianidina	PM3 Cianidina	AM1 Delfinidina	PM3 Delfinidina
C2-C1'	1.453	1.434	1.448	1.443	1.445
C4a-C5	1.432	1.430	1.434	1.434	1.435
C1'-C2'	1.409	1.420	1.412	1.410	1.409
C6-C7	1.413	1.413	1.415	1.417	1.415
C2-C3	1.396	1.424	1.423	1.417	1.425
C3'-C4'	1.400	1.426	1.425	1.415	1.418
C4-C4a	1.382	1.409	1.407	1.404	1.407
C6'-C1'	1.404	1.412	1.405	1.409	1.407
C4a-C8a	1.408	1.418	1.420	1.420	1.418
C7-C8	1.387	1.408	1.405	1.405	1.404
C4'-C5'	1.378	1.406	1.404	1.413	1.416
C8-C8a	1.376	1.394	1.393	1.396	1.394
C5'-C6'	1.383	1.387	1.385	1.393	1.391
C3-C4	1.380	1.388	1.393	1.394	1.392
C2'-C3'	1.371	1.383	1.388	1.396	1.396
C5-C6	1.366	1.390	1.389	1.386	1.387
C8a-O1	1.361	1.384	1.372	1.380	1.370
O1-C2	1.349	1.368	1.347	1.368	1.349
R <sup>2</sup>	-	0.781	0.826	0.789	0.782

\* Datos experimentales (Ueno & Norio, 1977)



**Anexo IV. Validación de los métodos Semi-empíricos para la molécula de Cianidina y Delfinidina utilizando los ángulos de enlace.**

Ángulos	Experimental <sup>*</sup>	AM1 Cianidina	PM3 Cianidina	AM1 Delfinidina	PM3 Delfinidina
C2-C1'-C2'	119.4	119.3	120.0	119.0	121.0
C1'-C2-C3	129.2	128.2	127.3	128.1	127.3
C2-C3-C4	119.5	121.0	120.5	120.8	120.8
C3-C4-C4a	121.3	119.2	118.8	119.1	118.9
C4-C4a-C8a	118.4	118.9	118.6	119.0	118.5
C8a-C4a-C5	117.1	117.1	117.0	117.0	117.1
C4a-C5-C6	120.0	121.0	120.9	121.1	120.9
C5-C6-C7	120.0	119.5	119.6	119.4	119.6
C6-C7-C8	122.1	121.7	121.6	121.7	121.6
C7-C8-C8a	116.7	117.4	117.7	117.6	117.7
C8a-O1-C2	123.7	120.6	120.3	120.5	120.7
O1-C2-C1'	112.4	112.4	112.4	112.1	113.0
C1'-C2'-C3'	120.3	120.0	119.9	120.2	120.4
C2'-C3'-C4'	120.4	120.6	120.3	120.1	120.5
C3'-C4'-C5'	119.5	119.2	119.2	119.1	118.6
C4'-C5'-C6'	120.9	120.1	120.2	121.0	120.8
C5'-C6'-C1'	119.9	121.0	120.8	119.5	120.4
C6'-C1'-C2'	118.9	119.1	119.5	120.1	119.5
R <sup>2</sup>	-	0.890	0.872	0.884	0.870

\* Datos experimentales (Ueno & Norio, 1977)

**Anexo V. Validación del método *Ab-initio* para la molécula de Cianidina y Delfinidina utilizando las distancias de enlace.**

Distancias (Å)	Experimental <sup>*</sup>	HF/6-31G Cianidina	HF/6-31G Delfinidina
C2-C1'	1.453	1.440	1.437
C4a-C5	1.432	1.416	1.417
C1'-C2'	1.409	1.412	1.405
C6-C7	1.413	1.407	1.407
C2-C3	1.396	1.408	1.406
C3'-C4'	1.400	1.398	1.387
C4-C4a	1.382	1.407	1.406
C6'-C1'	1.404	1.404	1.409
C4a-C8a	1.408	1.392	1.393
C7-C8	1.387	1.384	1.385
C4'-C5'	1,378	1.383	1.388
C8-C8a	1.376	1.380	1.380
C5'-C6'	1.383	1.382	1.372
C3-C4	1.380	1.369	1.371
C2'-C3'	1.371	1.365	1.373
C5-C6	1.366	1.365	1.364
C8a-O1	1.361	1.364	1.362
O1-C2	1.349	1.343	1.343
R <sup>2</sup>	-	0.848	0.832

**\* Datos experimentales (Ueno & Norio, 1977)**

**Anexo VI. Validación del método *Ab-initio* para la molécula de Cianidina y Delfinidina utilizando los ángulos de enlace.**

Ángulos	Experimental <sup>*</sup>	HF/6-31G Cianidina	HF/6-31G Delfinidina
C2-C1'-C2'	119.4	118.4	118.2
C1'-C2-C3	129.2	130.0	130.0
C2-C3-C4	119.5	119.9	119.9
C3-C4-C4a	121.3	121.7	121.7
C4-C4a-C8a	118.4	118.2	118.2
C8a-C4a-C5	117.1	117.5	117.5
C4a-C5-C6	120.0	120.3	120.3
C5-C6-C7	120.0	119.7	119.7
C6-C7-C8	122.1	122.0	122.0
C7-C8-C8a	116.7	116.6	116.6
C8a-O1-C2	123.7	126.9	126.1
O1-C2-C1'	112.4	113.9	113.9
C1'-C2'-C3'	120.3	120.6	120.3
C2'-C3'-C4'	120.4	119.7	119.8
C3'-C4'-C5'	119.5	120.7	120.2
C4'-C5'-C6'	120.9	120.1	121.0
C5'-C6'-C1'	119.9	120.0	119.0
C6'-C1'-C2'	118.9	119.0	119.6
R <sup>2</sup>	-	0.927	0.942

**\* Datos experimentales (Ueno & Norio, 1977)**

**Anexo VII. Validación de los métodos de DFT para la molécula de Cianidina utilizando las distancias de enlace.**

Distancias (Å)	Experimental*	DFT:B3LYP/ 6-31G	DFT:B3PW91/ 6-31G	DFT: M06-2X/ 6-31G
C2-C1'	1.453	1.440	1.434	1.465
C4a-C5	1.432	1.429	1.426	1.451
C1'-C2'	1.409	1.423	1.420	1.424
C6-C7	1.413	1.415	1.413	1.430
C2-C3	1.396	1.420	1.418	1.443
C3'-C4'	1.400	1.416	1.414	1.438
C4-C4a	1.382	1.408	1.405	1.412
C6'-C1'	1.404	1.423	1.420	1.416
C4a-C8a	1.408	1.415	1.412	1.424
C7-C8	1.387	1.400	1.399	1.408
C4'-C5'	1,378	1.397	1.395	1.404
C8-C8a	1.376	1.388	1.386	1.401
C5'-C6'	1.383	1.391	1.389	1.393
C3-C4	1.380	1.388	1.387	1.398
C2'-C3'	1.371	1.380	1.379	1.389
C5-C6	1.366	1.380	1.379	1.386
C8a-O1	1.361	1.383	1.377	1.397
O1-C2	1.349	1.376	1.371	1.374
R <sup>2</sup>	-	0.871	0.869	0.852

\* Datos experimentales (Ueno & Norio, 1977)



**Anexo VIII. Validación de los métodos de DFT para la molécula de Cianidina utilizando los ángulos de enlace.**

Distancias (Å)	Experimental*	DFT:B3LYP/ 6-31G	DFT:B3PW91/ 6-31G	DFT: M06-2X/ 6-31G
C2-C1'-C2'	119.4	118.8	118.7	118.6
C1'-C2-C3	129.2	130.1	130.0	127.0
C2-C3-C4	119.5	120.5	120.3	118.8
C3-C4-C4a	121.3	121.4	121.4	120.9
C4-C4a-C8a	118.4	118.5	118.5	118.9
C8a-C4a-C5	117.1	117.2	117.3	117.7
C4a-C5-C6	120.0	120.4	120.3	119.8
C5-C6-C7	120.0	119.9	119.3	120.5
C6-C7-C8	122.1	121.8	121.8	121.1
C7-C8-C8a	116.7	116.9	116.9	117.9
C8a-O1-C2	123.7	125.1	125.2	120.7
O1-C2-C1'	112.4	113.6	113.5	112.6
C1'-C2'-C3'	120.3	120.5	120.5	119.9
C2'-C3'-C4'	120.4	119.7	119.6	119.2
C3'-C4'-C5'	119.5	120.6	120.6	120.9
C4'-C5'-C6'	120.9	120.0	120.0	119.4
C5'-C6'-C1'	119.9	120.1	120.1	120.4
C6'-C1'-C2'	118.9	119.0	119.1	120.2
R <sup>2</sup>	-	0.962	0.958	0.886

\* Datos experimentales (Ueno & Norio, 1977)

**Anexo IX. Validación de los métodos de DFT para la molécula de Delfinidina utilizando las distancias de enlace.**

Distancias (Å)	Experimental*	DFT:B3LYP/ 6-31G	DFT:B3PW91/ 6- 31G	DFT: M06-2X/ 6-31G
C2-C1'	1.453	1.440	1.433	1.463
C4a-C5	1.432	1.430	1.426	1.450
C1'-C2'	1.409	1.410	1.419	1.420
C6-C7	1.413	1.415	1.413	1.429
C2-C3	1.396	1.415	1.419	1.444
C3'-C4'	1.400	1.406	1.405	1.422
C4-C4a	1.382	1.404	1.406	1.413
C6'-C1'	1.404	1.408	1.424	1.421
C4a-C8a	1.408	1.408	1.412	1.424
C7-C8	1.387	1.401	1.399	1.408
C4'-C5'	1,378	1.405	1.403	1.422
C8-C8a	1.376	1.388	1.386	1.401
C5'-C6'	1.383	1.383	1.381	1.390
C3-C4	1.380	1.387	1.386	1.396
C2'-C3'	1.371	1.384	1.383	1.397
C5-C6	1.366	1.381	1.379	1.387
C8a-O1	1.361	1.383	1.378	1.398
O1-C2	1.349	1.359	1.371	1.375
R <sup>2</sup>	-	0.875	0.814	0.810

\* Datos experimentales (Ueno & Norio, 1977)



**Anexo 10. Validación de los métodos de DFT para la molécula de Delfinidina utilizando los ángulos de enlace.**

Distancias (Å)	Experimental*	DFT:B3LYP/ 6-31G	DFT:B3PW91/ 6- 31G	DFT: M06-2X/ 6-31G
C2-C1'-C2'	119.4	118.6	118.5	118.3
C1'-C2-C3	129.2	130.1	130.0	127.0
C2-C3-C4	119.5	120.7	120.4	118.9
C3-C4-C4a	121.3	121.4	121.4	120.9
C4-C4a-C8a	118.4	118.5	118.5	118.9
C8a-C4a-C5	117.1	117.2	117.3	117.7
C4a-C5-C6	120.0	120.4	120.3	119.8
C5-C6-C7	120.0	119.9	120.0	120.6
C6-C7-C8	122.1	121.8	121.8	121.1
C7-C8-C8a	116.7	116.9	116.9	117.9
C8a-O1-C2	123.7	125.1	125.2	120.7
O1-C2-C1'	112.4	113.6	113.6	112.7
C1'-C2'-C3'	120.3	120.4	120.4	120.5
C2'-C3'-C4'	120.4	119.6	119.6	118.5
C3'-C4'-C5'	119.5	120.3	120.4	121.1
C4'-C5'-C6'	120.9	121.0	120.9	120.3
C5'-C6'-C1'	119.9	119.0	119.0	118.9
C6'-C1'-C2'	118.9	119.6	119.7	120.8
R <sup>2</sup>	-	0.958	0.958	0.858

\* Datos experimentales (Ueno & Norio, 1977)

**Anexo XI. Validación de diferentes conjuntos bases para el método DFT: B3LYP para las distancias de enlace en la Cianidina**

Distancias (Å)	Experimental*	DFT:B3LYP/ STO-3G	DFT:B3LYP/ 3-21G	DFT:B3LYP/ 6-31G	DFT:B3LYP/ 6-311G
C2-C1'	1.453	1.470	1.433	1.440	1.434
C4a-C5	1.432	1.462	1.427	1.429	1.427
C1'-C2'	1.409	1.435	1.420	1.423	1.422
C6-C7	1.413	1.438	1.415	1.415	1.413
C2-C3	1.396	1.454	1.418	1.420	1.418
C3'-C4'	1.400	1.451	1.418	1.416	1.413
C4-C4a	1.382	1.419	1.402	1.408	1.406
C6'-C1'	1.404	1.432	1.418	1.423	1.421
C4a-C8a	1.408	1.441	1.409	1.415	1.412
C7-C8	1.387	1.423	1.398	1.400	1.398
C4'-C5'	1,378	1.417	1.391	1.397	1.394
C8-C8a	1.376	1.409	1.384	1.388	1.386
C5'-C6'	1.383	1.401	1.387	1.391	1.389
C3-C4	1.380	1.412	1.418	1.388	1.385
C2'-C3'	1.371	1.402	1.376	1.380	1.377
C5-C6	1.366	1.401	1.376	1.380	1.377
C8a-O1	1.361	1.416	1.380	1.383	1.383
O1-C2	1.349	1.398	1.374	1.376	1.377
R <sup>2</sup>	-	0.796	0.770	0.871	0.840

\* Datos experimentales (Ueno & Norio, 1977)



## Anexo XII. Validación de diferentes conjuntos bases para el método DFT: B3LYP para los ángulos de enlace en la Cianidina

Distancias (Å)	Experimental*	DFT:B3LYP/ STO-3G	DFT:B3LYP/ 3-21G	DFT:B3LYP/ 6-31G	DFT:B3LYP/ 6-311G
C2-C1'-C2'	119.4	119.2	118.3	118.8	118.8
C1'-C2-C3	129.2	127.3	129.1	130.1	130.2
C2-C3-C4	119.5	119.3	119.6	120.5	120.6
C3-C4-C4a	121.3	120.7	121.9	121.4	121.5
C4-C4a-C8a	118.4	119.0	118.7	118.5	118.6
C8a-C4a-C5	117.1	117.4	118.2	117.2	117.2
C4a-C5-C6	120.0	120.1	119.3	120.4	120.5
C5-C6-C7	120.0	120.4	121.1	119.9	119.8
C6-C7-C8	122.1	121.2	120.7	121.8	121.8
C7-C8-C8a	116.7	117.9	117.8	116.9	117.0
C8a-O1-C2	123.7	120.0	124.9	125.1	125.1
O1-C2-C1'	112.4	112.4	113.9	113.6	113.5
C1'-C2'-C3'	120.3	119.8	120.9	120.5	120.5
C2'-C3'-C4'	120.4	119.3	119.2	119.7	119.7
C3'-C4'-C5'	119.5	121.0	120.6	120.6	120.6
C4'-C5'-C6'	120.9	119.3	120.4	120.0	120.1
C5'-C6'-C1'	119.9	120.7	119.8	120.1	120.1
C6'-C1'-C2'	118.9	120.0	119.1	119.0	118.9
R <sup>2</sup>	-	0.863	0.926	0.962	0.962

\* Datos experimentales (Ueno & Norio, 1977)



### Anexo XIII. Validación de diferentes conjuntos bases para el método DFT: B3LYP para las distancias de enlace en la Delfinidina

Distancias (Å)	Experimental*	DFT:B3LYP/ STO-3G	DFT:B3LYP/ 3-21G	DFT:B3LYP/ 6-31G	DFT:B3LYP/ 6-311G
C2-C1'	1.453	1.468	1.431	1.440	1.434
C4a-C5	1.432	1.461	1.427	1.430	1.427
C1'-C2'	1.409	1.434	1.418	1.410	1.421
C6-C7	1.413	1.437	1.414	1.415	1.413
C2-C3	1.396	1.455	1.419	1.415	1.418
C3'-C4'	1.400	1.436	1.404	1.406	1.404
C4-C4a	1.382	1.421	1.403	1.404	1.407
C6'-C1'	1.404	1.437	1.424	1.408	1.426
C4a-C8a	1.408	1.440	1.409	1.408	1.412
C7-C8	1.387	1.423	1.398	1.401	1.398
C4'-C5'	1.378	1.437	1.402	1.405	1.402
C8-C8a	1.376	1.409	1.384	1.388	1.386
C5'-C6'	1.383	1.399	1.377	1.383	1.380
C3-C4	1.380	1.410	1.384	1.387	1.384
C2'-C3'	1.371	1.409	1.381	1.384	1.381
C5-C6	1.366	1.401	1.376	1.381	1.378
C8a-O1	1.361	1.416	1.381	1.383	1.383
O1-C2	1.349	1.400	1.375	1.359	1.378
R <sup>2</sup>	-	0.746	0.783	0.875	0.857

\* Datos experimentales (Ueno & Norio, 1977)



**Anexo XIV. Validación de diferentes conjuntos bases para el método DFT: B3LYP para los ángulos de enlace en la Delfinidina**

Distancias (Å)	Experimental*	DFT:B3LYP/ STO-3G	DFT:B3LYP/ 3-21G	DFT:B3LYP/ 6-31G	DFT:B3LYP/ 6-311G
C2-C1'-C2'	119.4	118.7	118.2	118.6	118.7
C1'-C2-C3	129.2	127.3	129.1	130.1	130.2
C2-C3-C4	119.5	119.5	119.7	120.7	120.7
C3-C4-C4a	121.3	120.7	121.9	121.4	121.4
C4-C4a-C8a	118.4	119.0	118.7	118.5	118.5
C8a-C4a-C5	117.1	117.4	118.2	117.2	117.2
C4a-C5-C6	120.0	120.1	119.3	120.4	120.5
C5-C6-C7	120.0	120.4	121.0	119.9	119.8
C6-C7-C8	122.1	121.1	120.7	121.8	121.8
C7-C8-C8a	116.7	118.0	117.8	116.9	117.0
C8a-O1-C2	123.7	120.0	124.9	125.1	125.1
O1-C2-C1'	112.4	112.5	114.0	113.6	113.6
C1'-C2'-C3'	120.3	120.8	120.7	120.4	120.4
C2'-C3'-C4'	120.4	118.2	118.9	119.6	119.7
C3'-C4'-C5'	119.5	121.0	121.0	120.3	120.3
C4'-C5'-C6'	120.9	120.6	120.7	121.0	121.0
C5'-C6'-C1'	119.9	118.7	119.1	119.0	119.1
C6'-C1'-C2'	118.9	120.7	119.6	119.6	119.5
R <sup>2</sup>	-	0.833	0.910	0.958	0.961

\* Datos experimentales (Ueno & Norio, 1977)



**Anexo XV. Validación de diferentes conjuntos bases para el método DFT: B3LYP para las distancias de enlace en la Cianidina**

Distancias (Å)	Experimental*	DFT:B3LYP/ STO-3G	DFT:B3LYP/ 3-21G	DFT:B3LYP/ 6-31G	DFT:B3LYP/ 6-311G
C2-C1'	1.453	1.470	1.433	1.440	1.434
C4a-C5	1.432	1.462	1.427	1.429	1.427
C1'-C2'	1.409	1.435	1.420	1.423	1.422
C6-C7	1.413	1.438	1.415	1.415	1.413
C2-C3	1.396	1.454	1.418	1.420	1.418
C3'-C4'	1.400	1.451	1.418	1.416	1.413
C4-C4a	1.382	1.419	1.402	1.408	1.406
C6'-C1'	1.404	1.432	1.418	1.423	1.421
C4a-C8a	1.408	1.441	1.409	1.415	1.412
C7-C8	1.387	1.423	1.398	1.400	1.398
C4'-C5'	1,378	1.417	1.391	1.397	1.394
C8-C8a	1.376	1.409	1.384	1.388	1.386
C5'-C6'	1.383	1.401	1.387	1.391	1.389
C3-C4	1.380	1.412	1.418	1.388	1.385
C2'-C3'	1.371	1.402	1.376	1.380	1.377
C5-C6	1.366	1.401	1.376	1.380	1.377
C8a-O1	1.361	1.416	1.380	1.383	1.383
O1-C2	1.349	1.398	1.374	1.376	1.377
R <sup>2</sup>	-	0.796	0.770	0.871	0.840

\* Datos experimentales (Ueno & Norio, 1977)



**Anexo XVI. Validación de diferentes conjuntos bases para el método DFT: B3LYP para los ángulos de enlace en la Cianidina**

Distancias (Å)	Experimental*	DFT:B3LYP/ STO-3G	DFT:B3LYP/ 3-21G	DFT:B3LYP/ 6-31G	DFT:B3LYP/ 6-311G
C2-C1'-C2'	119.4	119.2	118.3	118.8	118.8
C1'-C2-C3	129.2	127.3	129.1	130.1	130.2
C2-C3-C4	119.5	119.3	119.6	120.5	120.6
C3-C4-C4a	121.3	120.7	121.9	121.4	121.5
C4-C4a-C8a	118.4	119.0	118.7	118.5	118.6
C8a-C4a-C5	117.1	117.4	118.2	117.2	117.2
C4a-C5-C6	120.0	120.1	119.3	120.4	120.5
C5-C6-C7	120.0	120.4	121.1	119.9	119.8
C6-C7-C8	122.1	121.2	120.7	121.8	121.8
C7-C8-C8a	116.7	117.9	117.8	116.9	117.0
C8a-O1-C2	123.7	120.0	124.9	125.1	125.1
O1-C2-C1'	112.4	112.4	113.9	113.6	113.5
C1'-C2'-C3'	120.3	119.8	120.9	120.5	120.5
C2'-C3'-C4'	120.4	119.3	119.2	119.7	119.7
C3'-C4'-C5'	119.5	121.0	120.6	120.6	120.6
C4'-C5'-C6'	120.9	119.3	120.4	120.0	120.1
C5'-C6'-C1'	119.9	120.7	119.8	120.1	120.1
C6'-C1'-C2'	118.9	120.0	119.1	119.0	118.9
R <sup>2</sup>	-	0.863	0.926	0.962	0.962

\* Datos experimentales (Ueno & Norio, 1977)



**Anexo XVII. Validación de diferentes conjuntos bases para el método DFT:  
B3LYP para las distancias de enlace en la Delfinidina**

Distancias (Å)	Experimental*	DFT:B3LYP/ STO-3G	DFT:B3LYP/ 3-21G	DFT:B3LYP/ 6-31G	DFT:B3LYP/ 6-311G
C2-C1'	1.453	1.468	1.431	1.440	1.434
C4a-C5	1.432	1.461	1.427	1.430	1.427
C1'-C2'	1.409	1.434	1.418	1.410	1.421
C6-C7	1.413	1.437	1.414	1.415	1.413
C2-C3	1.396	1.455	1.419	1.415	1.418
C3'-C4'	1.400	1.436	1.404	1.406	1.404
C4-C4a	1.382	1.421	1.403	1.404	1.407
C6'-C1'	1.404	1.437	1.424	1.408	1.426
C4a-C8a	1.408	1.440	1.409	1.408	1.412
C7-C8	1.387	1.423	1.398	1.401	1.398
C4'-C5'	1.378	1.437	1.402	1.405	1.402
C8-C8a	1.376	1.409	1.384	1.388	1.386
C5'-C6'	1.383	1.399	1.377	1.383	1.380
C3-C4	1.380	1.410	1.384	1.387	1.384
C2'-C3'	1.371	1.409	1.381	1.384	1.381
C5-C6	1.366	1.401	1.376	1.381	1.378
C8a-O1	1.361	1.416	1.381	1.383	1.383
O1-C2	1.349	1.400	1.375	1.359	1.378
R <sup>2</sup>	-	0.746	0.783	0.875	0.857

\* Datos experimentales (Ueno & Norio, 1977)



**Anexo XVIII. Validación de diferentes conjuntos bases para el método DFT:  
B3LYP para los ángulos de enlace en la Delfinidina**

Distancias (Å)	Experimental*	DFT:B3LYP/ STO-3G	DFT:B3LYP/ 3-21G	DFT:B3LYP/ 6-31G	DFT:B3LYP/ 6-311G
C2-C1'-C2'	119.4	118.7	118.2	118.6	118.7
C1'-C2-C3	129.2	127.3	129.1	130.1	130.2
C2-C3-C4	119.5	119.5	119.7	120.7	120.7
C3-C4-C4a	121.3	120.7	121.9	121.4	121.4
C4-C4a-C8a	118.4	119.0	118.7	118.5	118.5
C8a-C4a-C5	117.1	117.4	118.2	117.2	117.2
C4a-C5-C6	120.0	120.1	119.3	120.4	120.5
C5-C6-C7	120.0	120.4	121.0	119.9	119.8
C6-C7-C8	122.1	121.1	120.7	121.8	121.8
C7-C8-C8a	116.7	118.0	117.8	116.9	117.0
C8a-O1-C2	123.7	120.0	124.9	125.1	125.1
O1-C2-C1'	112.4	112.5	114.0	113.6	113.6
C1'-C2'-C3'	120.3	120.8	120.7	120.4	120.4
C2'-C3'-C4'	120.4	118.2	118.9	119.6	119.7
C3'-C4'-C5'	119.5	121.0	121.0	120.3	120.3
C4'-C5'-C6'	120.9	120.6	120.7	121.0	121.0
C5'-C6'-C1'	119.9	118.7	119.1	119.0	119.1
C6'-C1'-C2'	118.9	120.7	119.6	119.6	119.5
R <sup>2</sup>	-	0.833	0.910	0.958	0.961

\* Datos experimentales (Ueno & Norio, 1977)