



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ANÁLISIS QUÍMICO DEL COLORANTE EXTRAÍDO DE
Commelina dianthifolia Delile COMO BASE PARA EL ESTUDIO
DE PATRIMONIO CULTURAL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q. ARACELI GABRIELA GALINDO RUIZ

TUTOR:

M. EN C. BALDOMERO ESQUIVEL RODRÍGUEZ
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

MÉXICO, D.F. MAYO, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

“ ANÁLISIS QUÍMICO DEL COLORANTE EXTRAÍDO DE
Commelina Dianthifolia Delile COMO BASE PARA EL
ESTUDIO DE PATRIMONIO CULTURAL ”

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q. ARACELI GABRIELA GALINDO RUIZ



TUTOR: M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez 2015

Presidente: Dr. Manuel Jiménez Estrada

Secretario: Dr. José Fausto Rivero Cruz

Vocal: Dr. José Luis Ruvalcaba Sil

Vocal: Dr. Enrique Ramón Ángeles Anguiano

Vocal: Dra Martha Lydia Macías Rubalcava

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 2-9 del
departamento de Productos Naturales del Instituto de
Química de la UNAM.

Tutor:

M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de maestría (No. becario 288742).

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas por darme los elementos para fortalecer mi formación académica y profesional.

Al Instituto de Química por darme el espacio y los recursos necesarios para la realización de este proyecto de investigación.

A mi tutor, el M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez, por su asesoría y apoyo brindado a lo largo de este proyecto.

A los miembros del jurado, Dr. Manuel Jiménez Estrada, Dr. José Luis Ruvalcaba Sil, Dr. Enrique Ramón Ángeles Anguiano, Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava y Dr. Fausto Rivero Cruz, por la revisión, comentarios y correcciones realizadas a este trabajo.

A los técnicos del Instituto de Química y del CCIQS por la realización de los diferentes análisis requeridos para la culminación de este estudio.

A la Bióloga Yareli Joselin Cadena Rodríguez del Herbario Nacional del Instituto de Biología de la UNAM por la determinación del ejemplar botánico.

Al Dr. Jesús Arenas y al técnico Ing. Mario Monroy Escamilla del Instituto de Física de la UNAM por la realización de los análisis de SEM-EDS.

A mis compañeras del Laboratorio 2-9 de Productos Naturales por la ayuda brindada y amena convivencia.

*Mi querido Théo:
Es todo un reto pintar la atmósfera, pero he descubierto
que cuando uno realmente quiere hacer algo, lo logra.*

Vincent van Gogh

Contenido

Abreviaturas	4
Introducción	6
Justificación	9
1 Antecedentes históricos	
1.1 Fuentes documentales prehispánicas y coloniales	10
1.2 Tradición oral y arte textil	13
1.3 <i>Matlalli</i> , un colorante azul en el México prehispánico	14
1.4 El colorante de la <i>Commelina</i> en el antiguo Japón	19
2 <i>Commelinacea</i>	
2.1 Características botánicas y etnobotánicas	23
2.2 Estudios fitoquímicos en <i>Commelinas</i>	26
3 Flavonoides	
3.1 Los flavonoides y el color en las flores	28
3.2 Las antocianinas	32
3.2.1 Características y propiedades químicas	32
3.3 Las flavonas	36
3.3.1 Características y propiedades químicas	36
3.4 Mecanismos de estabilización del color	37

3.5 Auto-asociación	38
3.5.1 Auto-asociación de antocianinas	38
3.5.2 Auto-asociación de flavonas	41
3.6 Apilamiento tipo “sándwich”	42
3.7 Co-pigmentación	44
3.8 Metalo-antocianinas	47
3.8.1 Commelinina	47
3.8.2 Protocianina	53
3.8.3 Protodelfina	56
3.8.4 Cianosalvianina	56
4 Objetivos del estudio	60
5 Procedimiento experimental y resultados	
5.1 Colecta	61
5.2 Preparación del ejemplar herborizado	62
5.3 Generalidades	63
5.4 Proceso de extracción del colorante	65
5.5 Estudios preliminares al extracto crudo	
5.5.1 Pruebas de solubilidad	66
5.5.2 Pruebas cromatografía en capa delgada	67
5.5.3 Estabilidad al cambio de temperatura	68
5.5.4 Estabilidad al cambio de pH	68
5.5.5 Espectroscopía	
5.6 Purificación del extracto crudo (Fraccionamiento primario)	70
5.6.1 Separación del colorante azul “purificado” (Fraccionamiento secundario)	73

5.7 Purificación de las fracciones moradas (Fraccionamiento secundario)	78
5.8 Purificación de las fracciones amarillas	81
5.9 Teñido del colorante natural en fibra de algodón	83
5.10 Análisis elemental por microscopía electrónica de barrido con detección de rayos-X (SEM-EDS)	84
6 Análisis y discusión de resultados	
6.1 Extracto crudo	88
6.2 Colorante azul “purificado”	97
6.3 Separación del colorante “purificado”	111
6.3.1 Muestra CC-1	111
6.3.2 Compuesto CC-2	113
6.3.3 Compuestos en CC-8	117
6.4 Fracciones moradas: Compuesto CA-A1	128
6.5 Fracciones amarillas: Compuesto V14	135
6.6 Datos espectroscópicos y espectrométricos	154
6.7 Fibra teñida	156
6.8 Comentarios para el estudio del colorante en patrimonio cultural	158
7 Conclusiones	160
Referencias	162

Abreviaturas

ATR	Reflexión Total Atenuada (<i>Attenuated Total Reflection</i>)
C ₁₈	Sílica gel octadecilsilanizada
CC	Cromatografía en columna
CCD	Cromatografía en capa delgada
CD	Dicroísmo Circular (<i>Circular Dichroism</i>)
CD ₃ OD	Metanol deuterado
d	Señal doble/doblete
DEPT 90/135	(<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer Angle 90/135</i>)
d.i.	Diámetro interno
dd	Señal doble de dobles
ddd	Señal doble de dobles de dobles
dt	Señal doble de triples
D ₂ O	Agua deuterada
DART	Análisis Directo en Tiempo Real (<i>Direct Analysis in Real Time</i>)
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EDS	Espectrometría de Energía Dispersiva de Rayos-X (<i>Energy Dispersive X-ray Spectrometry</i>)
EM	Espectrometría de Masas
ESI (-)/(+)	Ionización por Electro-spray en Modo negativo/positivo (<i>Electro-spray negative/positive mode</i>)
EtOH	Etanol
FAB (+)	Bombardeo Rápido de Átomos en Modo positivo (<i>Fast Atom Bombardment positive mode</i>)
FT-IR	Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier
HCl	Ácido clorhídrico
HMBC	Correlación Heteronuclear a través de Múltiples Enlaces (<i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i>)

HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
Hz	Hertz
H ₂ O	Agua
IE	Impacto electrónico
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
<i>k</i>	Constante de fuerza
m	Señal múltiple/multiplete
MALDI-TOF	Desorción/Ionización Láser Asistida por una Matriz-Tiempo de vuelo (<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of flight</i>)
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
P. f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
R. f.	Factor de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
s	Señal simple/singulete
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido (<i>Scanning Electron Microscopy</i>)
UV-vis	Espectroscopía Ultravioleta-visible
t	señal triple
TFA	Ácido trifluoroacético (<i>trifluoroacetic acid</i>)
δ	Desplazamiento químico
λ	Longitud de onda
[θ]	Elipticidad molar
⊙	Anillo aromático

INTRODUCCIÓN

México es poseedor de una gran herencia cultural, nuestros antepasados dejaron huella de su existencia a través de muchos objetos que han logrado preservarse hasta nuestros días. En estas piezas se guarda el conocimiento desarrollado por culturas mesoamericanas, y otras más sirven como testimonio de hechos con gran trascendencia histórica. Sin embargo, factores naturales como el tiempo, la humedad, la luz o factores humanos como asentamientos de ciudades, contaminación, guerras o simplemente restauraciones mal realizadas han provocado el deterioro de bienes culturales muebles e inmuebles.

El reconocimiento de la importancia del patrimonio cultural en la conformación de la identidad de los pueblos lleva a los gobiernos a institucionalizar y profesionalizar la restauración. La necesidad por preservar el patrimonio artístico y monumental es el punto de partida que abre un panorama de estudios interdisciplinarios muy interesante. La complejidad histórica, artística, física de los bienes culturales requiere para su comprensión del uso de una amplia variedad de especialidades técnicas y disciplinas académicas integradas y coordinadas, en el mejor de los casos, por restauradores¹.

Sin una investigación previa sería imposible todo esfuerzo serio por conservar o restaurar cualquier fragmento del patrimonio cultural y ésta puede ser clasificada como: investigación histórica, socioeconómica y científica o técnica. Para fines de este trabajo, se abordará la investigación científica o técnica, la cual tiene por objetivo adquirir el conocimiento de la composición, procedimientos de construcción, materiales empleados y del estado estructural en el que se encuentra situado para, a partir de eso, poder realizar una intervención con fines de conservación y/o restauración adecuados¹.

El estudio científico de una obra de arte comprende un vasto conjunto de métodos y técnicas, y la calidad de los resultados depende, en gran medida, de la formulación adecuada de preguntas a resolver. Hay que considerar que el análisis instrumental aislado puede llevar a falsas aseveraciones; por ello es indispensable realizar estudios de información interdisciplinaria que darán certeza y veracidad².

La búsqueda de información científica de los bienes culturales se apoya en tres ramas de estudio: la metrología, la holística y la caracterización de materiales. En la metrología se busca realizar mediciones en las obras o de sus proporciones (por ejemplo, el grosor, el color o la porosidad de una hoja de papel), o para hacer mediciones de las condiciones del medio ambiente que puedan afectar a las obras (humedad, temperatura, luz). En la holística se obtienen imágenes de un bien presentándolo de un modo distinto al que se percibe a simple vista, puede ser con el empleo de técnicas fotográficas, desde diferentes ángulos, imágenes captadas con microscopios o bien con diversas fuentes lumínicas (UV, infrarrojo, polarizada, rayos X, etc.). En la caracterización de materiales se analiza la composición química y estructural de áreas muy pequeñas de una obra².

Sin embargo, en la caracterización de la composición material existen limitaciones en estos análisis, principalmente en la toma de muestra. Para el estudio de un bien cultural lo primordial es optar por técnicas que puedan ser realizadas *in situ* ya que muchas veces no es posible obtener ni el más mínimo fragmento de una obra². Cuando es posible obtener una muestra de la obra, el proceso a seguir constituye todo un reto a vencer. El principal problema a enfrentar es la preparación de la muestra; muchas técnicas requieren de cantidades del orden de miligramos para poder realizarse y en la mayoría de éstas ya no es posible recuperar la muestra³. En muestras de origen orgánico, los tratamientos suelen ser más largos y complejos. Esto es debido a que las muestras de origen orgánico son más susceptibles a sufrir degradaciones causando la producción de otros compuestos químicos, dificultando así la identificación de los compuestos iniciales³. Es importante mencionar que para muchas técnicas en donde se analizan compuestos orgánicos requieren del empleo de

patrones o estándares. Es por ello que, los patrones constituyen un factor clave para la determinación de los compuestos que integran una muestra de una obra de arte o un bien cultural².

El presente trabajo representa una aportación al estudio del patrimonio cultural desde una perspectiva científica. La investigación aborda el estudio químico de un colorante natural azul empleado durante la época prehispánica y colombina, el cual era usado principalmente en la tinción de textiles y para la ilustración en láminas o documentos. Por lo que, este estudio está dirigido hacia la identificación de colorantes naturales en objetos de patrimonio cultural, en particular del colorante azul prehispánico conocido como *matlalli*.

En los primeros apartados de este trabajo se presentan los antecedentes históricos sobre empleo del colorante extraído de distintas especies de *Commelina sp.* en el México antiguo y el Japón de los siglos XVII-XIX; se mencionan las principales características botánicas y etnobotánicas del género *Commelina*; y se aborda la relación entre el color desarrollado por las flores con la naturaleza químicas de los compuestos presentes en el colorante de *Commelina sp.* A continuación, se expone la parte experimental en donde se describe el proceso desarrollado, los diferentes estudios realizados al colorante de las flores azules de los ejemplares de *Commelina dianthifolia* Delile y los resultados obtenidos. Se efectúa posteriormente una discusión y análisis de los resultados en la investigación, para finalizar con las conclusiones del proyecto y las perspectivas a futuro.

JUSTIFICACIÓN

Los colorantes naturales han sido empleados para dar color a muchos objetos como obras de arte, códices, textiles, murales y objetos artesanales. La variedad de materiales pictóricos es una prueba del gran desarrollo en las técnicas de fabricación que tenían las culturas mesoamericanas, de los recursos naturales disponibles en la época e inclusive el uso recurrente de ciertos materiales pictóricos dan información de los diferentes significados de acuerdo al contexto en donde éstos fueron empleados.

Hoy en día, el estudio interdisciplinario es empleado con mayor frecuencia para abordar problemáticas que no pueden ser resueltas si se ven desde una sola área. El estudio del patrimonio cultural desde la perspectiva científica ha contribuido en gran medida a descifrar algunas interrogantes que han quedado a la espera de ser resueltas. La información adquirida a través de diversos estudios científicos ha permitido tener una visión más clara y sólida respecto del pasado de un bien cultural, y como consecuencia de nuestra historia.

Gracias a la aportación de diferentes estudios científicos se conoce con más detalle los materiales y tecnologías desarrolladas por las culturas mesoamericanas, llegar a este conocimiento constituye un reto puesto que en la mayoría de los casos no se cuenta con fuentes de información documental que respalden dicha información. Es por ello que muchos estudios se enfocan primeramente en la caracterización de los materiales que constituyen un bien cultural, y hablando de materiales de origen orgánico, tener patrones de comparación resulta el punto clave para la identificación de éstos.

Capítulo

1 Antecedentes históricos

Las culturas mesoamericanas dejaron testimonio de su existencia a través de la construcción de majestuosas ciudades, la elaboración de magníficos textiles y objetos artesanales; conocimiento plasmado en diversos manuscritos, filosofía, prácticas religiosas, tradiciones, gastronomía, herbolaria, entre muchas cosas más, que han logrado conservarse hasta nuestros días⁴. Gracias a estas huellas, historiadores, antropólogos, arquitectos, restauradores y científicos, mediante una árdua labor, han podido reconstruir gran parte del pasado de estas culturas⁵.

1.1 Fuentes documentales prehispánicas y coloniales

Los códices prehispánicos son considerados como la principal fuente de información documental que se tiene de estas épocas; su creación respondía a diferentes propósitos como dar testimonio de algún hecho trascendental, legitimar la propiedad de alguna tierra, registrar la vida de algún personaje importante, etc. La mayoría de estos documentos fue destruida por acción de los conquistadores y la Iglesia; algunos fueron escondidos por los pobladores indígenas para evitar represiones por parte de la Inquisición del siglo XVI; y otros tantos fueron enviados por los españoles a Europa como “regalos exóticos” para la realeza. Muchos de estos códices se perdieron en el tiempo y la mayoría de los que se tiene conocimiento de su existencia pertenecen a colecciones de museos europeos⁶.

En la época posterior a la conquista también se elaboraron algunos códices o manuscritos para plasmar el pensamiento y modo de vida de los indígenas, relatar la historia de la conquista y describir los recursos naturales hallados en el nuevo mundo. Es importante mencionar que la elaboración de estos documentos fue un encargo de la Corona Española para tener un informe

detallado sobre las riquezas de las cuales se había hecho acreedora. A la Iglesia también le fue de gran utilidad, ya que investigar sobre las costumbres y vida de los indios le permitió acercarse a ellos y realizar su labor de evangelización⁶.

La principal fuente documental colonial que habla del conocimiento y forma de vida de los pueblos nahuas en la época prehispánica es la obra realizada por Fray Bernardino de Sahagún *Historia General de las cosas de Nueva España* o también conocido como *Códice Florentino*. Para relatar esto, Sahagún entrevistó a sabios nahuas nacidos antes de la Conquista y con ayuda de pintores y escribanos (*tlacuillos*), nacidos después de la Conquista y conocedores de la lengua castellana, plasmó el saber del pueblo nahua en una obra que abarca 12 libros. En ellos se abordan temas como: organización social y gobierno; dioses y prácticas religiosas; filosofía; astronomía; tradiciones y costumbres; los oficios y la gente; la naturaleza: animales, plantas y minerales; hasta finalizar con el relato de la Conquista española. Cada plana (hoja) del manuscrito comprende dos columnas: la primera, contiene la descripción en lengua castellana; y la segunda, en náhuatl; además de la inclusión de imágenes para ilustrar y complementar la información⁷ (Imagen 1).



Imagen 1. Página del *Códice Florentino* en donde se muestra la distribución en dos columnas del contenido (a la derecha en castellano y a la izquierda su traducción en náhuatl)⁸.

Además de Sahagún, otra fuente documental importante es la realizada por Francisco Hernández en *Historia Natural de Nueva España* (Imagen 2). Hernández, quien fuera protomédico e historiador de la Corona española, realizó entre los años 1571 y 1576 una expedición encomendada por el Rey Felipe II de España para reportar las riquezas naturales halladas en el Nuevo Mundo. En su trabajo, Hernández amplía la obra hecha por Sahagún elaborando una descripción botánica más detallada de la flora y fauna mexicana⁹.

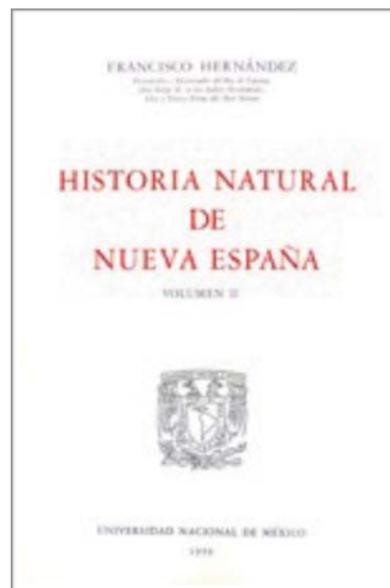


Imagen 2. Obra de Francisco Hernández *Historia Natural de Nueva España*¹⁰.

Dos siglos después, entre los años 1787 y 1803, el grupo de naturistas e historiadores encabezados por Martín de Sessé y José Mariano Mociño realizó una expedición desde territorio californiano y costas de Canadá y Alaska hasta Costa Rica. La expedición Sessé-Mociño, como se llamó posteriormente, emprendió un largo viaje para realizar un estudio más completo sobre la flora y fauna de México y Centroamérica. Como fruto de este trabajo, se publicó la obra *Flora Mexicana y Plantae Novae Hispaniae y Florae Guatimalensis*, en donde se estableció la nomenclatura científica linneana de 4000 especies y se elaboraron 1400 bocetos⁹.

Estas tres fuentes de información documental comprenden el punto de partida para el estudio de los materiales de pintura empleados durante la época precolombina. Estas obras permiten el seguimiento de especies vegetales y animales en el tiempo a través de su nombre

náhuatl, nombre común y/o por su clasificación científica. Es gracias a estas obras que hoy en día es posible asignar la fuente natural (animal, vegetal o mineral) de la cual puede estar constituido un bien cultural en el México antiguo¹¹.

1.2 Tradición oral y el arte textil

Como ya se ha mencionado, la tradición oral es una fuente de información indirecta. Gracias a esta práctica aún se conserva parte del conocimiento desarrollado por las culturas mesoamericanas. A lo largo de cinco siglos, la práctica oral ha podido preservar tradiciones y costumbres, saber herbolario, gastronomía, prácticas y oficios, etc¹.

El arte textil pertenece a las prácticas más antiguas e importantes heredadas de nuestros antepasados (Imagen 3). Las telas elaboradas por los pueblos nahuas eran reconocidas por su ostentabilidad y belleza¹². De acuerdo con Sahagún, la gente del pueblo mexica contaba con un guardarropa especial para los días de ceremonia o festejos; estas prendas requerían de un mayor cuidado en su elaboración y por tanto, para su elaboración se escogían materiales de alta calidad⁷. Mientras más elementos diferentes se emplearan para la manufactura de las prendas, mayor era el rango que el individuo tenía en la sociedad¹².

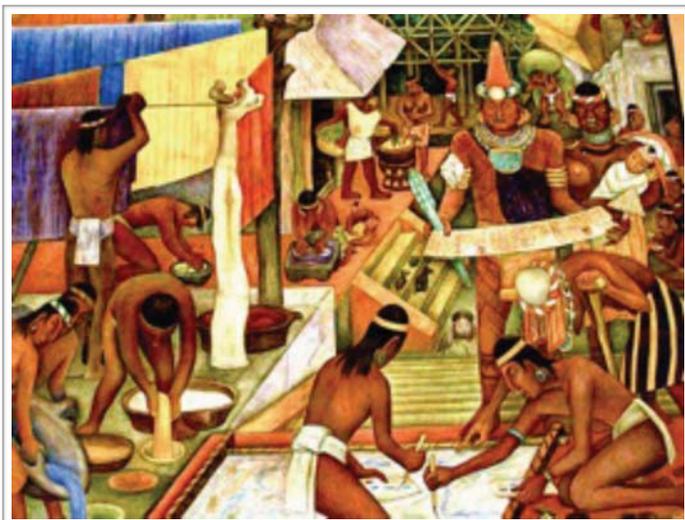


Imagen 3. *La cultura purépecha o tarasca de Michoacán* (fragmento), Diego Rivera, Palacio Nacional, México (1942-1945)¹³.

Para elaborar cualquier prenda lo primero a realizar era la preparación del tinte o colorante. Este material de pintura era preparado por el *tlahpaqui* o tintor y debía ser capaz de disolverse en agua. Los colorantes o tintes se podían obtener de fuentes minerales: pulverizando piedras, tierras o sales; de fuentes animales: como la tan popular grana cochinilla (nombre científico *Dactylopius coccus* y *nocheztli* en náhuatl) o el caracol púrpura (*Purpura pansa*, *Purpura patula*); y de fuentes vegetales: machacando flores, plantas o raíces para extraerles el color⁴ y ¹². Entre los materiales empleados a teñir se encontraban principalmente las fibras vegetales como el algodón, el henequén, el maguey y algunas palmas. En ocasiones, al hilo de algodón se le podía agregar plumón de ciertas aves o pelo de conejo, lo cual aumentaba el valor comercial de la prenda. Con la llegada de los españoles se incorporaron otras fibras de origen animal como la lana y la seda¹².

Posteriormente, se realiza el teñido de las fibras, las cuales han sido previamente hiladas, lavadas, y enrolladas en madejas para un manejo más fácil. Para poder fijar el color en las fibras, muchas veces éstas recibían un pre-tratamiento en un baño de agua con sales, como el *alumbre* ($\text{NaAl}(\text{SO}_4)_2$ y/o $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$), a este proceso se le conoce como *mordentado de la fibra*. La solubilidad del colorante en agua era esencial, puesto que el proceso de teñir consiste básicamente en preparar baños de agua en donde se agrega el colorante y se sumergen las madejas de hilo para que el color sea absorbido con facilidad. Existen varias técnicas para realizar el teñido de una fibra, éstas dependen principalmente de la naturaleza del colorante y de la fibra a teñir, y pueden variar según la época y la región en donde fue realizado el proceso. Una vez teñido el hilo, se procedía a realizar el tejido empleando un telar prehispánico, muy semejante al que se sigue empleando en algunas comunidades indígenas¹².

1.3 *Matlalli*, un colorante azul en el México prehispánico

De los diferentes colorantes empleados en la época prehispánica y colonial destaca la grana cochinilla y el índigo (*Dactylopius coccus* e *Indigofera suffruticosa*) por el gran impacto y éxito que éstos tuvieron al introducirse en el mercado mundial textil⁴ y ¹². Ambos colorantes tienen la característica de brindar colores muy intensos y duraderos empleando una menor cantidad de éstos en comparación con otros colorantes. Sin embargo, existen otros colorantes prehispánicos que no

lograron obtener tal éxito y que inclusive poco se sabe en la actualidad de la manera en cómo se elaboraban y utilizaban en el teñido de fibras o materiales pictóricos¹¹.

Uno de estos colorantes es el *matlalli*, el cual es extraído de las flores del *matlalín*, y que produce un color azul ultramar. La primera fuente documental que reporta la manera de prepararlo y su uso para el teñido de fibras es en la obra de Sahagún¹⁴. En el Libro XI, en el Capítulo denominado *Los colores de todas maneras*, Sahagún describe las principales materias (vegetales, animales y minerales) de donde se obtienen los colores y los usos que se le daban a éstos. Para el color azul existen tres colorantes: el *tlacehuilli* o añil, el *matlalli* y el *texotli*. Sobre estos colores los informantes de Sahagún narran lo siguiente:

Al color azul fino llaman matlalli, quiere decir azul. Hácese de flores azules, color (que) es muypreciado y muy apacible de ver, llámase también Cardenillo en lengua española ...Hay un color azul claro como el del cielo al cual llaman texotli, y xoxovic, es color muy usado en las ropas que se visten como mantas y uipilies: hácese de las mismas flores de las que se hace el matlalli¹⁴.

En la Imagen 4 se aprecia un fragmento del *Códice Florentino* en donde está descrita la elaboración del colorante *matlalli*. En la parte superior de la imagen se encuentra un boceto de la planta, donde se observa que ésta posee un tallo delgado, que tiene hojas delgadas y alargadas distribuidas por todo el tallo, y que presenta una flor mediana de cuatro pétalos. En el inferior de la imagen observamos otra ilustración en donde se ve a un joven *tlacuilo* empleando el colorante obtenido de la planta para dar color a un lienzo o manuscrito⁷.

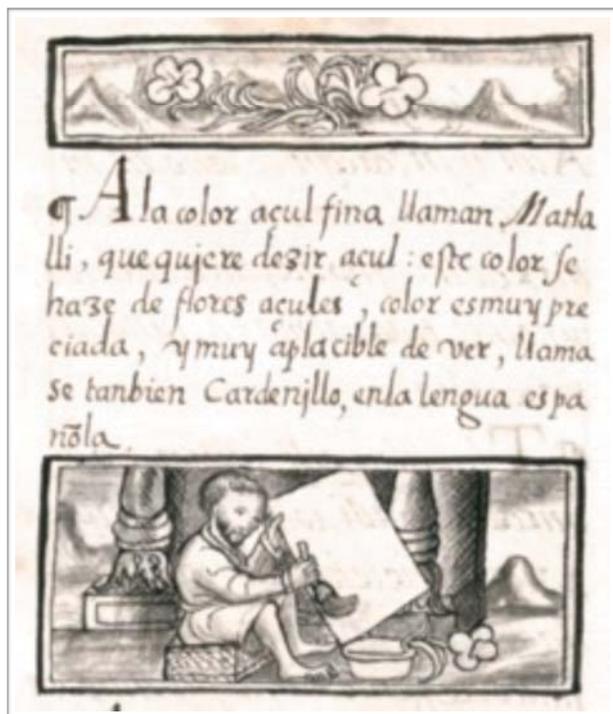


Imagen 4. Códice Florentino (detalle). En esta imagen se aprecia el párrafo dedicado al colorante *Matlalli*⁸.

Encontramos una segunda referencia a la planta *matlalín* en el libro duodécimo capítulo XXI *Del Matlalín* de la obra de Hernández¹⁵, cuya descripción de la planta se ajusta a la realizada por Sahagún¹⁴:

Es una hierba de dos codos de largo, raíces fibrosas, tallos cilíndricos y delgados, hojas delicadas, numerosas, y flores parecidas a violetas purpúreas y azules. Se remoja en agua por espacio de una hora, se exprime después, y con ese líquido se tiñen las lanas, según dicen, de color verdemar o azul. Llaman algunos a esta hierba matlalxóchitl¹⁵.

Los naturistas e historiadores Sessé y Mociño, consideran que la planta conocida en ese entonces como *matalín* y descrita por Hernández, es una *Commelina erecta*. Altamirano¹⁶ señala que este ejemplar pertenece a la familia *Commelinaceae* y posiblemente al género *Commelina*. Otros

autores como Cervantes¹⁷, Ramírez¹⁸, Toussaint¹⁹ y Miranda y Valdés²⁰ corroboran la clasificación taxonómica hecha por Sessé y Mociño.

Continuando con Hernández, en el libro décimo en el capítulo CX, reporta a la planta *matlalíztic tetzcocano* "... flores azules con forma de cáliz que brotan principalmente cerca del extremo de los tallos"¹⁵. La descripción de este ejemplar posee un boceto, cuya apariencia es muy similar a la observada en las plantas del género *Commelina* (Imagen 5).

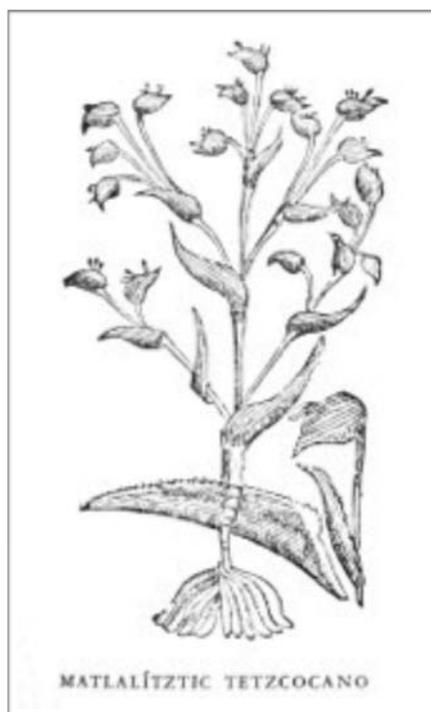


Imagen 5. Boceto del *Matlalíztic tetzcocano* en la obra de Francisco Hernández¹⁰.

Doscientos años después, Sessé y Mociño identifican a la planta del *Matlalíztic texcocano* como una *Commelina erecta*. Señalan que la planta también es conocida comúnmente por los indígenas como “hierba del pollo” y que habita en los jardines de San Ángel y en Virginia. Agregan que las flores hervidas en agua dan un color azul cerúleo con el que se tiñe el papel para fabricar flores y que justamente utilizaron este colorante para ilustrar las láminas dando un color nítido, particularmente en las imágenes de gorriones y flores²¹ (Imágenes 6-9). La colección de ilustraciones de la expedición Sessé-Mociño fue adquirida por el *Hunt Institute for Botanical Documentation* de la Universidad Carnegie-Mellon en Estados Unidos²².



Imagen 6. *Commelina erecta*. Fl. Mex. Ic. 19. Colección Torner 0197. Dibujo a lápiz y acuarela sobre papel; medidas 35 x 24 cm. **Imágenes 7-9.** *Aves del Reino de la Nueva España*. Colección Torner. (**Arriba, derecha**) Ilustración 0329, dibujo a acuarela sobre papel, 35 x 24 cm; a tinta *Corvus bicolor*. (**Abajo, izquierda**) Ilustración 0332, dibujo a acuarela sobre papel, 35 x 24 cm; a tinta *Corvus corax*. (**Abajo, derecha**) Ilustración 0333, dibujo a acuarela sobre papel, 30 x 21 cm; a tinta *Corvus coronatus*²³.

1.4 El colorante de la *Commelina* en el antiguo Japón

No sólo en el México antiguo se daba uso a las *Commelinas* como material de pintura, en el antiguo Japón también se colectaban las flores para obtener un colorante empleado principalmente para teñir telas y para la elaboración de los grabados en las estampas tradicionales japonesas²³. El escrito más antiguo que menciona el uso de este colorante para teñir telas es el *Man'yôshû* “Colección de la Miríada de hojas”, una famosa colección de poemas considerada como la más antigua existente y la de mayor relevancia histórica compilada entre los años 759-600 a. C. en Japón^{24 y 24}.

Aunque hay muchos nombres en varios dialectos japoneses para nombrar a la flor, el más empleado es el de *tsuyukusa* que quiere decir “flor azul”, nombre que también se emplea para llamar al colorante azul obtenido de las plantas de *Commelina*. Algunos autores señalan que las especies más utilizadas en Japón para la producción de este colorante son: *C. communis* var. *Ludens* y *C. communis* var. *Hortensis*^{24 y 25}.

Aún existen artesanos en Japón que se dedican a la producción del *tsuyukusa*. El método para producir este colorante azul es muy sencillo y parece no haber cambiado desde el periodo *Edo* (1603-1868). Este método consistía en colectar los pétalos de la planta (Imagen 10), posteriormente prensarlos para obtener un líquido azul (colorante) y aplicarlo directamente sobre una hoja gruesa de papel, la cual actúa como portador del colorante, y finalmente dejarlo secar (Imagen 11). Este papel portador es llamado *aobana-gami* “papel de flor azul” o *ai-gami* “papel azul”, el cual permite conservar el colorante y evitar que el color se degrade. Para recuperar el color, únicamente se humedecía el *aogami*, permitiendo la disolución del color nuevamente en agua, y se aplicaba posteriormente sobre alguna prenda para su tinción; o bien, ya disuelto en agua, se agregaba metanol para precipitar el colorante en forma de un polvo, se filtraba y finalmente se agregaba éter para asegurar un secado por completo²⁴. En la Imagen 12 se aprecia una estampa tradicional *ukiyo-e* en donde se muestra el proceso de fabricación del papel *aobanagami*²⁶.



Imagen 10. Mujer cosechando los pétalos de una *Commelina* (*dayflower*) como parte del proceso de fabricación del papel *aobanagami*²⁴.



Imagen 11. Proceso de elaboración del colorante azul *tsuyukusa*²⁴.



Imagen 12. Aobanagami, Utagawa, Hiroshige III, 1877, Provincia de Omi, Japón²⁶.

El colorante *tsuyukusa* es muy sensible a la más mínima presencia de luz y humedad. Los expertos en el arte de teñir sabían que, si las prendas teñidas con *tsuyukusa* eran expuestas a la luz del sol, perdían rápidamente su color tornándose color amarillo verdoso²⁴. Esta propiedad de poca

estabilidad en el color quedó como una marca distintiva tanto del colorante como de la flor, ya que el botón de ésta abre sólo una vez y durante un periodo de pocas horas²⁵. Con la llegada de nuevos colorantes como el índigo y el azul de Prusia para teñir las telas, el uso del *tsuyukusa* fue decayendo gracias a que estos nuevos colorantes eran, por mucho, resistentes a la luz y humedad²⁴.

Entre los siglos XVII y XIX, el colorante tomó un nuevo giro y se usó en la elaboración de las primeras estampas tradicionales en papel mejor conocidas como *ukiyo-e*²⁵. Debido a la intensidad y belleza del azul en el *tsuyukusa*, el colorante era empleado con recurrencia para dar color a las imágenes y el trazo de los caracteres japoneses²⁴. En la Imagen 13, se observa una de estas estampas tradicionales japonesas en donde el colorante azul usado en el kimono se cree proviene de una *Commelina*²⁵. A diferencia de otros colorantes empleados en papel y que al ser mojados por error dejan marca en el lugar donde fueron aplicados, el *tsuyukusa* “migra” a través de la hoja sin dejar marca del lugar por donde pasó. Esta propiedad de poca retención permite que el colorante sea identificado de manera visual por restauradores y conocedores de arte con mucha facilidad²⁴.



Imagen 13. *Dos muchachas en un pórtico*, Suzuki Harunobu, cerca de 1750²⁷.

En el Instituto de Arte de Chicago (CAI)²⁸ se realizó un estudio sobre los colorantes empleados en las estampas tradicionales de Japón. En este estudio se analizaron diversas estampas japonesas pintadas con el colorante de la *Commelina*, se observó que en donde debería de haber un sólo color azul muchas presentaban dos: un color azul y otro grisáceo. Para esclarecer el origen de estos dos colores en las estampas, se reprodujo el proceso de fabricación del *aobana-gami*, desde la recolección de las flores hasta la obtención del *aobana-gami* seco, y éstas finalmente se sometieron a un proceso de envejecimiento artificial. A grandes rasgos, se observó que un papel nuevo de *aobana-gami* produce un color azul intenso, muy similar al color de la flor fresca; mientras que en un *aobana-gami* envejecido artificialmente el color azul intenso va cambiando lentamente hasta obtenerse el azul grisáceo. Por lo tanto, la diferencia de colores vista en las estampas *ukiyo-e* puede ser explicada fácilmente por la degradación del colorante causada por el paso del tiempo.

En la actualidad es muy difícil ver los colores originales en las estampas tradicionales japonesas, en la mayoría de los casos el color azul del *tsuyukusa* se torna a un amarillo pálido debido a la gran susceptibilidad del colorante a la degradación²⁴. Estudios como el realizado por el CAI permitirían ayudar a conservadores y restauradores a realizar una evaluación del estado físico de las estampas tradicionales *ukiyo-e* y de otros posibles objetos culturales en donde se haya empleado el colorante de la *Commelina*.

Capítulo

2 *Commelinaceae*

2.1 Características botánicas y etnobotánicas

La familia *Commelinaceae* comprende alrededor de 7000 especies repartidas en 50 géneros y es reconocida principalmente por sus elementos ornamentales. Dentro de esta familia se encuentra el género *Commelina*, el cual incluye a más de 170 especies²⁹ distribuidas en su mayoría en los trópicos y subtropicos del globo terrestre³⁰; la mayoría de estas especies tuvieron su origen en el Viejo Mundo³¹.

La botánica describe a las especies del género *Commelina* como hierbas perennes o anuales, de raíces delgadas o tuberosas. El tamaño de la planta varía entre los 30 cm y 70 cm, posee generalmente tallos delgados, ramificados y dependiendo la especie, los tallos pueden crecer de forma erecta o postrados sobre la superficie. Las hojas son muy diversas: se les encuentra de manera ovalada-lanceolada, oblongas, agudas, estriadas, etc. Sus inflorescencias son terminales, solitarias o de cimas pareadas más o menos encerradas por una bráctea plegada. Flores bisexuales o polígamas de varios colores; en su mayoría suelen ser azules pero también se les puede encontrar en color violeta, morado, amarillo o blanco; sépalos 3, libres y desiguales; pétalos 3, libres, generalmente los dos superiores son más grandes en tamaño que el tercero, raramente se encuentran especies en donde todos los pétalos presenten el mismo tamaño; estambres fértiles 3; fruto seco^{30 y 32}.

Las flores de las *Commelinas* son muy llamativas para los insectos. Se ha visto que la polinización de las *Commelinas*, en especial de *C. coelestis* y *C. dianthifolia*, depende de las características visuales de la flor para atraer a insectos polinizadores³³. El aparato reproductor

masculino de la flor está conformado por 3 estambres fértiles (un estambre medio y dos laterales) y 3 estaminodios con anteras cruciformes^{30 y 33} (Imagen 14). Los estaminodios son visiblemente claros y cuentan con un color muy llamativo (amarillo para *C. dianthifolia*); éstos únicamente producen un poco de polen infértil y su función es para simular grandes cantidades de polen y dirigir la atención de los insectos visitantes al centro de la flor. Por otro lado, los estambres laterales y el estambre medio producen polen de manera normal, pero no son tan atractivos visualmente como los estaminodios.

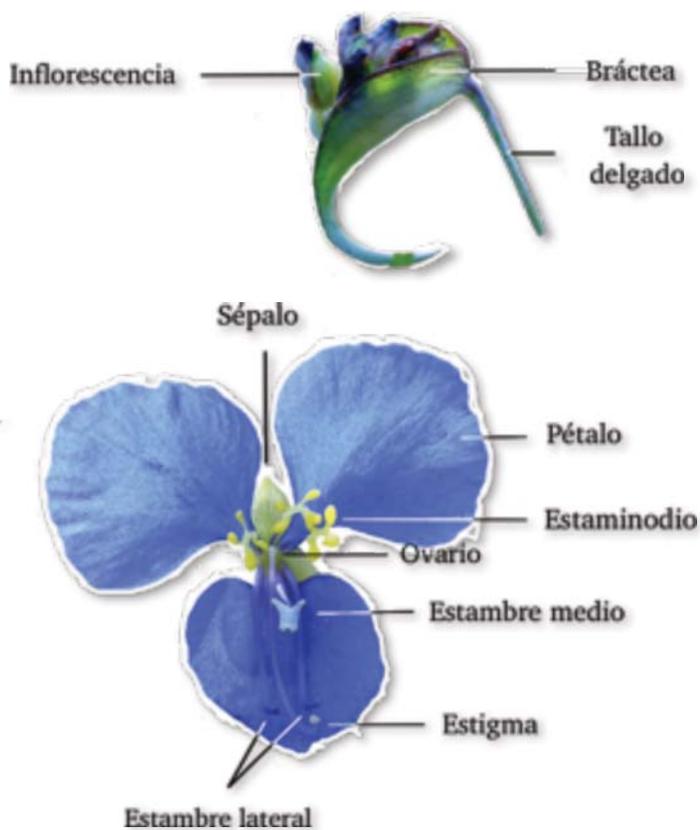


Imagen 14. Órganos sexuales de una flor de *Commelina*³⁴.

El propósito de este arreglo es que la parte superior del cuerpo del insecto llegue a los estaminodios y tome el polen poco fértil de éstos, mientras que, los estambres estarán impregnando el abdomen de los insectos con polen fértil. Los aparatos reproductores femeninos (estigma y

ovario) son muy largos y están alejados de los estambres, lo cual dificulta que la planta sea polinizada por sí misma. El mecanismo de polinización desarrollado por la planta, permite que el insecto portador de polen fertilice a flores vecinas en su siguiente visita³⁴ (Imagen 15).



Imagen 15. Abeja recolectando el polen en la flor de una *Commelina* sp³⁴.

Las *Commelinas* crecen fácilmente en los suelos urbanos y con frecuencia colonizan jardines abandonados. Se desarrollan en lugares con exposición moderada al sol, con sombras parciales o ligeramente sombrías. Su hábitat abarca zonas de matorrales o pastizales; se distribuyen en regiones tropicales y subtropicales; y crecen regularmente en suelos húmedos³⁵.

En México podemos encontrar alrededor de 16 especies del género *Commelina*, entre las principales se encuentran: *C. coelestis*, *C. tuberosa*, *C. diffusa*, y *C. erecta*. La mayoría de estas especies tienen flores color azul y en algunos casos se ha llegado a encontrar ejemplares con flores blancas, violetas y rosadas³⁶. Posee varios nombres comunes como “canutillo”, “hierba del pollo” o “tripa de gallina” y su uso común es esencialmente en remedios tradicionales. En Puebla, se emplea a la *C. coelestis* como remedio para aliviar las agruras mediante la ingesta de las aguas de cocción de las ramas de la planta. También se le utiliza en afecciones de los ojos, como la conjuntivitis, aplicando la inflorescencia directamente en los ojos. En Hidalgo, se ocupa la cocción de toda la

planta contra el ardor de espalda y el raquitismo; se emplea también como desinflamatorio y para tomar baños posparto. Y en Sonora se usa la hoja en heridas y hemorragias³⁷.

En el mundo, las *Commelinas* se encuentran especialmente distribuidas en Asia y Africa, siendo en Asia la *C. communis* Linn., *C. benghalensis* Linn. *C. diffusa* y *C. paludosa* las más comunes; mientras que en África es la especie más habitual es la *C. africana*³². La especie *C. africana* tiene como peculiaridad presentar una flor amarilla³²; en Kenia, Uganda y Tanzania, las hojas de esta planta, al igual que la especie asiática *C. benghalensis*, se consideran como comestibles. En Kenya, se preparan infusiones de *C. africana* para hacer lavados corporales y disminuir la fiebre, y los tallos se emplean para tratar resfriados y gripe en niños. La cocción de las raíces de la planta se emplea para tratar espasmos, cólicos menstruales y enfermedades venéreas³⁸.

2.2 Estudios fitoquímicos en *Commelinas*

Son pocos los estudios fitoquímicos realizados a las especies de *Commelinas*, sin embargo, la información obtenida de estos análisis ha permitido la obtención de un perfil químico del género. En él se ha encontrado una gran variedad de compuestos, entre los que se incluyen principalmente: flavonoides, carbohidratos, alcaloides, triterpenos, esteroides, taninos, saponinas, lignanos, glicósidos, resinas, ácidos alifáticos, aceites volátiles entre muchos otros^{39, 39 y 40}.

Harborne reporta el resultado del análisis de las hojas de 152 especies de la familia de las Commelináceas y observa en ella un patrón uniforme en donde predominan las C-glucosilflavonas y los glicósidos de flavonoles (78% de las especies los contienen), y en donde la quercetina actúa como base en la mayoría de estos flavonoides (28% de las especies). Así también, el autor señala que el género *Commelina* es distinguido entre otros géneros por la presencia del compuesto malonilwobanina, el cual aparece en sistemas vivos formando un compuesto de coordinación con magnesio y al mismo tiempo un co-pigmento con flavonas. La presencia de C-glucosilflavonas y la existencia ocasional de tricinas, 6-hidroxluteolina y flavonas sulfatadas unen a la familia *Commelinaceae* con las familias *Poaceae* y *Cypareaceae*. El autor concluye que, la naturaleza química

tan particular de las antocianinas encontradas en hojas y pétalos, permiten que la familia *Commelinaceae* sea bien distinguida tanto taxonómicamente como químicamente⁴¹.

En otro estudio similar realizado por Zantovska y Harborne, se analizaron 28 ejemplares de 10 géneros de la familia de las Commelináceas en donde se encontró un pigmento en común. Los resultados de este estudio muestran que todos los géneros, excepto el género *Commelina*, contienen una cianidina acetilada 3,7,3'-triglucósida como pigmento mayoritario; mientras que las 7 especies de *Commelinas* contenían al pigmento 3-(*p*-cumaroilglucosil)-5-glucosil delfinidina⁴².

Con base en la información de estos estudios es de intuirse que, las antocianinas identificadas en las diferentes especies del género *Commelina* y que no están presentes en las especies de otros géneros dentro de la misma familia de las *Commelinaceae*, conforman los compuestos para un posible marcador químico.

3 Flavonoides

3.1 Los flavonoides y el color en las flores

El color de las flores es el resultado de la absorción preferencial de una parte del espectro de luz visible por uno o más compuestos químicos sintetizados por las plantas superiores. Las plantas no pueden “ver” por sí mismas sus propios colores, por lo que es razonable pensar que los distintos colores de las flores sirven como un mecanismo de comunicación para mandar mensajes interpretables a mamíferos, aves e insectos. El color en las plantas es una manifestación de éstas para crear una conexión entre ellas y el medio que las rodea, así como también lo es la forma de sus flores, su esencia y en algunas ocasiones su sabor. Sin lugar a duda, el desarrollo del color en las flores tiene como propósito principal la atracción de insectos y aves para llevar a cabo la polinización de la planta y poder así preservar la especie⁴³.

Los compuestos responsables del color de las flores (también llamados colorantes) están localizados regularmente en las vacuolas dentro de la célula y regularmente son clasificados con base en su estructura química. Los principales grupos de compuestos colorantes en las plantas son: bases de porfirina (clorofila), carotenoides (β -caroteno), flavonoides (flavonoles, flavonas y antocianinas) y betalaínas (betanina)⁴⁴. Químicamente, estos grupos son muy diferentes, sin embargo, pueden llegar a producir colores muy parecidos. De estos grupos, los flavonoides constituyen los compuestos más comunes y más importantes entre los colorantes de las flores⁴⁴.

Los flavonoides constituyen un grupo de compuestos con gran diversidad estructural. Actualmente, se conocen cerca de 3000 de estos compuestos⁴⁴. Se dividen químicamente en diferentes grupos: flavonoles, flavonas, flavanonas, antocianinas, auronas, chalconas, isoflavonas,

neoflavonoides, entre otros. De estos grupos, las antocianinas producen la mayoría de los colores rosas, naranjas, rojos, violetas y azules en las flores; las chalconas, auronas y algunos flavonoles y flavonas contribuyen al color amarillo en las flores; los flavonoides restantes son incoloros a la vista humana, pero pueden llegar a ser visibles para algunos insectos^{44 y 45}.

Existen varios factores que influyen en la coloración de las flores producida por los flavonoides. El patrón de sustitución del esqueleto flavonoide, por ejemplo, puede modificar el tono o brillantez del color⁴⁴. Igualmente, se ha encontrado que algunas antocianinas presentan interacciones a nivel molecular entre las ellas mismas y otros constituyentes como las flavonas, los flavonoles y sus glicósidos, azúcares, péptidos, ácidos orgánicos e iones metálicos, para poder producir colores como el naranja, violeta y azul^{44 y 45}.

La biosíntesis de todos los flavonoides tiene un origen mixto, el cual culmina con la formación del esqueleto central del intermediario de 15 carbonos conocido como chalcona (Figura 1). La formación de esta molécula de chalcona es la clave en la biosíntesis de todos los flavonoides y está mediada por la enzima chalcona-sintasa^{45 y 46}.

Existen dos precursores en la formación de los flavonoides: la malonil-CoA y la 4-cumaril-CoA, y ambos precursores se derivan de los carbohidratos. El anillo B y parte del anillo heterocíclico del esqueleto flavonoide se derivan del sustrato 4-cumaril-CoA mediante la ruta del ácido shikímico y el anillo A del esqueleto flavonoide proviene de la ruta de la malonil-CoA^{44, 45 y 47}. En este proceso de biosíntesis se sustenta el hecho de que en la mayoría de los flavonoides el anillo A es *meta* oxigenado y, por otro lado, el anillo B proveniente de la ruta de ácido shikímico es generalmente *orto* oxigenado⁴⁵. En la Figura 2 se muestra el esqueleto flavonoide conformado por dos anillos aromáticos de seis carbonos (C₆) unidos por una cadena alifática de tres carbonos (C₃), así como la numeración designada para nombrar a los flavonoides⁴⁴.

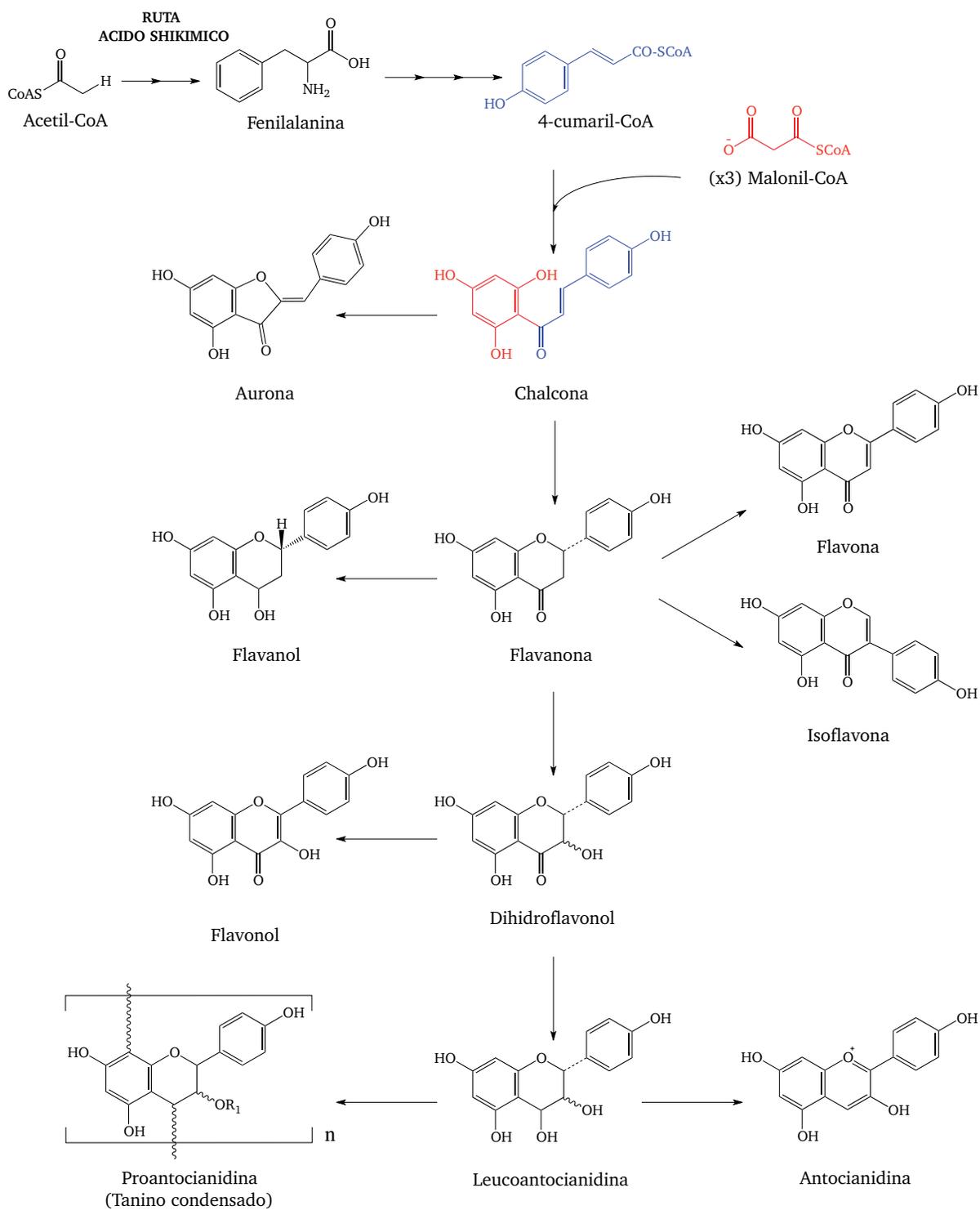


Figura 1. Esquema de la biosíntesis de los flavonoides⁴⁷.

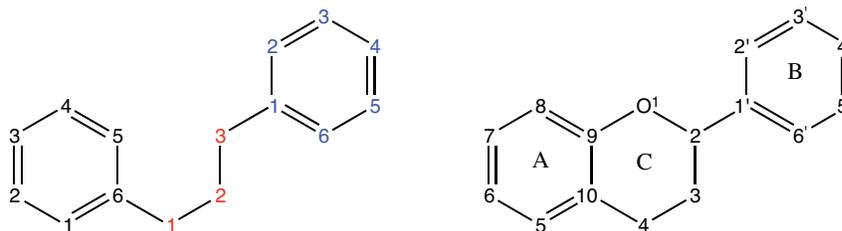


Figura 2. Esqueleto flavonoide C₆C₃C₆ (izquierda) y regla de numeración en una molécula flavonoide (derecha)⁴⁴.

Naturalmente, estos polifenoles pueden existir como *C*-glicósidos o como *O*-glicósidos^{44 y 45}. Los *O*-glicósidos normalmente tienen una o más unidades de azúcar unidas a los grupos hidroxilos de las agliconas mediante la formación de un enlace C-O-C, el cual es lábil en medio ácido. En contraste, los azúcares de los *C*-glicósidos están enlazados a un átomo de carbono del esqueleto de la aglicona mediante la formación de un enlace C-C, dándole resistencia a la hidrólisis ácida. En la actualidad, se ha encontrado que la *C*-glicosidación se da únicamente en las posiciones C-6 y C-8 del núcleo flavonoide⁴⁴.

Los flavonoides usualmente existen en la naturaleza como mezclas complejas. La mayoría de los métodos analíticos para el estudio de extractos naturales que contienen polifenoles se basan desde el uso de técnicas convencionales como la Cromatografía en Columna (CC), espectroscopías de UV-vis, FT-IR y RMN hasta el uso de equipos analíticos más sofisticados como la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (*High Liquid Performance Chromatography*), Cromatografía de Gases (CG) o Electroforesis Capilar (EC). Estas técnicas se limitan a la detección de compuestos conocidos, dejando pendiente la caracterización de los compuestos que no han sido reportados en las bases de datos. Sin embargo, con el desarrollo de nuevas técnicas de ionización en espectrometría de masas y el avance en el acoplamiento entre los diferentes equipos analíticos, en particular el acoplamiento de HPLC-MS y GC-MS, se ha logrado grandes avances en el análisis e identificación de una gran variedad de polifenoles, y en general, de muchos compuestos en muestras complejas⁴⁷.

3.2 Las antocianinas

Las antocianinas (del latín *anthos* = flor y *kianos* = azul) conforman el grupo de colorantes naturales solubles en agua y visibles al ojo humano más importante. Con pocas excepciones, como las betalainas, son los colorantes universales para producir colores como el rojo, naranja, violeta y azul en los pétalos de las flores y frutos, en algunos casos se les puede encontrar acumulados en las vacuolas de células epidérmicas o subepidérmicas de raíces, ramas y hojas⁴⁸.

3.2.1 Características y propiedades químicas

Una característica importante de las antocianinas es su actividad antioxidante, la cual juega un papel vital en la prevención de enfermedades cardiovasculares y neuronales; se ha demostrado su capacidad para detener la apoptosis de las células⁴⁹; y hay indicios de que la ingesta de alimentos que tienen un alto contenido en antocianinas puede ayudar a combatir el daño oxidativo de las células mediante la neutralización de los radicales libres. Diversas investigaciones reportan efectos importantes en tratamientos contra el cáncer^{50 y 51}, nutrición humana⁵², y actividad biológica⁵³, lo cual ha llevado a desarrollar nuevos métodos de identificación y caracterización de estas moléculas.

Las antocianinas son moléculas conformadas por dos tipos de unidades: un núcleo flavonoide (antocianidina) y una o más unidades de azúcar. Las antocianidinas son las agliconas de las antocianinas y dentro del proceso de biosíntesis de flavonoides involucran más pasos para su formación^{45 y 47} (Figura 1). Estructuralmente, la cadena alifática del esqueleto flavonoide $C_6C_3C_6$ se modifica para formar un anillo heterocíclico (anillo C), mientras que los anillos A y B sufren una serie de reacciones de oxidación y deshidratación catalizadas por enzimas para producir los distintos patrones de hidroxilación⁴⁵. El patrón propio de cada antocianina es muy importante ya que produce los colores tan característicos y determina su capacidad antioxidante⁴⁴.

En la naturaleza, pocas veces se encuentran en forma de agliconas, siendo las más comunes la pelargonidina, cianidina, peonidina, delfinidina y malvinidina (Tabla 1). Por el contrario, las

antocianinas más distribuidas en la naturaleza son aquellas que cuentan con unidades de azúcar unidas a la posición C-3 y/o C-5 del esqueleto flavonoide⁴⁹. Como ejemplo representativo se muestra en la Figura 3 las estructuras para una antocianidina, la pelargonidina, y su glucósido con la unidad de azúcar unida a la posición 3, la 3-O-pelargonidina⁴⁴.

Tabla 1. Patrón de sustitución de las principales antocianidinas⁴⁴ (agliconas).

Nombre	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Color
Posición	C-3'	C-4'	C-5'	C-3	C-5	C-7	-
Pelargonidina	H	OH	H	OH	OH	OH	-
Cianidina	OH	OH	H	OH	OH	OH	Naranja-Rojo
Peonidina	OMe	OH	H	OH	OH	OH	Naranja-Rojo
Delfinidina	OH	OH	OH	OH	OH	OH	Azul-Rojo
Malvinidina	OMe	OH	OMe	OH	OH	OH	Azul-Rojo

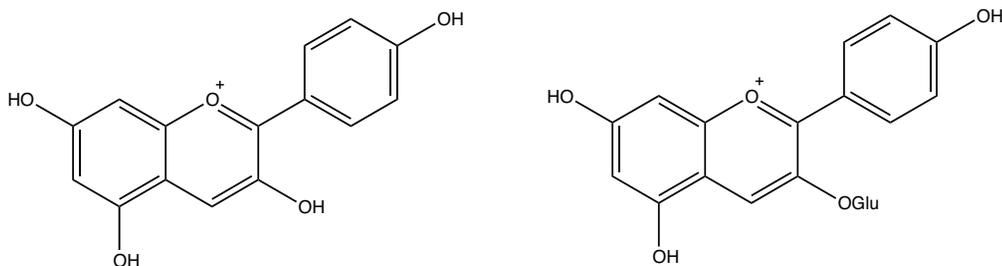


Figura 3. Pelargonidina, una antocianidina (aglicona) y la 3-O-pelargonidina, una antocianina (glucósido)⁴⁴.

A pesar de que un número considerable de antocianinas naturales fue reportado en años pasados, se conocía poco de la estructura original de éstas. La determinación estructural de las antocianinas se llevaba a cabo mediante su fragmentación empleando reacciones de hidrólisis o de degradación oxidativa, y posteriormente, dichos fragmentos eran estudiados y elucidados de manera separada⁴⁴. Esta forma de analizar a las antocianinas provocaba una pérdida de

información; se conocía poco de la configuración en el centro anomérico y el tamaño de los anillos de las unidades de azúcar, los sitios de enlace de los grupos acilo y la configuración *cis* o *trans* del doble enlace en el caso de los derivados del ácido cinámico. Con el avance en la Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Masas, ahora la elucidación de dichas estructuras se puede realizar íntegramente⁴⁹.

Las antocianinas que logran ser aisladas son muy inestables en comparación con otros flavonoides y fácilmente susceptibles a la degradación. Su estabilidad se ve afectada por diferentes factores como el pH, la temperatura, concentración, exposición a la luz y oxígeno, disolventes, presencia de enzimas, proteínas e iones metálicos⁵⁴. El color producido por estas moléculas fue explicado por Pauling en 1939, proponiendo que las estructuras resonantes del ión flavilium en medio ácido eran el origen de la intensidad de su color⁴⁶.

Las antocianinas presentan varias estructuras químicas dependiendo del pH de la disolución en la cual se encuentren (Figura 4). En disoluciones ácidas (pH 1 a 3) el ión flavilium AH^+ es la especie predominante y produce un color rojizo o naranja en la disolución; las antocianinas presentan gran estabilidad en medios ácidos. En disoluciones moderadamente ácidas o neutras (pH entre 4 y 7), se forma inmediatamente la anhidrobase A produciendo un color azul/violeta, esta disolución rápidamente se decolora debido a la formación de la pseudobase B; la causa de este comportamiento es debido a la existencia de un proceso cinético lento (reacción de hidratación) que compite con la transferencia de protón; en otras palabras, A se forma en un primer paso, pero en un paso subsecuente se convierte en B pasando por AH^+ . El equilibrio final se alcanza en una reacción aún mas lenta para formar una pequeña cantidad de una *trans*-chalcona de color amarillo pálido. En disoluciones básicas, las antocianinas se degradan; en el caso más simple, una chalcona libre de unidades de azúcar en la posición C-3 produce un aldehído y un ácido fenólico⁴⁹ (Figura 5).

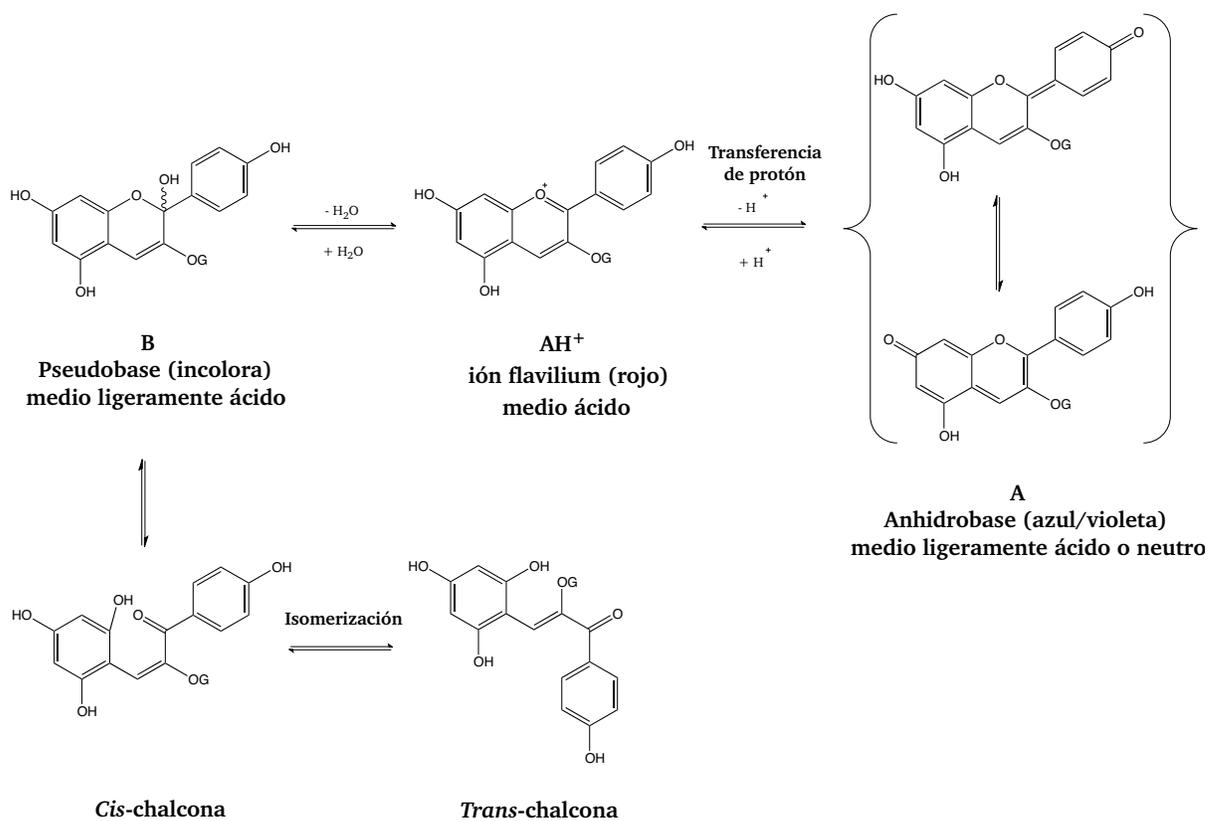


Figura 4. Cambios estructurales de las antocianinas en disolución acuosa en función del pH⁴⁹.

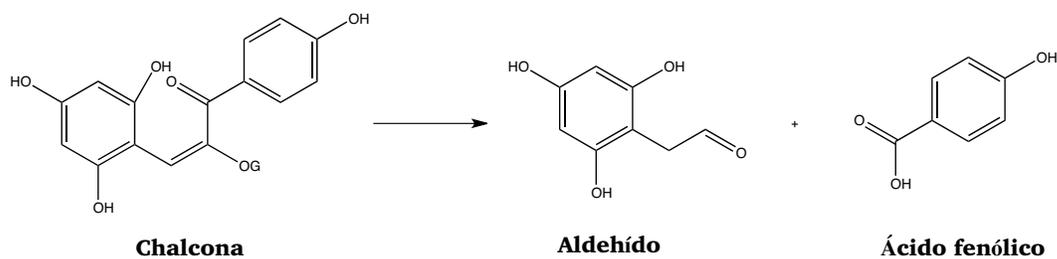


Figura 5. Reacción general de degradación de las antocianinas (chalconas)⁴⁹.

3.3 Las flavonas

Las flavonas y los flavonoles (del latín *flavus* = amarillo) son los compuestos principales entre los colorantes naturales amarillos y/o naranjas en hojas, flores y frutos. De las distintas clases de compuestos en la naturaleza basados en un esqueleto flavonoide, las flavonas y los flavonoles son el grupo más abundante⁴⁴.

3.3.1 Características y propiedades químicas

La principal diferencia entre las flavonas, flavonoles y antocianinas es su estructura química: las flavonas y flavonoles tienen una estructura más oxidada que las antocianinas debido a la presencia de un carbonilo en la posición C4. Mientras que la diferencia entre flavonas y flavonoles es arbitraria, ya que los flavonoles son simplemente una clase de flavona en donde la posición C-3 está sustituida por un grupo hidroxilo⁴⁴ (Figura 6).

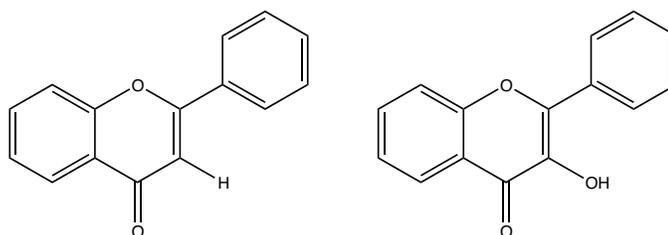


Figura 6. Estructura base de una flavona (izquierda) y un flavonol (derecha)⁴⁴.

Las flavonas son más fáciles de identificar que las antocianinas, ya que son mucho más estables ante una reacción de hidratación. Las flavonas se encuentran en la naturaleza en la superficie de las plantas, su presencia se asocia con la producción de productos lipofílicos, en su mayoría de origen terpénico⁴⁸. Su naturaleza lipofílica, en mayor o menor grado, excluye su acumulación en un ambiente acuoso celular, por lo que su acumulación se da al exterior de la planta como consecuencia de su excreción epidemia y glandulotrópica. Las flavonas agliconas se encuentran, por lo tanto, en células oleosas o en cavidades oleosas, en capas delgadas epicuticulares, en ceras de las hojas, y en resinas de las hojas^{45 y 48}.

3.4 Mecanismos de estabilización del color

La búsqueda de teorías para explicar el color desarrollado por las antocianinas y su gran estabilidad surgió hace más de 100 años. Las antocianinas son responsables de producir colores rojos, azules morados y naranjas en las plantas. Sin embargo, la variación de estos colores no puede ser explicada en función del pH, ya que los tejidos vegetales presentan un rango de pH de 4-6 y en estos valores las antocianinas son incoloras⁴⁴. Para responder esta incógnita, es necesario abordar el problema desde un punto de vista molecular, por lo que se han propuesto diversos mecanismos por los cuales las antocianinas puedan estabilizarse dentro del citoplasma en valores de pH ligeramente ácido y producir colores rojizos⁴⁶. A la par de estos estudios, se ha observado que las flavonas también pueden presentar interacciones similares a las de las antocianinas. Colores como el azul y el morado, son el resultado de interacciones más complejas que involucran la interacción de antocianinas con flavonoides de distintas clases, azúcares, proteínas e inclusive cationes metálicos⁴⁴ y ⁴⁶. Existen 4 tipos de mecanismos de estabilización del color en compuestos de tipo flavonoide: auto-asociación, apilamiento tipo “sandwich”, co-pigmentación y formación de complejos y éstos se pueden clasificar de acuerdo al tipo de interacción molecular entre sus componentes⁴⁴:

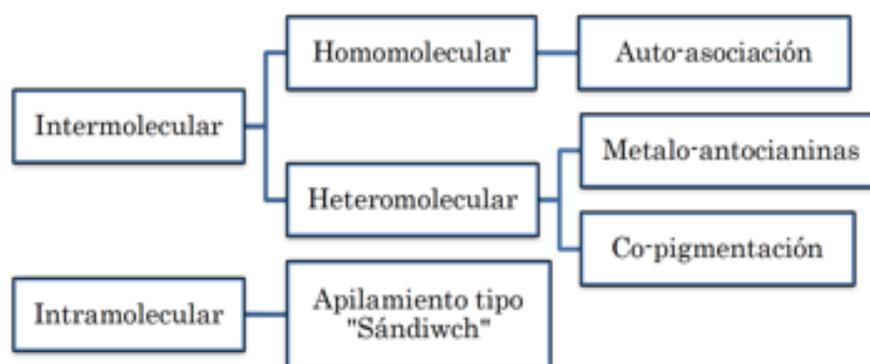


Figura 7. Clasificación de los mecanismos de estabilización del color en compuestos de tipo flavonoide⁵⁵.

3.5 Auto-asociación

Este mecanismo involucra interacciones entre moléculas de un solo tipo (homomoleculares), las cuales son causadas por las fuerzas de atracción que ejercen entre sí grupos con una gran densidad electrónica como los anillos aromáticos. Tales interacciones provocan cambios en algunas propiedades del compuesto, especialmente en el color. Estos cambios o arreglos estructurales pueden ser detectados a través de las diversas técnicas espectroscópicas tales como IR, RMN, DC y UV-vis⁵⁶.

3.5.1 Auto-asociación de antocianinas

Las antocianinas presentan un interesante fenómeno cuando se realiza un aumento en la concentración del orden de μM a mM ; este fenómeno consiste en un cambio hipsocrómico e hipercrómico en uno de sus $\lambda_{\text{máx}}$ del espectro de UV. Por ejemplo, a un pH de 3.16, la absorbancia del 3,5-diglicósido de la cianidina en $\lambda_{\text{máx}}$ se incrementa 300 veces cuando la concentración se aumenta 100 veces (de 10^{-4} M a 10^{-2} M) sugiriendo la existencia de una interacción intermolecular de la antocianina en forma de ion flavilium para poder provocar dicho cambio⁵⁶. Esta auto-asociación es atribuida principalmente a los enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo y carbonilo en los anillos aromáticos y las unidades de azúcar para formar un apilamiento horizontal entre las moléculas^{56 y 57}. La auto-asociación de antocianinas no sólo es posible en medio ácido, sino que se presenta también en disoluciones neutras, lo cual explica los diferentes tonos de coloración en el tejido vegetal donde el pH está en un rango de 4-6^{57 y 58}. En la Figura 8 observamos el espectro visible del cloruro de malvina a diferentes concentraciones, medido inmediatamente después de disolverlo en un buffer de fosfato (pH 7). En una concentración baja ($3 \times 10^{-5}\text{ M}$), en donde la interacción entre las antocianinas es mínima, el color es azul; y en una concentración alta ($3 \times 10^{-3}\text{ M}$) se produce un color rojo parecido al producido por el ión flavilium, el cual es producido por interacciones más fuertes entre las moléculas de la anhidrobase de la malvina. Así también en la imagen se muestra el espectro UV-vis de una disolución con una concentración $3 \times 10^{-4}\text{ M}$ en HCl, los valores de $\lambda_{\text{máx}}$ son muy similares al producido por la disolución con una

concentración alta de cloruro de malvina ($3 \times 10^{-3} \text{ M}$). Es así que, la auto-asociación de la anhidrobase de la malvina produce un cambio hipsocrómico en el espectro de UV-vis⁵⁹.

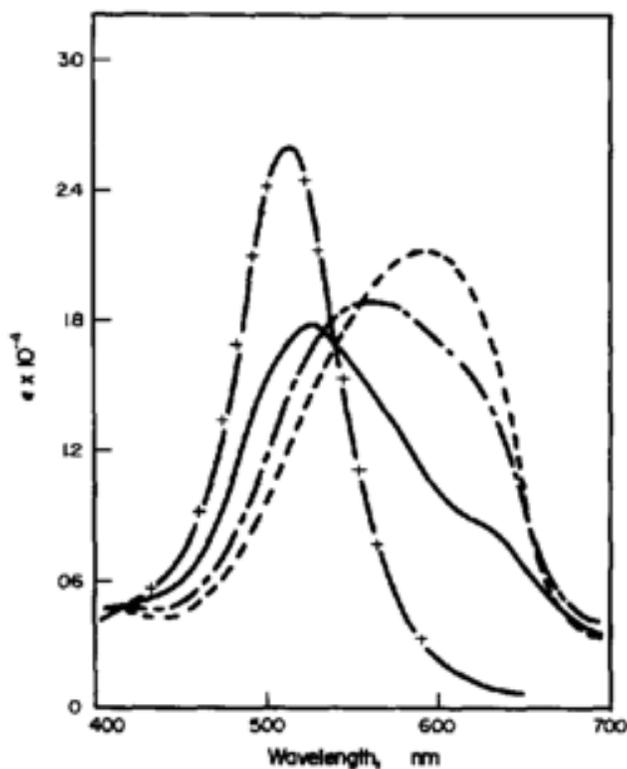


Figura 8. Espectro UV-vis del cloruro de malvina, pH 7.

(- - - -) $5 \times 10^{-5} \text{ M}$
 (— — —) $5 \times 10^{-4} \text{ M}$
 (——) $5 \times 10^{-3} \text{ M}$
 (+ — — +) $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ en HCl 1N⁵⁹.

Esta interacción particular entre las moléculas de antocianina también genera un efecto Cotton negativo en espectroscopía de Dicroísmo Circular^{59 y 59} (Figura 9). El valor de la elipticidad molar $[\theta]$ de las bandas de Cotton se intensifica fuertemente al aumentar la concentración de la disolución, esto indica una formación importante de moléculas apiladas a medida que la concentración de la disolución aumenta⁵⁹. Por tanto, se ha propuesto que las antocianinas se apilen sobre un eje de manera horizontal y que dicho acomodo tenga un giro \pm sobre el eje para poder causar un efecto Cotton en el espectro de DC⁵⁸⁻⁶⁰ (Figura 10).

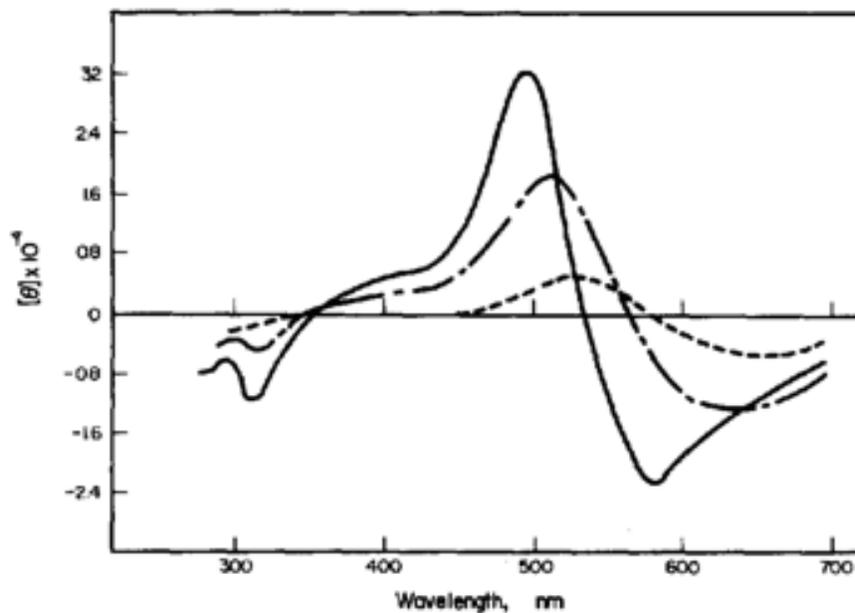


Figura 9. Espectro DC de cloruro de malvina en buffer de fosfato, pH 7.0: - - - $5 \times 10^{-5} \text{M}$ (4000), - · - · $4 \times 10^{-4} \text{M}$ (18000), — $5 \times 10^{-3} \text{M}$ (32000).

Los valores en paréntesis representan $[\theta]$, $\text{deg cm}^2/\text{dmol}$, a $\lambda_{\text{máx}}$.⁵⁹.

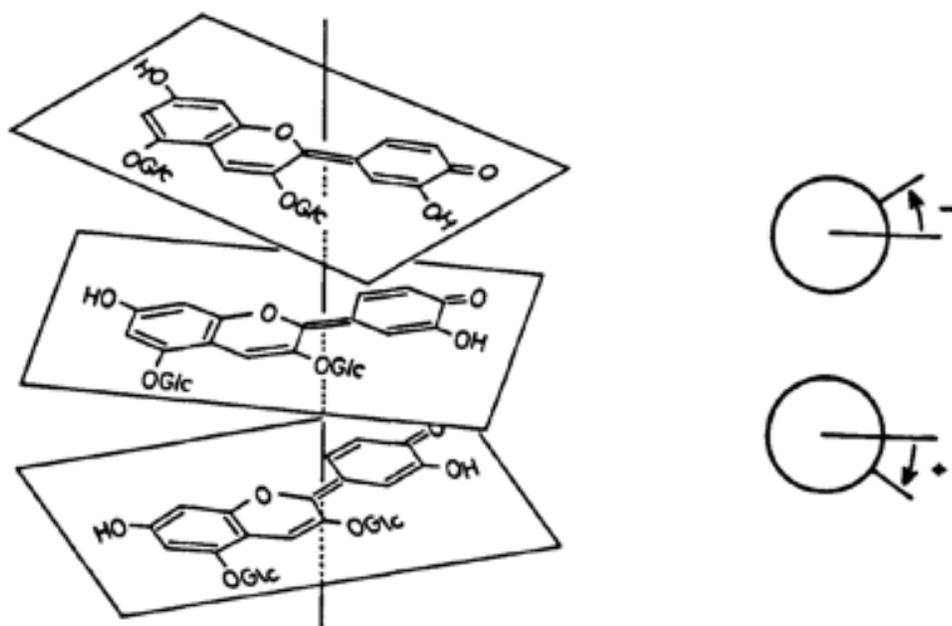


Figura 10. Modelo de apilamiento quiral en moléculas de antocianinas⁵⁸.

Este efecto nos dice que al menos dos moléculas de antocianina deben apilarse de manera vertical en un eje girando en contra de las manecillas del reloj, por tanto, la estabilidad y la variación de color de estas antocianinas en los pétalos de las flores son derivadas, al menos en parte, por una auto-asociación⁵⁸.

Los efectos causados por un apilamiento también se hacen perceptibles en RMN, en donde las señales de los protones del núcleo aromático se desplazan a campo alto conforme se aumenta la concentración de la disolución. El apilamiento de las moléculas provoca que las corrientes magnéticas en las cercanías de los anillos aromáticos se modifiquen y causen efecto diamagnético anisotrópico⁵⁶.

3.5.2 Auto-asociación de flavonas

En disoluciones acuosas, los espectros de DC y UV-vis de flavonas dependen de su concentración. Cuando la concentración se incrementa, las curvas del efecto Cotton también aumentan su valor de θ , indicando que las moléculas de flavona se auto-asocian quiralmente (Figura 11). Tal apilamiento se confirma con la presencia de un cambio hipsocrómico en el espectro de UV y la dependencia a la temperatura de los espectros de CD y UV⁵⁸.

De la misma forma que en las antocianinas, la RMN-¹H sustenta tal apilamiento: las señales correspondientes a los protones del anillo se desplazan a campo alto cuando se incrementa la concentración de las disoluciones, mientras que se observan pequeños cambios en la señal de los protones anoméricos, indicando que los anillos aromáticos están apilados de forma vertical, por lo que los protones de los anillos aromáticos de una molécula sufren una desprotección causada por los anillos aromáticos de otras moléculas^{56 y 58}.

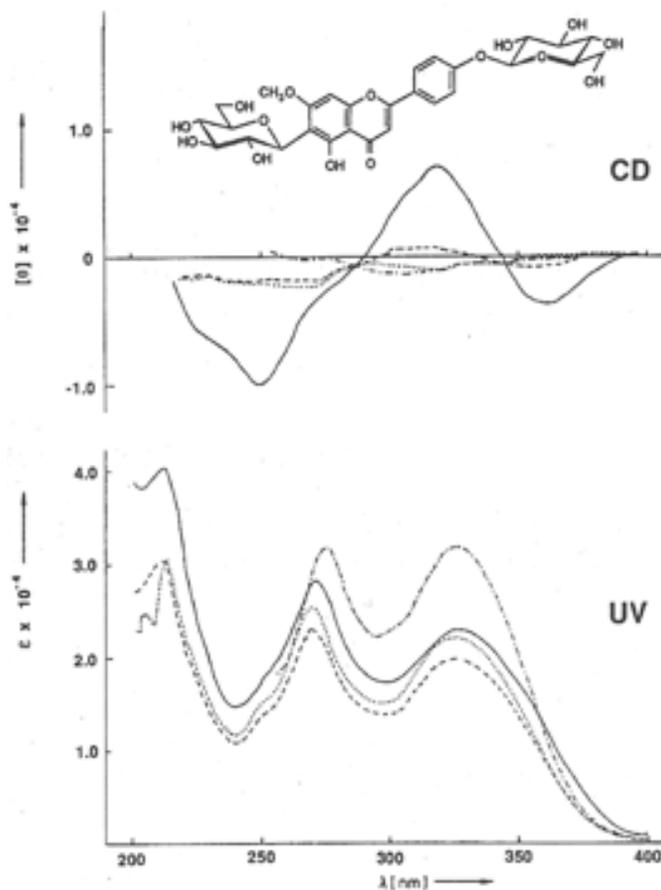


Figura 11. Espectro UV-vis y CD de la flavocoumestrol diferentes concentraciones:

(—) 5×10^{-3} M en H_2O ; (- - -) 5×10^{-4} M en H_2O ;
 (⋯⋯) 5×10^{-5} M en H_2O ; (— · —) 5×10^{-3} M en $DMSO$ ⁵⁶.

3.6 Apilamiento tipo “sándwich”

Como se ha mencionado, las antocianinas presentan en su estructura la unión con azúcares. En algunos casos, estos azúcares pueden contener otros grupos funcionales, los cuales favorecen la existencia de interacciones intramoleculares; tales grupos suelen ser fragmentos derivados del ácido caféico, ácido *p*-cumárico o del ácido ferúlico⁵⁶.

Las antocianinas poliaciladas, como la platiconina, cineranin, zebrinina, gentiodelfidina, que contienen grupos aromáticos acilados unidos a los azúcares, son extremadamente resistentes a la

pérdida de color causada por una hidratación en disoluciones ligeramente ácidas y neutras^{60 y 61}. La gran estabilidad de estas antocianinas recae en que la molécula puede “plegarse”, de tal manera que el anillo aromático acilado puede colocarse por debajo y encima del núcleo de la antocianina, confiriéndole una protección al anillo heterocíclico contra un ataque nucleofílico por parte de las moléculas de agua impidiendo una reacción de hidratación^{41, 43 y 62} (Figura 12). Para determinar si un apilamiento de este tipo es posible, es necesario primeramente determinar por completo la estructura de la antocianina, incluyendo la estereoquímica.

En la Figura 12 se muestra de manera esquemática los dos mecanismos de estabilización de las antocianinas, la auto-asociación involucra una interacción intermolecular, en donde las unidades de azúcar quedan por la parte externa del eje de antocianinas apiladas; mientras que el apilamiento tipo “sandwich” es de tipo intramolecular, y los residuos de los ácidos aromáticos quedan por encima y debajo del núcleo de la antocianina y las unidades de azúcar permanecen en el exterior. La evidencia más contundente que apoya esta hipótesis son los espectros obtenidos en RMN-¹H particularmente en el efecto Nuclear de Overhauser (NOE). Por ejemplo, el espectro NOE de la antocianina *heveanly blue* (HBA), muestra acoplamiento a larga distancia, indicando una conformación plegada de la molécula; además, las señales de los protones del doble enlace de los dos grupos del ácido caféico que están cercanos al núcleo flavonoide de la HBA son desplazadas a campo alto, mientras que las las señales de los protones del tercer grupo del ácido caféico distante al núcleo flavonoide muestra una diferencia del desplazamiento mínima. Por tanto, los dos grupos aromáticos acilados están apilados paralelamente con el núcleo de antocianina⁵⁸ (Figura 13).

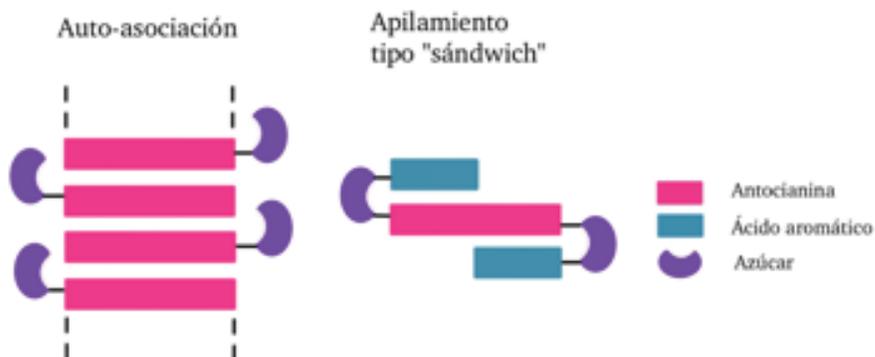


Figura 12. Mecanismos de estabilización de las antocianinas: auto-asociación y apilamiento intramolecular tipo “sandwich”^{56 y 58}.

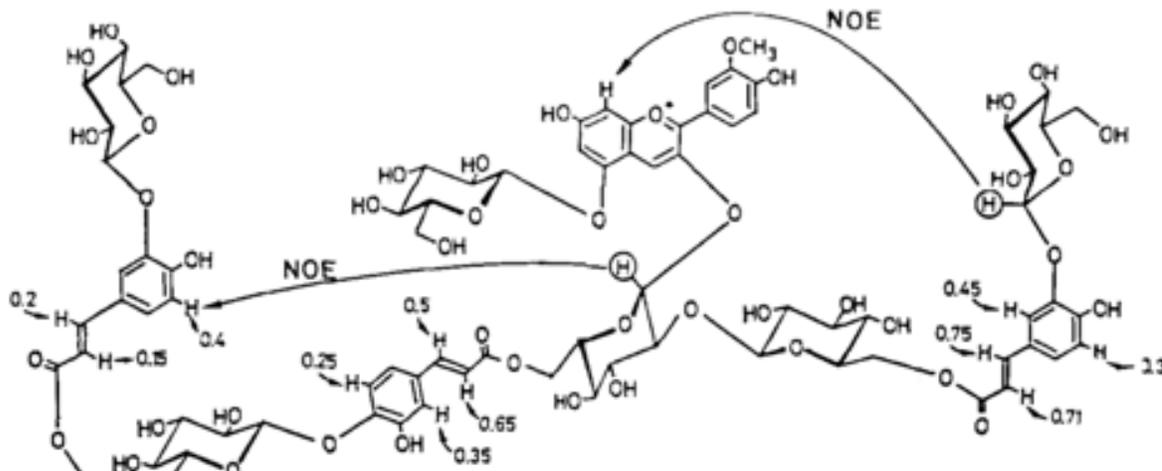


Figura 13. Estructura de la antocianina azul *heavenly blue* (HBA). Los números indican la diferencia en el desplazamiento químico en ppm entre la antocianina HBA y la señal correspondiente a metilglucosilcafeato en $\text{CD}_3\text{OD} + \text{DCl}^{58}$.

3.7 Co-pigmentación

Descubierto por Robinson en 1931, este efecto es resultado de la interacción intermolecular de antocianinas y flavonas (u otros polifenoles)⁶³. Junto con el efecto del pH, la co-pigmentación es el factor más importante en la pigmentación de las flores^{44 y 46}. Se observó que la adición de flavonas a disoluciones acuosas de antocianinas causaban no sólo una mayor estabilidad en el color (un aumento en la absortividad), sino también un cambio de color de la disolución de rojo a morado (efecto batocrómico)⁵⁶. En 1976 el equipo de investigación encabezado por Goto propone un modelo de interacción entre antocianinas y flavonas mediante un apilamiento hidrofóbico y una transferencia de cargas para poder explicar el efecto de co-pigmentación. Este apilamiento hidrofóbico consiste, al igual que el apilamiento tipo “sandwich”, en la superposición vertical de los anillos aromáticos de los núcleos de la antocianina (A) y de la flavona (F) y producir un arreglo FAF. Además, este apilamiento es también estabilizado por unidades de azúcar que cubren el apilamiento FAF^{56 y 58} (Figura 14).

Co-pigmentación

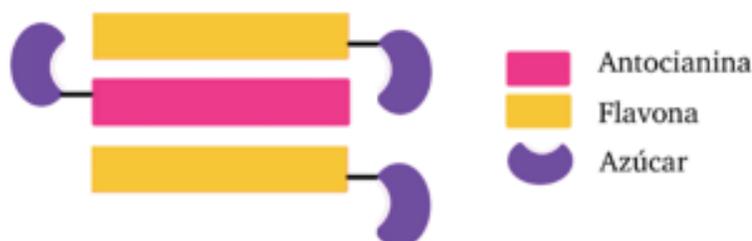


Figura 14. Co-pigmentación antocianina-flavona. En la figura se observa que las unidades de azúcar rodean la pila FAF⁵⁶ y ⁵⁸.

Este fenómeno es dependiente de la concentración, a una concentración más alta de la antocianina, el efecto de co-pigmentación de la flavona será resaltado. El efecto de co-pigmentación depende del tipo y concentración de las antocianinas, del tipo y concentración de flavonas, del pH y de la temperatura de la disolución⁵⁸. La co-pigmentación puede llegar a manifestarse tanto con los iones flavilium como con la anhidrobase de las antocianinas, ocurre de manera no-estequiométrica y sólo en disoluciones, produciendo colores violáceos pero nunca produciendo un azul “puro”⁶². Por otra parte, el efecto Cotton en DC de la antocianina en disolución acuosa desaparece conforme aumenta la concentración de la flavona, indicando así que la auto-asociación de la antocianina es destruida por la flavona para formar el co-pigmento⁵⁸.

En diversos estudios, se observó que las antocianinas que contenían un grupo aromático acilado en su estructura formaban co-pigmentos mucho más estables con flavonas en comparación con aquellas no aciladas; mientras que las antocianinas que contenían dos o más grupos acilo aromáticos eran estabilizadas, como ya se vio en la sección anterior, mediante un apilamiento tipo “sandwich”⁵⁶.

Por ejemplo, una disolución acuosa de la anhidrobase de la malvina (5×10^{-4} M) a pH 6 se decolora después de 2 horas; pero esta misma disolución es mucho más estable si se agrega una flavona (flavocommelina), además de que el color cambia de magenta a azul. En la Figura 15, se observa el espectro de DC que el efecto Cotton de la malvina (línea sólida) desaparece con la

adición de la flavocommelina (líneas punteadas), indicando que la auto-asociación de la malvina es destruida para dar paso a la co-pigmentación⁵⁸.

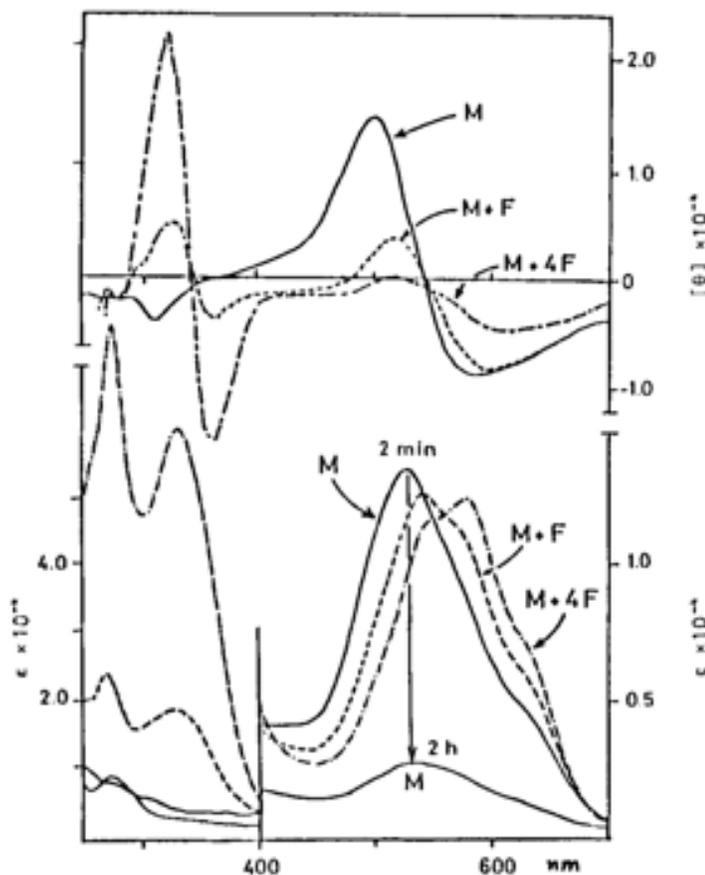


Figura 15. Espectros UV y DC de malvina (M) y el complejo malvina-flavocommelina (M+F) en buffer 0.01M de fosfato a pH 6.0 2 min. después de disolver (Concentración malvina: 2×10^{-3} M): M (—); complejo M+F, 1:1 (- - -); complejo M+4F, 1:4 (— - -)⁵⁸.

Algunas especies de *Commelina communis* presentan variantes al color común azul de sus flores, y en general muchas flores tienen pétalos multicolores, los cuales son parcialmente azules y morados. Estas inconsistencias en el color indican que debe existir una relación muy cercana entre los pigmentos azules y morados de los pétalos. En los pétalos púrpuras de *Commelina communis* se han encontrado dos antocianinas (ambas monoglucosidadas y una de ellas con un grupo acilo aromático) y una flavona (flavocommelina), mientras que los pétalos azules contienen a la antocianina malonilawobanina y a la flavona flavocommelina⁵⁶.

3.8 Metalo-antocianinas

Como ya se ha mencionado, las antocianinas son responsables de producir el color de las flores en tonalidades desde el rojo hasta el azul⁴⁴. Las antocianinas suelen extraerse como sales de oxonio empleando disolventes acidulados con HCl o CH₃COOH; el empleo de estos disolventes involucra un cambio en la coloración original de la flor, y por ende, el mecanismo natural de estabilización del color en las flores resulta afectado⁵⁶.

Se ha encontrado así que la flor azul del “aciano” o “azulejo” (*Gentaurea cyanus*) contiene la misma antocianina presente en las rosas rojas⁶⁴; sin embargo, la identificación de la antocianina no permite explicar la variación de color en los pétalos de estas especies. Por lo que, fue necesario implementar otro tratamiento que permitiese aislar el pigmento azul de esta planta. Recientemente, se ha revelado la estructura molecular de este colorante y otros más; se demostró que el color azul de los pétalos es el resultado de la interacción de varias moléculas: de antocianinas, glicósidos de flavonas y cationes metálicos⁴⁴. Hasta ahora se han discutido tres tipos de estabilización de las antocianinas para generar los diferentes colores en los pétalos de las flores, y éste último, se considera más complicado ya que involucra varios factores como: la complejación de moléculas orgánicas con metales, un tamaño molecular adecuado de los diferentes componentes y la presencia de ciertos grupos funcionales^{44 y 58}. A estos complejos moleculares se les dio el nombre de metalo-antocianinas y actualmente se conocen cuatro: commelinina, protocianina, protodelfinidina y cianosalvianina⁶⁵.

3.8.1 Commelinina

En 1957, el grupo encabezado por K. Hayashi aisló por primera vez del colorante azul de las flores de *Commelina communis* L. pequeños cristales en forma de aguja empleando disolventes neutros (H₂O, MeOH y/o EtOH)⁶⁶ y al cual posteriormente fue nombrado como commelinina^{67 y 68}.

El comportamiento “inusual” de este pigmento llamó mucho la atención, ya que era muy diferente a lo observado comúnmente en las antocianinas: no-dialisable a través de membranas

semi-permeables, migración electroforética hacia el ánodo, altamente soluble en agua pero insoluble en otros disolventes orgánicos⁶⁷, y sobretodo, en estudios de análisis elemental, se observó que una cantidad apreciable de elementos metálicos, en donde K y Mg eran esenciales a la molécula del colorante⁶⁸. El espectro UV-vis del colorante mostró bandas bien definidas en $\lambda_{\text{máx}}$ 273, 316, 591 y 643 nm en H₂O. Cuando se le trató con HCl al 2%, la banda en 643 nm desaparece y hay un cambio hipsocrómico en la banda de 591 nm, además, las bandas en 273 y 316 nm sufren un cambio batocrómico e hipercrómico para dar como resultado valores de $\lambda_{\text{máx}}$ en 274, 317 y 528 nm⁶⁸ (Figura 16). Se demostró que la commelinina era un compuesto de alto peso molecular, el cual estaba conformado por una antocianina, un compuesto flavonoide y por los metales Mg y K⁶⁹. En el espectro de DC se observa bandas intensas del efecto Cotton negativo indicando la presencia de una interacción quiral de las moléculas en el compuesto⁵⁰. En la Figura 17 se observa el espectro UV-vis y DC del complejo de commelinina obtenido de *Commelina communis* (línea sólida) y el espectro del complejo análogo de la commelinina reconstruido a partir de las moléculas de awobanina, flavocommelina y iones magnesio⁵⁶.

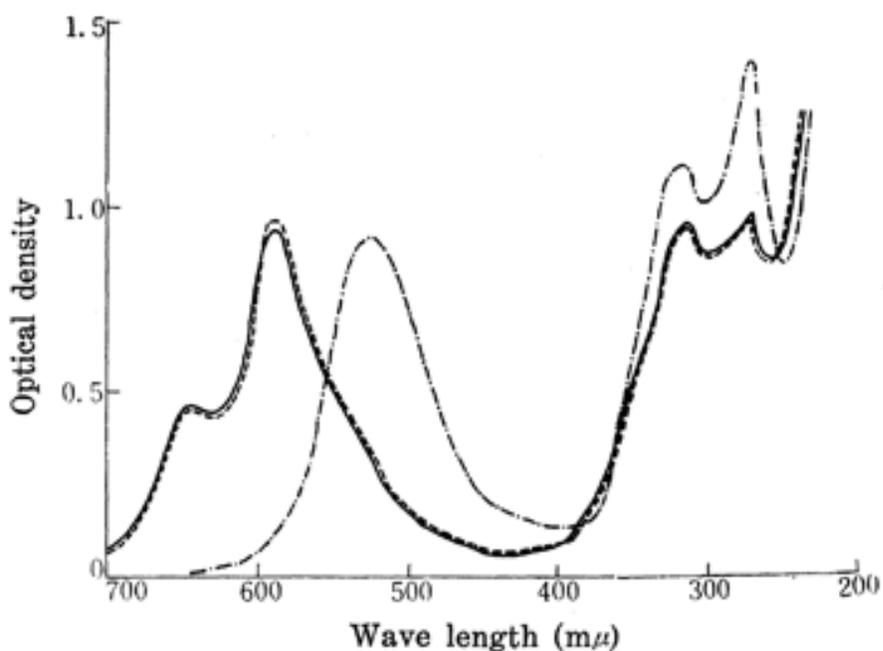


Figura 16. Espectro UV-vis de la commelinina en H₂O (—); tratada con HCl al 1% (- - -); tratada con HCl al 2% (- · -)⁶⁸.

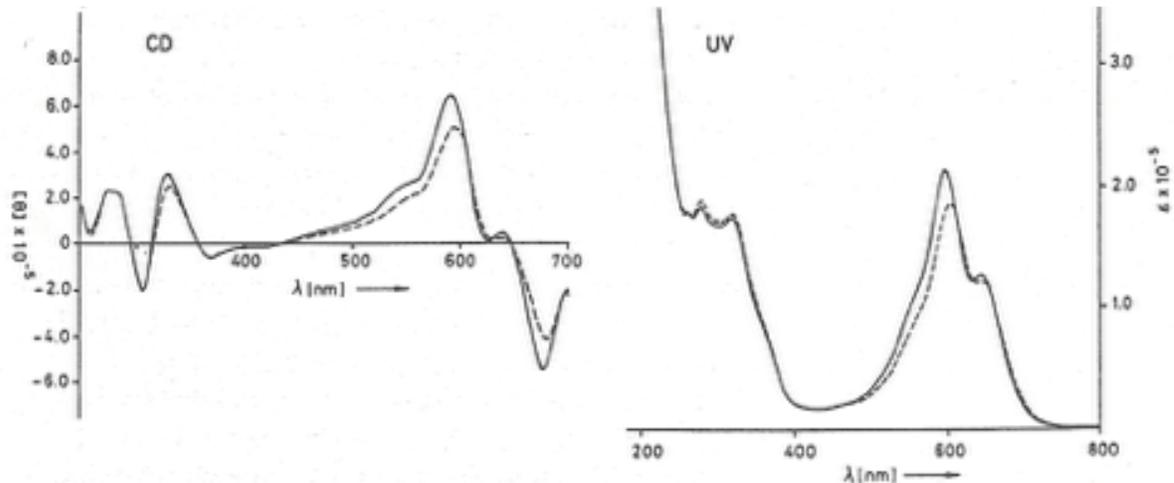


Figura 17. Espectros DC y UV-vis del complejo de commelinina (—) y del complejo análogo de la commelinina (- - -)-⁵⁶.

En los primeros estudios realizados se realizó una hidrólisis de la antocianina para poder determinar su identidad. Se encontraron 3 residuos, ácido *p*-cumárico, delphinidina y glucosa, proponiendo como antocianina a la awobanina (posteriormente se rectificó que era malonilawobanina) y un flavonoide color amarillo pálido, siendo éste un 4'-glucósido de la swertina, nombrado por tanto flavocommelina, el cual pertenece a la clase de las C-glicosilflavonas⁷⁰ (Figura 18). Los espectros de emisión mostraron la presencia de metales como Mg, K y Na como elementos mayoritarios; y Ca, Mn, Cu y Ti como elementos traza⁶⁷.

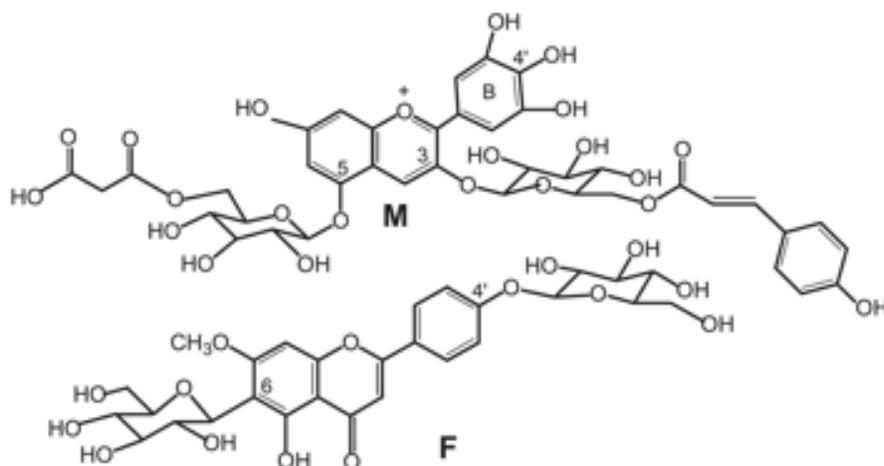


Figura 18. Estructuras de la antocianina y la flavona glucosidada en el compuesto de commelinina. (M: malonilawobanina, F: flavocommelina)⁷¹.

La electroforesis realizada al colorante mostró que éste migraba hacia el ánodo y en ningún momento generaba residuo alguno, por lo que la molécula debía presentar una carga neta negativa, cuestión difícil de explicar ya que tanto las antocianinas como las flavonas y el catión metálico no presentan dicha propiedad. Finalmente, se llegó a la conclusión que la antocianina del colorante es la malonilawobanina, la cual al poseer un grupo malonil es capaz de aportar la carga negativa a la molécula, y no la awobanina como se había propuesto en un principio. La presencia de la awobanina en el extracto del colorante se considera como un artefacto producido durante el proceso de extracción⁷².

Con esta información y resultados analíticos, se estableció que el pigmento es una metalo-antocianina, un complejo de coordinación, en donde tres moléculas de la antocianina se ensamblan a un átomo de Mg⁷³. Posteriormente, se asoció la presencia de la flavocommelina como un componente esencial en el compuesto de coordinación azul, ya que contribuye a la estabilidad del color⁷⁰ (Figura 19).

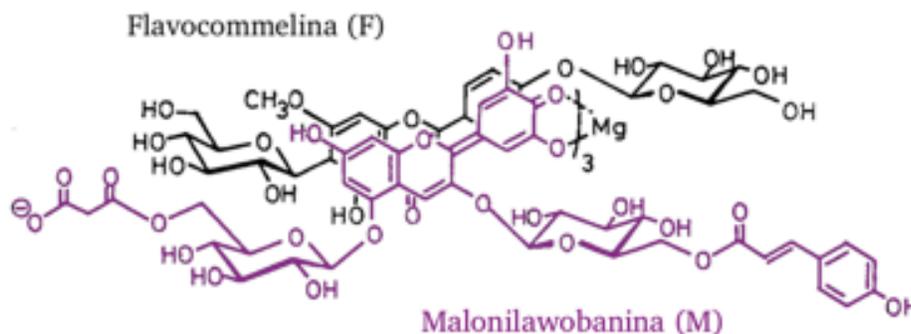


Figura 19. Fragmento del complejo de commelinina en donde se muestra la coordinación de las antocianinas en forma de anhidrobase con el ión de magnesio (Mg²⁺) y la co-pigmentación entre la malonilawobanina (M) y la flavocommelina (F)⁵⁸.

El peso molecular del complejo de commelinina (A) fue medido mediante diversas técnicas espectrométricas convencionales: IE, FAB(+), MALDI-TOF y ESI; pero sólo la técnica ESI en modo negativo permitió la obtención directa de los picos correspondientes al ión molecular multicargado del complejo. Estos picos multicargados se observaron en (*m/z*) 2216.5, 1768.7, 1474.1 y 1262.5

correspondientes a los fragmentos [A-4H]⁴, [A-5H]⁵, [A-6H]⁶ y [A-7H]⁷; haciendo los cálculos correspondientes con los valores de dichos picos, se obtuvo un peso molecular de 8849 uma, el cual corresponde a la fórmula química C₄₀₂H₄₁₄O₂₂₂Mg₂ y que coincide con una fórmula química conformada por seis moléculas de malonilawobanina (M), seis moléculas de flavocommelina (F) y dos cationes Mg²⁺; además, el peso molecular exacto para el complejo que ha perdido seis protones del grupo malonil [M₆F₆Mg₂]-6H es 8846.2 uma)⁷⁴.

La composición [M₆F₆Mg₂]⁶⁻ puede ser estructurada empleando tres unidades M₂F₂ alrededor de un eje *c* y dos átomos de magnesio posicionados al centro (Figura 20). En esta disposición, las sub-unidades co-pigmentadas (MF) están apiladas quiralmente mediante interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de antocianina para formar la unidad FMMF⁵⁸; como ya se mencionó, una banda muy intensa de excitación tipo Cotton confirma un apilamiento quiral entre las antocianinas⁵⁰. Tres unidades FMMF están doblemente enlazadas mediante una quelación con dos átomos de magnesio.

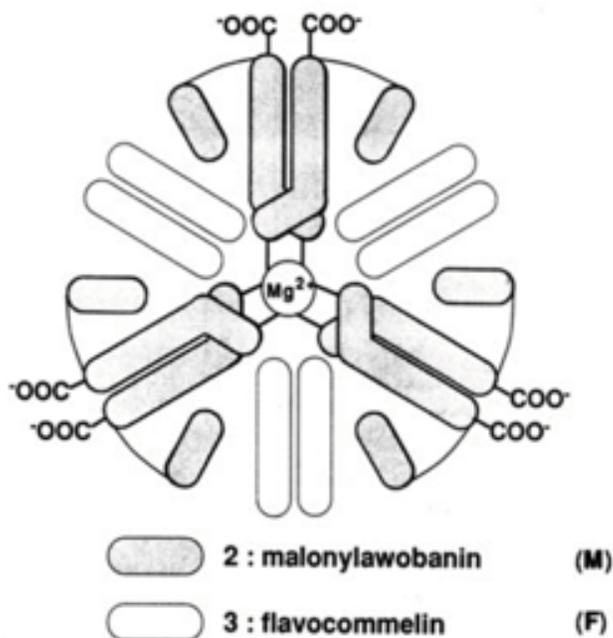


Figura 20. Esquema de la estructura de la commelinina. El catión de Mg presenta una coordinación octaédrica con las moléculas de antocianina (M), las flavonas glucosidadas auto-asociadas (FF) se intercalan con las antocianinas auto-asociadas (MM)⁷⁵.

Finalmente, se determinó la estructura del complejo de commelinina con análisis de rayos X, demostrando que en el complejo metálico los dos iones de Mg^{2+} están localizados en el centro de la molécula, sobre un eje cristalográfico de tres planos (Figura 21); las moléculas de antocianina (malonilawobanina M) y las moléculas de flavona glicosidada están auto-asociadas con sí mismas como MM y FF; las tres auto-asociaciones de la malonilawobanina (M's) están colocadas sobre los tres planos y las tres auto-asociaciones de la flavona (F's) se encuentran entre cada plano. El anillo B de la malonilawobanina está en forma de anión 4'-ceto-quinoidal, con los átomos de oxígeno coordinados octaédricamente con los iones de magnesio (Figura 22)⁷⁵. Las flavonas no están coordinadas al catión, y se encuentran como co-pigmentos de las antocianinas. Los grupos hidroxilo se encuentran apuntando al exterior de la molécula, lo cual explica que el color azul de las flores sea tan susceptible a la degradación en contacto con la humedad⁵⁶.

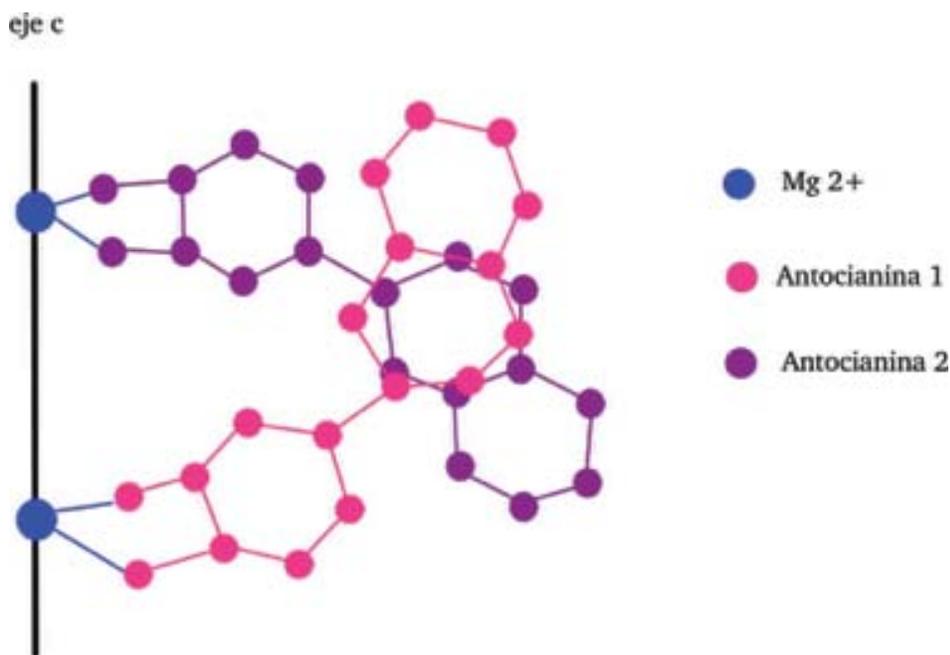


Figura 21. Vista lateral de los dos cationes Mg^{2+} sobre el eje c, la coordinación antocianina-metal (A-Mg) y la auto-asociación de antocianinas (AA)⁵⁶.

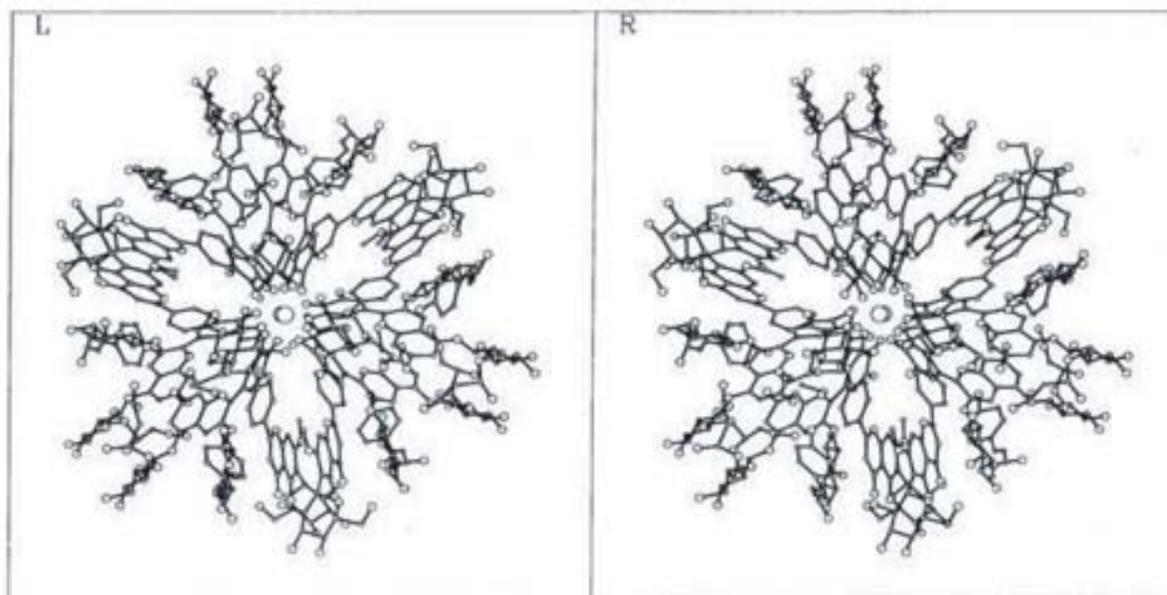


Figura 22. Estero estructura de la molécula de commelina-Mg. Dos iones Mg están localizados al centro de la molécula⁷⁶.

Compuestos similares han sido reconstruidos usando otros cationes en lugar de Mg^{2+} y algunas antocianinas con estructura similar a la awobanina (delfinidina, violanina, shisonina y cianina) para formar un complejo de coordinación azul análogo al de commelinina. Se observó que únicamente los cationes bivalentes como Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} y Cd^{2+} lograron formar un complejo con la malonilawobanina y la flavocommelina. De todas las antocianinas empleadas, sólo la antocianina shisonina formó un compuesto tipo commelinina con el catión de Mg y la flavocommelina^{66 y 76}. Se encontró que el grupo *p*-cumaril unido a las unidades de glucosa de las antocianinas juegan un papel importante en la formación del complejo commelinina. La inefectividad de la violanina para formar el complejo indica que el largo y la naturaleza de la cadena de azúcar son factores críticos en la formación de este tipo de compuestos⁶⁶.

3.8.2 Protocianina

En 1958, el equipo encabezado por E. Baeyer, logró aislar un pigmento azul de las flores de *Centaurea cyanus* al cual llamó protocianina, y que fue descrito como un complejo metálico compuesto por antocianinas, polisacáridos y cationes metálicos (Fe^{3+} y Al^{3+})⁷⁷. Posteriormente,

Hayashi aisló este pigmento como un cristal demostrando que el compuesto tenía un alto peso molecular, y que estaba conformado por moléculas de antocianinas (la centaurocianina), un compuesto de tipo flavonoide (derivado de la apigenina con dos grupos de azúcar y un grupo cumaril unido a su estructura), carbohidratos y cationes de K^+ , Mg^{2+} y Fe^{2+} , similar a la metalo-antocianina encontrada en las flores de *Commelina communis*⁷⁸.

En estudios subsecuentes, se hicieron pruebas para reconstruir el complejo empleando Fe^{2+} , Mg^{2+} y los componentes orgánicos: la centaurocianina y el derivado de la apigenina, los cuales se obtuvieron del mismo complejo de protocianina aislado de *Centaurea cyanus*, sin embargo la reconstrucción no fue exitosa y el complejo nunca fue obtenido⁶⁶. Finalmente el equipo de investigación encabezado por Kondo encontró un factor determinante para la reconstrucción del complejo, dicho factor es la presencia de iones Ca^{2+} ; el rendimiento de la formación del complejo se incrementaba con la cantidad de iones de Ca^{2+} añadidos a la mezcla de reacción. Con la presencia de los iones Ca^{2+} fue posible obtener cristales del compuesto, el cual presentó las mismas bandas de absorción en UV-vis ($\lambda_{m\acute{a}x}$ 267, 317, 574 y 676 nm) y DC que el complejo aislado de la planta⁷⁹ (Imagen 16).

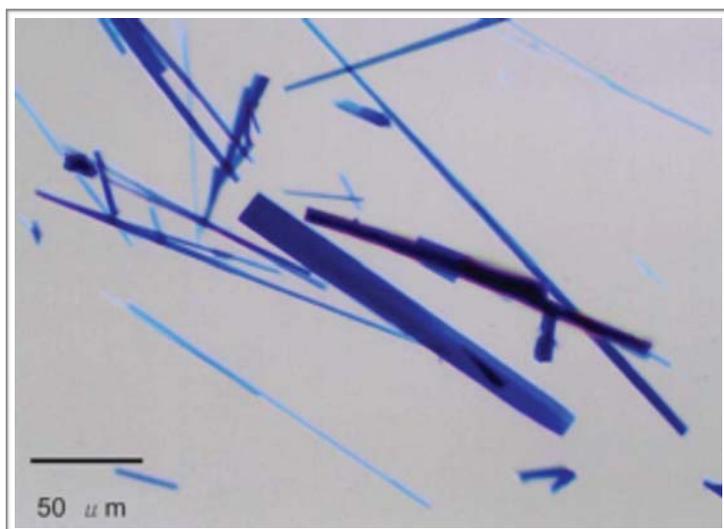


Imagen 16. Cristales del compuesto de protocianina reconstruida⁸⁰.

Finalmente, se determinó la estructura cristalina de la protocianina mediante análisis de rayos X⁸⁰. La molécula tiene una “pseudo” simetría de un eje de 3 planos y cuatro iones metálicos Fe^{3+} , Mg^{2+} y 2 Ca^{2+} alineados al eje como $\text{Ca}^{2+}\text{Fe}^{3+}\text{Mg}^{2+}\text{Ca}^{2+}$. Las antocianinas (AN) y las flavonas (FL) están auto-asociadas en pares como AN-AN y FL-FL. Los iones de Fe^{3+} y Mg^{2+} están cada uno coordinado a un fragmento AN diferente del par auto-asociado AN-AN, es decir, Fe^{3+} se une con tres antocianinas, una por cada par de AN-AN y Mg^{2+} con las tres antocianinas restantes (Figura 23 izquierda, arriba). Los dos cationes externos de Ca^{2+} están coordinados de manera análoga con los pares auto-asociados de las flavonas FL-FL (Figura 23 derecha, arriba). Así también, la co-pigmentación AN-FL está presente en el complejo de protocianina (Figura 23 abajo). La longitud de los enlaces C-C y C-O del anillo B de la antocianina indican que el anillo B está en forma 4'ceto-quinoidal⁸⁰.

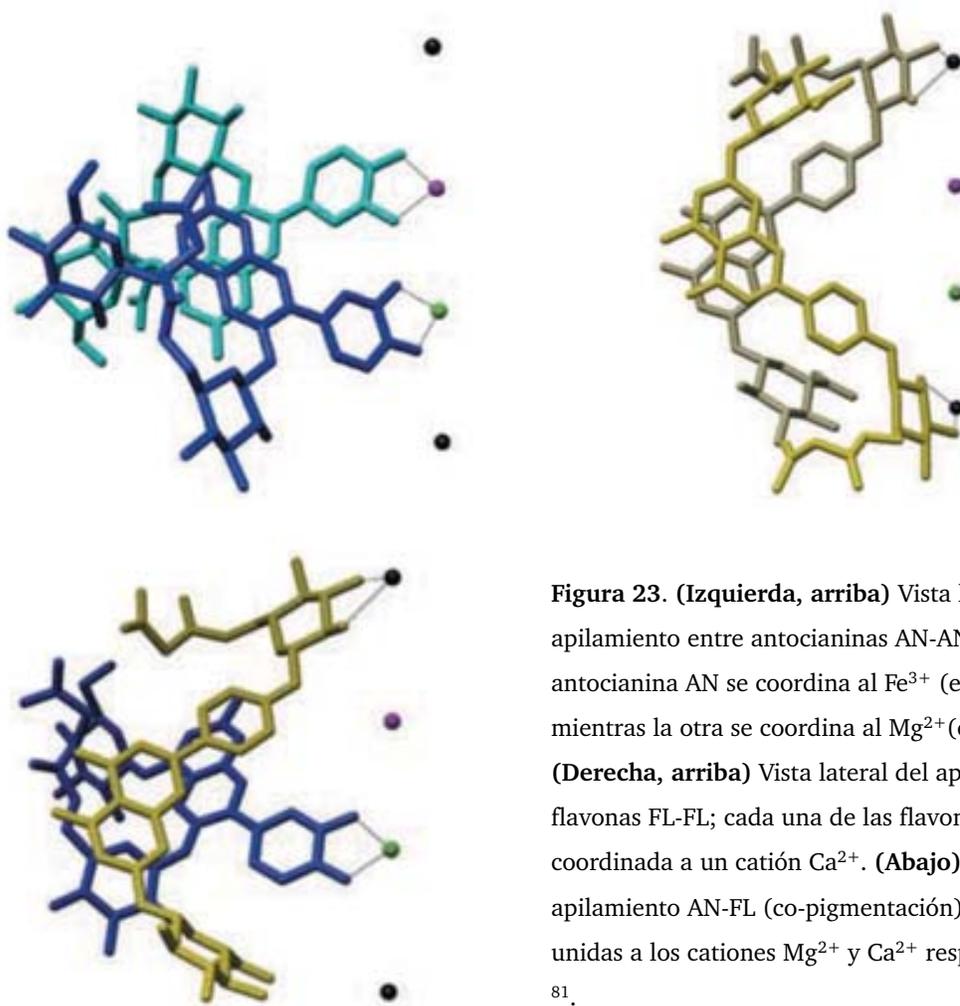


Figura 23. (Izquierda, arriba) Vista lateral del apilamiento entre antocianinas AN-AN; una antocianina AN se coordina al Fe^{3+} (esfera morada), mientras la otra se coordina al Mg^{2+} (esfera verde). (Derecha, arriba) Vista lateral del apilamiento entre flavonas FL-FL; cada una de las flavonas está coordinada a un catión Ca^{2+} . (Abajo) Vista lateral del apilamiento AN-FL (co-pigmentación), las cuales están unidas a los cationes Mg^{2+} y Ca^{2+} respectivamente^{80 y 81}.

3.8.3 Protodelfina

Aislada de las flores azules de *Salvia patens* por Takeda en 1994⁸¹. El espectro de absorción en disolución acuosa es muy similar al patrón obtenido de la commelinina ($\lambda_{\text{máx}}$ 260, 317, 590 y 648 nm.) y es estable en disoluciones neutras y ácidas. Este pigmento está compuesto por una antocianina (malonilawobanina), una flavona (7,4'-di-O- β -D-diglicósido de la apigenina) y Mg^{2+} en una proporción de (6:6:2)⁸².

Se realizó la reconstrucción del pigmento a partir de estos tres elementos y se observó que los espectros de UV-vis eran idénticos del colorante natural^{56 y 83}. En otros estudios realizados por el mismo equipo, se analizó el pigmento por espectrometría de masas con la técnica de *electrospray*, dicroísmo circular y resonancia magnética nuclear, concluyendo que la quiralidad de la unidad de azúcar de la flavona es responsable del reconocimiento molecular quiral en la formación de la metalo-antocianina y que el complejo consiste en seis moléculas de antocianina coordinadas a dos cationes Mg^{2+} con un arreglo de hélice (-) de seis moléculas de azúcares de flavonas intercaladas⁸⁴.

3.8.4 Cianosalvianina

La cianosalvianina es la metalo-antocianina más recientemente descubierta en los pétalos azules de *Salvia uliginosa*⁸⁵. El espectro UV-vis del colorante extraído mostró dos bandas de absorción en $\lambda_{\text{máx}}$ 585 y 640 nm, similar al encontrado en las flores de *Commelina communis*⁶⁸; mientras que el espectro de DC se observa el efecto Cotton típico de las metalo-antocianinas⁵⁸. En los cromatogramas de HPLC del extracto se muestran dos picos principales: uno correspondiente a la antocianina y el otro de la flavona (Figura 24) demostrando que el color azul de las flores corresponde a la formación de un complejo tipo metalo-antocianina. Se cuantificó la cantidad de iones metálicos que pudieran estar involucrados en la coloración azul mediante un análisis elemental, encontrándose a los metales de Fe, Mg y Al, pero únicamente Mg se encontraba en forma proporcional a la cantidad de antocianinas y flavonas⁸⁶.

Para confirmar qué componentes eran esenciales para formar el complejo se realizó una reconstrucción del mismo en una mezcla que con tenía un buffer a pH=7. El colorante obtenido está compuesto por seis moléculas de la antocianina 3-O-(6-O-*p*-coumarilglucopiranosil)-5-O-(4-O-acetil-6-O-malonilglucopiranosil)delfinidina (1), seis moléculas de la flavona 7,4'-di-O-glucopiranosilapigenina (2) y dos iones Mg^{2+} ⁸⁶.

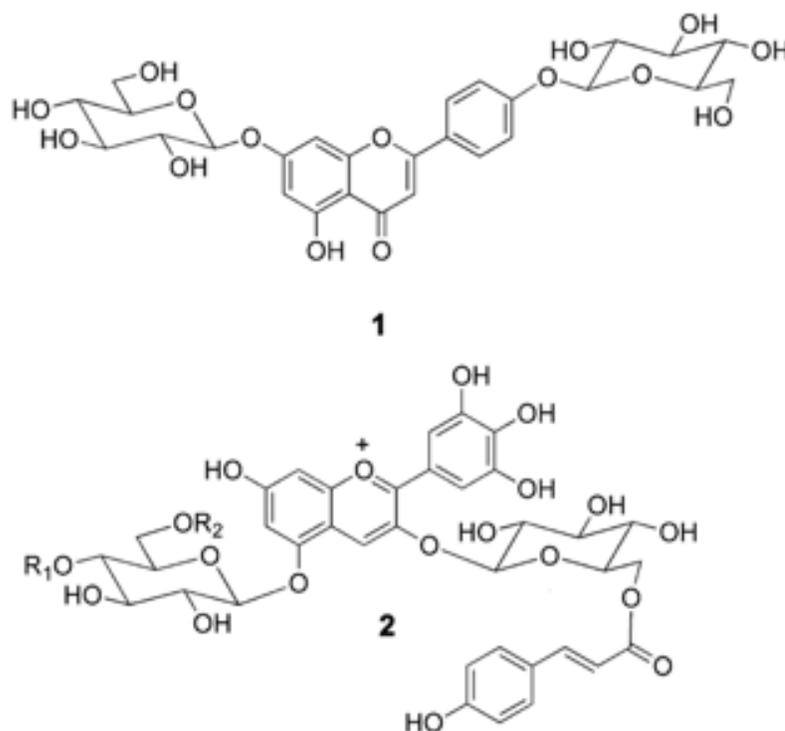


Figura 24. Moléculas que conforman el complejo de cianosalvianina. Flavona (7,4'-di-O-glucopiranosilapigenina) (1) y antocianina (3-O-(6-O-*p*-coumarilglucopiranosil)-5-O-(4-O-acetil-6-O-malonilglucopiranosil)delfinidina) (2) presentes en el complejo de cianosalvianina⁸⁶.

El peso molecular del complejo reconstruido fue registrado en MS-ESI modo negativo, en donde el peso calculado para $[C_{408}H_{414}O_{228}Mg_2]-6H$ es 9008. Para determinar la interacción de las moléculas de antocianina y las flavonas se sometió el complejo a experimento NOE en RMN, en donde se confirma la existencia de un apilamiento entre los componentes por la diferencia del desplazamiento químico de los protones anoméricos de las unidades de azúcar y de los protones aromáticos de los núcleos flavonoides en comparación con los desplazamientos químicos de los espectros de cada compuesto por separado. Aún cuando no se han realizado los análisis por rayos X

para determinar la estructura cristalina de la molécula, los autores han desarrollado una propuesta del arreglo intermolecular en el complejo basándose en los modelos de las antocianinas presentados con anterioridad (Figura 25). Con base en los resultados del experimento NOE, se propone que las moléculas de antocianina y flavona están como co-pigmento, las antocianinas y flavonas están auto-asociadas respectivamente y se encuentran alternadamente rodeando a los cationes de Mg^{2+} los cuales están colocados al centro de un eje de tres planos⁸⁶.

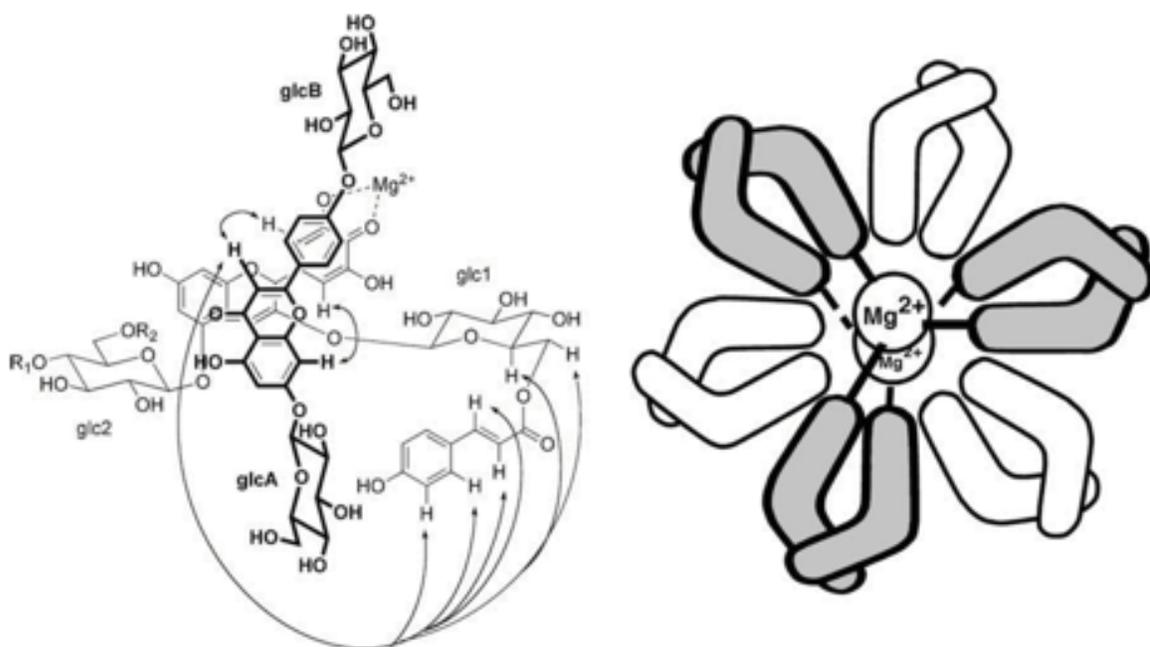


Figura 25. (Izquierda) Disposición propuesta del apilamiento quiral de a flavona (1) y la antocianina (2) en la molécula de cianosalvianina, el compuesto de líneas gruesas al frente corresponde a (1) y el compuesto de líneas delgadas detrás corresponden a (2); las flechas indican el acoplamiento a larga distancia NOE. **(Derecha)** Modelo esquemático de la cianosalvianina; los dos cationes Mg^{2+} se encuentran al centro, las antocianinas (color gris) y flavonas (color blanco) se encuentran rodeando a los cationes⁸⁶.

En la siguiente tabla se presenta la información más importante sobre la composición química de las metalo-antocianinas hasta ahora reportadas:

Tabla 2. Composición química de las metalo-antocianinas.

Metalo-antocianina	Fuente	Antocianina	Flavona	Catión metálico	Proporción
Commelinina ^{66, 70 y 76}	<i>Commelina communis</i>	malonil-awobanina	flavocommelina	Mg ²⁺	6:6:2
Protocianina ^{79 y 80}	<i>Centaurea cyanus</i>	centauro-cianina	7-O-glucorónido-4'-O-(6-O-malonil-glucosil apigenina	Fe ³⁺ Mg ²⁺ Ca ²⁺	6:6:1:1:2
Protodelfina ^{82 y 85}	<i>Salvia patens</i>	malonil-awobanina	7,4'-di-O-β-D-glucosil apigenina	Mg ²⁺	6:6:2
Cianosalvianina ⁸⁶	<i>Salvia uliginosa</i>	acetil-malonil-awobanina	7,4'-di-O-glucosil apigenina	Mg ²⁺	6:6:2

Capítulo

4 Objetivos del estudio

Realizar un análisis químico de las flores de un ejemplar de *Commelina dianthifolia* Delile para identificar el(los) compuesto(s) responsables de producir el color azul característico en estas flores.

Relacionar la alta susceptibilidad de degradación del colorante azul bajo diversas condiciones (pH, concentración, humedad, temperatura y luz) con la naturaleza química de sus componentes.

Establecer un perfil químico del colorante azul que sirva como referencia para su identificación en bienes (muebles e inmuebles) del patrimonio cultural.

Capítulo

5 Proceso experimental y resultados

5.1 Colecta

La recolección de las flores de la planta (Imágenes 17 y 18) se realizó cerca del Instituto de Química en Ciudad Universitaria, durante los meses de julio y agosto del 2013 (temporada de lluvias). Se cortó únicamente los botones de la flor, dejando la bráctea intacta para que los botones restantes florecieran al siguiente día. Se realizaron 12 colectas consecutivas y se reunió una cantidad de 250 g de flor fresca.



Imagen 17. *Commelina dianthifolia* Delile, inflorescencia (acercamiento).



Imagen 18. *Commelina dianthifolia* Delile, ejemplar completo.

El Departamento de Ecología y Recursos Naturales de la Facultad de Ciencias de la UNAM reporta que en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel se encuentran las especies *Commelina coelestis* Willd var. *coelestis* Willd, *Commelina tuberosa* L. y *Commelina difusa* Burm. f.⁸⁶

5.2 Preparación del ejemplar herborizado

El ejemplar a herborizar se escogió siguiendo las recomendaciones dadas por el Herbario Nacional MEXU del Instituto de Biología de la UNAM. Se colectó la hierba completa, incluyendo la raíz (sin tierra), y se eligió un ejemplar que tuviese flores. Para eliminar el exceso de agua de las raíces tuberosas, éstas se cortaron longitudinalmente y se presionaron entre dos hojas de papel periódico. Posteriormente, se colocó el ejemplar entre hojas de papel periódico secas y dos cartones corrugados y con ayuda de un lazo se amarraron fuertemente para prensarlo (Imagen 19). Finalmente, la planta se dejó en un horno de secado por cuatro días a una temperatura aproximada de 50 °C.



Imagen 19 . Ejemplar colectado de *Commelina* sp. herborizado.

Una vez preparado el herborizado de la planta se depositó en el Herbario Nacional para su determinación (Figura 26). El ejemplar colectado correspondió a la especie *Commelina dianthifolia* Delile, la determinación se llevó a cabo por la Bióloga Yareli Joselin Cadena Rodríguez.

<i>Datos de la colecta</i>
Localidad: Pedregal de San Ángel, Ciudad Universitaria, Distrito Federal.
Altitud: 2000 m. Latitud: N 19° 32' Longitud: W 99° 17'.
Hierba (30 cm) con flores color azul.
Fecha colecta: 30 junio 2014.
Nombre del colector: Araceli Gabriela Galindo Ruiz

Figura 26. Ficha de datos de la colecta para el Herbario Nacional

5.3 Generalidades

A continuación se enlistan las características y generalidades del material, reactivos, equipos y técnicas empleados(as) a lo largo del proceso experimental.

Reactivos	Preparación
Revelador <i>oleum</i>	Preparar una disolución de 100 mL de ácido acético (CH ₃ COOH) a la cual se le agrega 5 mL de ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄) y 20 mL H ₂ O. Calentar durante 3 minutos a una temperatura no mayor de 50 °C.
Software	
CS ChemDraw Ultra	Se empleó para trazar las estructuras químicas, reacciones y fragmentaciones de los compuestos
MestReNova	Espetros de Resonancia Magnética Nuclear
Condiciones HPLC	
Fase estacionaria	Sílica gel C ₁₈
Disolventes	Acetonitrilo A Agua (1% Ácido trifluoroacético TFA) B
Gradiente de elución (30 min)	inicio A:B (1:9) → final A:B (3:7)
Flujo	2 mL/min
Temperatura	40 °C
Detectores UV	380 nm y 533 nm

Material / Equipo	Descripción
Cromatofolios de sílica gel	MACHEREY-NAGEL Capa 0.20 mm. Sílica gel 60 con indicador fluorescente UV ₂₅₄
Cromatoplasmas de sílica gel C ₁₈	MACHEREY-NAGEL Capa 0.25 mm sílica gel C ₁₈ con indicador fluorescente UV ₂₅₄
Lámpara UV	SPECTROLINE Modelo CM-10 Onda corta UV 254 nm
Sephadex LH-20	SIGMA CHEMICAL Bead size 25-100 μ
Liofilizadora	LABCONCO LYPH-LOCK 4.5
Rotavapor	BÜCHI R-210
Bomba de vacío	BÜCHI V-700
Baño de agua	BÜCHI B-491
Equipo RMN	JEOL Eclipse 300 MHz BRUKER Avance III 400 MHz VARIAN Unity Inova 500 MHz
Equipo UV-vis	SHIMADZU U160
Equipo FT-IR	BRUKER Tensor 27
Equipo DC	JASCO J720
Equipo ESI-EM	BRUKER micrOTOF II
Equipo HPLC	AGILENT 1200 Series Binary SL WATERS 2996 UV arreglo de diodos LUNA C ₁₈ 100 x 2 mm, tamaño de partícula 3 μ m Detector UV a 380 y 533 nm
Microscopio SEM-EDS	JEOL JSM 5600 LV Detector de rayos X característicos.

5.4 Proceso de extracción

Inmediatamente después de realizar cada colecta, se retiró de las flores la corola y el tallo (Imagen 20). Los pétalos se maceraron en H₂O destilada a una temperatura de 4°C por 24 horas (Imagen 21); transcurrido este tiempo, se filtró el extracto y se realizó una extrusión manual a los residuos del material vegetal; se realizaron 3 lavados con H₂O para obtener la mayor cantidad posible de colorante (Imagen 22). El extracto se concentró a presión reducida con ayuda de un rota- evaporador y un baño de agua a una temperatura no mayor a 45°C (Imagen 23). Para eliminar el agua remanente, se liofilizó el extracto, obteniéndose 3.3354 g de producto seco (Imagen 24).



Imagen 20. Flores colectadas, sin tallo ni corola

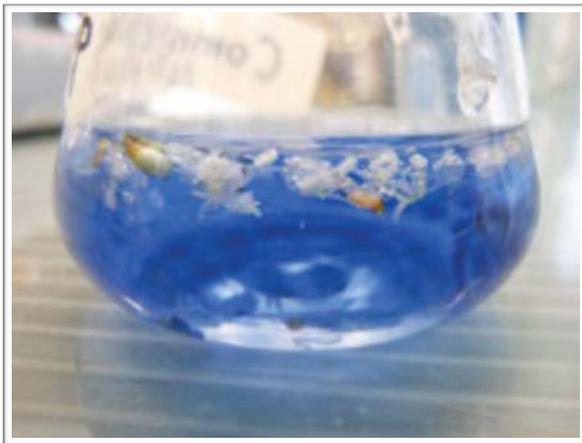


Imagen 21. Maceración de los pétalos en H₂O destilada.



Imagen 22. Extrusión manual del residuo vegetal .



Imagen 23. Concentración del extracto crudo.



Imagen 24. Extracto seco del colorante de las flores de *Commelina dianthifolia* Delile .

5.5 Estudios preliminares del extracto crudo

5.5.1 Pruebas de solubilidad

Se encontró que el extracto crudo del colorante es altamente soluble en agua, muy poco soluble en metanol e insoluble en disolventes orgánicos menos polares como etanol y acetona (Imagen 25). Como se aprecia en la imagen, el colorante produce un color azul intenso en agua.

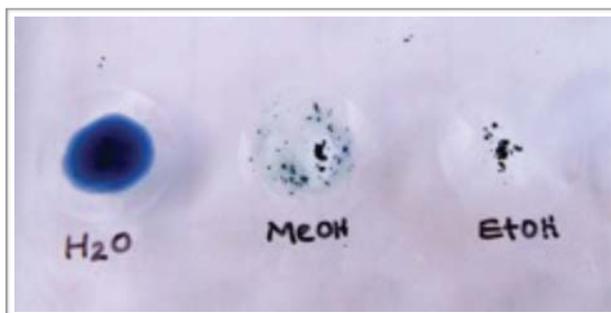


Imagen 25. Solubilidad del colorante crudo en diferentes disolventes.

5.5.2 Pruebas Cromatografía en Capa Delgada (CCD)

Se realizaron ensayos en cromatoplasmas de sílica gel para conocer el comportamiento de los diferentes componentes del extracto crudo frente a diversos tipos de eluyentes. A simple vista y bajo luz UV₂₅₄, el extracto parece tener dos componentes mayoritarios: uno color azul intenso de alta polaridad y otro componente color amarillo de mediana polaridad. En placas de sílica gel C₁₈ se observaron nuevamente estas dos manchas principales pero en orden inverso de polaridad. En algunos puntos de aplicación se logra apreciar la retención de impurezas color café (Imagen 26).

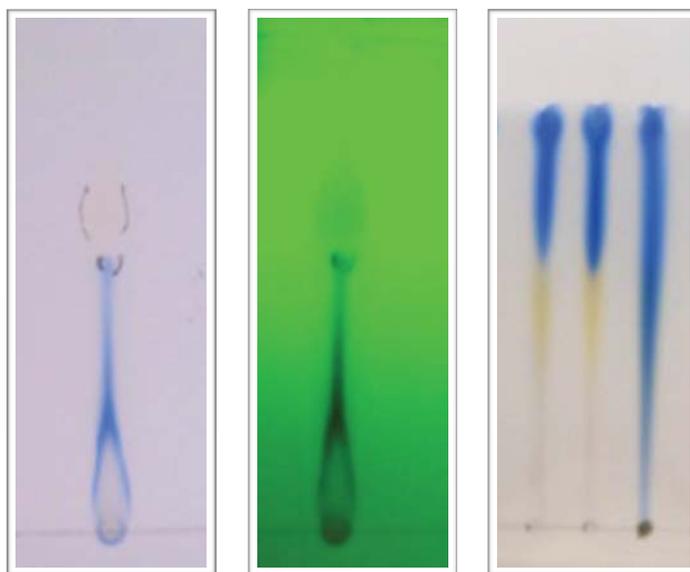


Imagen 26. Cromatoplasmas de sílica gel (izquierda), sílica gel bajo luz UV₂₅₄ (centro) y sílica gel C₁₈ (derecha).

5.5.3 Estabilidad térmica

Al realizar la concentración del extracto en el rota-evaporador se observó que la estabilidad del colorante es susceptible al aumento de temperatura. Una exposición prolongada en el baño de agua a una temperatura de 60 °C provocó que el color azul comenzara a cambiar de color a un tono verdoso, posteriormente violeta, seguido de gris y finalmente se volvió marrón (Imagen 27). Se colocó en un tubo capilar un poco del extracto en disolución acuosa en un aparato de Fischer. Se

encontró que a una temperatura de 75°C el compuesto se descompone, se observaron los mismos cambios de coloración mencionados.

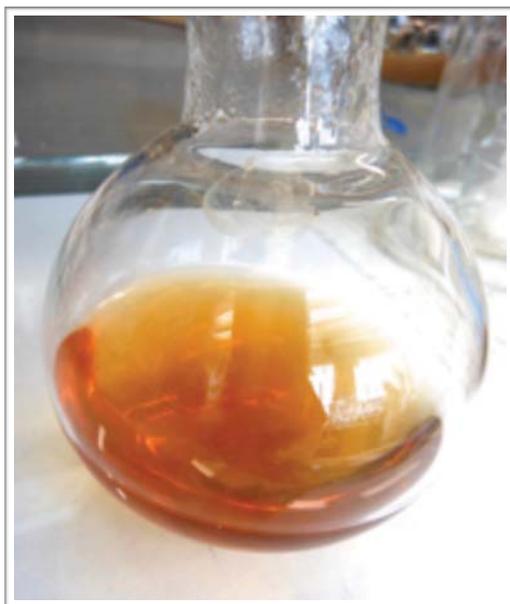


Imagen 27. Color del colorante después de haber sido sometido a un calentamiento a 60°C.

5.5.4 Estabilidad al cambio de pH

Se sometió el colorante a diversos valores de pH en disolución acuosa y se encontró que éste cambia a rojo intenso y se mantenía estable en valores de pH ácidos y que en valores de pH básicos el colorante se descompone. Se prepararon disoluciones acuosas de HCl a valores aproximados de pH de 1, 2, 3, 4, 5, y 6; para preparar las disoluciones básicas a pH de 9, 11 y 13 se empleó KOH; y se usó una tira indicadora como referencia. Una vez listas las disoluciones, se agregó una punta de espátula del colorante a cada uno de los viales. En los primeros 2 minutos se observó un cambio de coloración, para los viales de pH ácido el color pasó de azul a rojo pasando por tonalidades intermedias de color violáceo, mientras que en los viales de pH básico el color pasó de azul a verde pálido (Imagen 28). En días posteriores las disoluciones a pH 1, 2 y 3 conservaron una tonalidad rojiza, mientras que las disoluciones restantes se descompusieron produciendo un color amarillo en las disoluciones.



Imagen 28. Variación del color de las disoluciones del colorante conforme al pH transcurridos 2 minutos.

5.5.5 Espectroscopía y punto de fusión

Se le realizó a la muestra del extracto crudo estudios de Espectroscopía de Infrarrojo (FT-IR) y de Espectroscopía Ultravioleta/visible(UV-vis). Las bandas principales de cada espectro se resumen a continuación, los valores del espectro UV-vis son similares a los valores para el complejo de commelinina mencionados en la sección 3.8.1 y en las Figuras 16 y 17. Para tomar el punto de fusión se colocaron pequeñas partículas del extracto en un tubo capilar y se colocó en un aparato de Fischer. A 60°C se observó que la muestra tomó un color marrón sin llegar a fundir completamente.

*Extracto crudo

Punto de fusión	60 °C descomposición.
FT-IR (cm ⁻¹)	3197 (ancha), 2933, 1580 (intensa), 1401, 1276, 1061(intensa), 775 y 618.
UV-vis (nm)	641, 589, 319 y 271.

5.6 Purificación del extracto crudo (Fraccionamiento primario)

A partir de las pruebas preliminares (cambio coloración conforme el pH, bandas de absorción similares al compuesto de commelinina, solubilidad y susceptibilidad a temperaturas altas), se intuye que el colorante de la *Commelina dianthifolia* Delile puede estar compuesto por una metalo-antocianina. Debido al gran tamaño molecular que presentan dichos complejos, se decidió hacer una purificación mediante una filtración en gel.

Para purificar el extracto crudo se monta una columna con Sephadex LH-20 de 60 x 2 cm de d.i. previamente acondicionada en agua. Para preparar el punto de aplicación se pesó 1.0 g del extracto y se disolvió en la mínima cantidad de agua. Como fase móvil se hizo un gradiente empleando como disolventes Agua (A) y Metanol (B) en la siguiente proporción de A:B 100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20. La colecta de cada fracción se realizó por discriminación visual de las manchas presentes a lo largo de la columna (Imagen 29-31), obteniéndose un total de 15 fracciones (Tabla 3). Estas fracciones se concentraron hasta sequedad mediante destilación a presión reducida en un baño de agua a una temperatura no mayor de 45°C.

Tabla 3. Primer fraccionamiento del extracto crudo

Fracción	Color disolución	No. manchas observadas bajo UV ₂₅₄	Fracción	Color disolución	No. manchas observadas bajo UV ₂₅₄
COM4-1	azul grisáceo	2	COM4-9	amarillo	4
COM4-2	azul	1	COM4-10	amarillo	4
COM4-3	café	3	COM4-11	amarillo	3
COM4-4	café	2	COM4-12	amarillo	3
COM4-5	magenta	4	COM4-13	amarillo	3
COM4-6	rosa	3	COM4-14	amarillo	2
COM4-7	naranja	3	COM4-15	amarillo	2
COM4-8	naranja	3			



Imagen 29-31. (De izquierda a derecha) Progreso de la purificación en Sephadex LH-20 del colorante.

Se hizo un seguimiento de las fracciones colectadas empleando cromatoplasmas de sílica gel C_{18} . La fracción COM4-2 corresponde al colorante azul “purificado” de la *C. dianthifolia* Delile. Esta fracción se llevó a sequedad empleando un rota-evaporador y un equipo de liofilización y se obtuvo un polvo azul ultramar (Imagen 32). A esta muestra se le realizaron análisis espectroscópicos: Infrarrojo (FT-IR), Ultravioleta-visible (UV-vis), Dicroísmo circular (DC), Resonancia Magnética Nuclear (RMN); y Espectrometría de Masas con la técnica de ionización por Electro-spray en modo negativo (ESI-MS), Análisis Directo en Tiempo Real (DART-MS) e Impacto Electrónico (EI-MS). Así también, la muestra del colorante purificado y del extracto crudo se mandaron a ser analizadas por

Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC). A continuación se presentan los principales datos de estos análisis:

* **Colorante azul “purificado” (Fracción COM4-2)**



Imagen 32. Colorante azul “purificado” seco (Fracción COM4-2).

Punto de fusión	>250 °C (Se descompone)
Solubilidad	Agua
Apariencia física	Sólido amorfo color azul intenso
UV-vis (nm)	643, 589, 315 y 273
UV-vis (nm) + HCl 3%	528, 318 y 274
DC (nm)[0.27 M]	273(+) 309 (-) 338(+) 377 (-)
FT-IR (cm ⁻¹)	3153, 2932, 1569, 1394, 1274, 1063, 527.
¹ H-RMN (300 MHz, DMSO-d ₆)	δ 8.10 (d, <i>J</i> =8.8 Hz, 2H), 7.98 (d, <i>J</i> =8.7 Hz, 1H), 7.35 (d, <i>J</i> =8.7 Hz), 7.20 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 2H), 6.99 (d, <i>J</i> =5.3 Hz, 1H), 6.93 (s), 6.89 (d, <i>J</i> =4.1 Hz, 2H), 6.77 (m), 6.55 (s), 6.36 (s), 6.30 (s), 5.04 (d, <i>J</i> =7.2 Hz, 1H), 4.60 (m, 1H).

¹ H-RMN (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ + D ₂ O)	δ 8.03 (d, <i>J</i> =8.7 Hz, 2H), 7.93 (d, <i>J</i> =9.0 Hz, 1H), 7.33 (d, <i>J</i> =4.1 Hz, 1H), 7.29 (d, <i>J</i> = 3.6 Hz, 1H), 7.19 (d, <i>J</i> =8.9 Hz, 2H), 6.93 (d, <i>J</i> =8.8 Hz, 1H), 6.85 (s, 0.5H), 6.85 (s, 0.5H), 6.73 (d, <i>J</i> =8.6 Hz), 6.35 (d, <i>J</i> =10.4 Hz), 4.99 (d, <i>J</i> =7.0 Hz, 1H), 4.58 (d, <i>J</i> =9.0 Hz, 1H).
¹ H-RMN (400 MHz, CD ₃ OD+TFA)	δ 8.86 (s, 1H), 7.76 (s, 2H), 7.38 (d, <i>J</i> =15.9 Hz, 1H), 7.23 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz, 1H), 6.99 (d, <i>J</i> =2.0 Hz, 1H), 6.92 (d, <i>J</i> =1.9 Hz, 1H), 6.71 (2, 0.5H), 6.71 (d, <i>J</i> =8.5 Hz, 2H), 6.26 (d, <i>J</i> =15.9 Hz, 1H), 5.43 (d, <i>J</i> =7.8 Hz, 1H), 5.18 (d, <i>J</i> =7.8 Hz, 1H).
IE-EM (<i>m/z</i>)	367, 358, 346, 345 (pico base) y 344.
ESI(-)-EM (<i>m/z</i>) H ₂ O:EtOH (1:1)	901.95 (pico base), 887.95, 873.95, 855.97, 830.02 y 812.02
ESI(-)-EM (<i>m/z</i>) H ₂ O:MeOH (1:1)	887.74 (pico base), 873.75, 855.76, 843.81, 829.82, 811.83, 642.02 y 606.10

Se reagrupan las fracciones con base en su color y en el factor de retención de los componentes observados en CCD bajo luz visible y luz UV_{λ254}. Las fracciones COM4-3 y COM4-4 se juntan y se les denomina como Fracciones cafés; las fracciones COM4-5 a la COM4-8 se les denomina como fracciones moradas; y las fracciones COM4-9 a la COM4-15 se les denomina como fracciones amarillas.

5.6.1 Separación del colorante azul “purificado” (Fraccionamiento secundario)

Con base en los resultados anteriores, se infiere que el colorante azul “purificado” (Fracción COM4-2) está conformado por distintas moléculas de tipo flavonoide y se decide hacer una separación del mismo en fase reversa y en condiciones ligeramente ácidas en la fase móvil. Se montó una columna de Sílica gel C₁₈ con medidas de 18 x 1.5 cm, como punto de aplicación se impregnó en la sílica gel el colorante purificado previamente disuelto en MeOH (2% HCl), para la fase móvil se empleó un gradiente de disolventes: H₂O-2% HCl (A) y MeOH (B), empezando con una proporción de A:B (3:2), posteriormente se aumentó la fuerza de la fase móvil a A:B (1:1) y la última subfracción se obtuvo empleando únicamente MeOH (2% HCl). Se obtuvo un total de 9

subfracciones las cuales se llevaron a sequedad mediante destilación a presión reducida a una temperatura no mayor de 50°C (Tabla 4). Se registró el progreso de la columna mediante CCD de sílica gel C₁₈ (Imagen 33 y 34).

Tabla 4. Separación del colorante azul “purificado” (fraccionamiento secundario).

Subfracción	Color disolución	No. manchas observados en UV ₂₅₄
CC-1	Café	1
CC-2	marrón	3
CC-3	marrón	3
CC-4	rosa	2
CC-5	magenta	2
CC-6	magenta	2
CC-7	magenta	1
CC-8	rojo	1
CC-9	ámbar	2

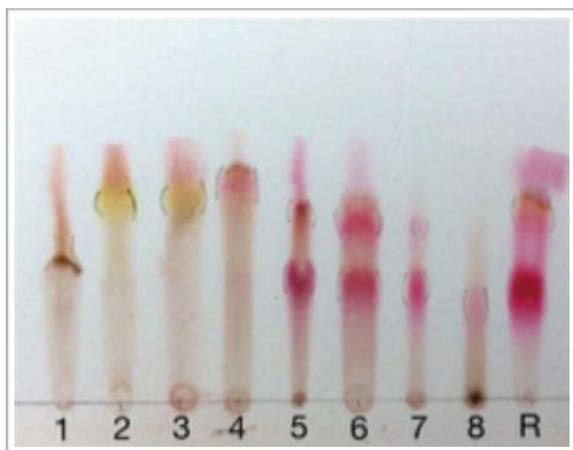


Imagen 33. Progreso de la columna, subfracciones CC-1 a CC-9 y referencia R (punto aplicación). Placa CCD de sílica gel C₁₈, luz visible.

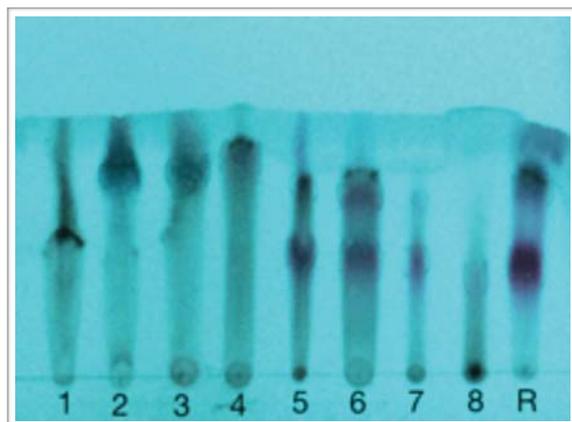


Imagen 34. Progreso de la columna, subfracciones CC-1 a CC-9 y referencia R (punto aplicación). Placa CCD de sílica gel C₁₈ de la Serie CC vista bajo luz UV₂₅₄.

La subfracción CC-1 (Imagen 35) presentó una sola mancha con R.f. de 0.66 y se envió a espectroscopía de FT-IR, UV-vis y EM para su análisis. La subfracción CC-2 (Imagen 36) al ser revelada con *óleum* mostró un compuesto mayoritario color amarillo con R.f 0.74, debido a la poca cantidad de muestra, fue analizada únicamente en RMN-¹H y EM. La subfracción CC-8 (Imagen 37) mostró una sola mancha en la placa con R.f en 0.37 y fue enviada a las espectroscopías de FT-IR, UV-vis, RMN-¹H, RMN-¹³C y a EM.

* **Subfracción CC-1**

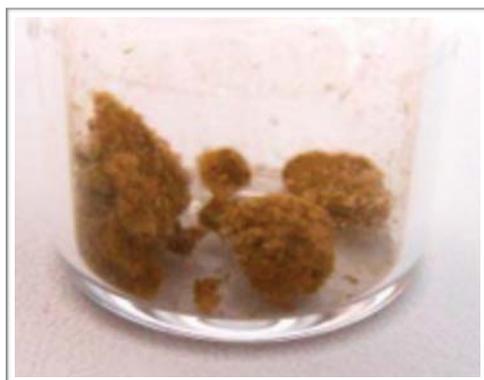


Imagen 35. Subfracción CC-1 seca.

Apariencia física	sólido amorfo color marrón
Solubilidad	H ₂ O y MeOH
FT-IR (cm ⁻¹)	3237 (banda ancha), 2952, 1720, 1636, 1438, 1224, 1134, 1066, 779 y 524.
UV-vis (nm)	207 y ~380 (débil)
DART (m/z)	180, 163, 145 (pico base), 127, 115, 97 y 80

* Subfracción CC-2



Imagen 36. Subfracción CC-2 seca.

Apariencia física	sólido amorfo color ámbar
Solubilidad	MeOH
^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6)	δ 13.43 (s, 0.5H), 13.40 (s, 0.5H), 8.09 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.21 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 6.99 (s, 0.5H), 6.97 (s, 0.5H), 6.89 (s, 0.5H), 6.88 (s, 0.5H), 5.04 (d, $J=6.9$ Hz, 1H), 4.61 (d, $J=9.4$ Hz, 0.5H), 4.58 (d, $J=9.4$ Hz, 0.5H), 4.18 (t, $J=9.1$ Hz, 0.5H), 3.99 (t, $J=9.2$ Hz, 0.5H), 3.90 (s, 1.5H), 3.87 (s, 1.5H), 3.70 (dd, $J=2.8, 10.8$ Hz, 1H), 3.5-3.3 (m, 5H), 3.3 (m, 1H), 3.2 (m, 1H), 3.1-3.0 (m, 2H).

* Subfracción CC-8



Imagen 37. Subfracción CC-8 seca.

Apariencia física	sólido amorfo color magenta
Solubilidad	H ₂ O y MeOH
FT-IR (cm ⁻¹)	3073 (banda ancha), 2931, 1701, 1635, 1604, 1513, 1446, 1404, 1286, 1167, 1067, 831, 804, 623 y 549.

UV-vis (nm)	536, 290 y 211.
¹ H-RMN (400 MHz, CD ₃ OD+TFA)	<p>Compuesto CC-8.1</p> <p>δ 8.89 (s, 1H), 7.77 (s, 2H), 7.35 (d, <i>J</i>=15.9 Hz, 1H), 7.28 (d, <i>J</i>=8.6 Hz, 2H), 6.97 (d, <i>J</i>=2.0 Hz, 1H), 6.89 (d, <i>J</i>=1.2 Hz, 1H), 6.76 (d, <i>J</i>=8.6 Hz, 2H), 6.23 (d, <i>J</i>=15.9 Hz, 1H), 5.45 (d, <i>J</i>=7.8 Hz, 1H), 5.18 (d, <i>J</i>=8.0 Hz, 1H), 4.52 (dd, <i>J</i>=2.9, 11.8 Hz, 1H), 4.50 (dd, <i>J</i>=7.8, 13.1, 1H), 3.98 (dd, <i>J</i>=7.4, 13.1 Hz, 1H), 3.96 (ddd, <i>J</i>=3, 8, 11.5 Hz, 1H), 3.79 (dd, <i>J</i>=9.5, 8 Hz, 1H), 3.77 (dd, <i>J</i>=8, 9.5 Hz, 1H), 3.73 (dd, <i>J</i>=5.3, 11.3 Hz, 1H), 3.64 (m), 3.60 (t, <i>J</i>=9.5 Hz, 1H), 3.59 (t, <i>J</i>=9.5 Hz, 1H), 3.53 (m), 3.45 (m).</p> <p>Compuesto CC-8.2</p> <p>δ 8.86 (s, 1H), 7.76 (s, 2H), 7.37 (d, <i>J</i>=15.9 Hz, 1H), 7.22 (d, <i>J</i>=8.5 Hz, 2H), 6.99 (d, <i>J</i>=2.1 Hz, 1H), 6.91 (d, <i>J</i>=2.0 Hz, 1H), 6.71 (d, <i>J</i>=8.7 Hz, 2H), 6.25 (d, <i>J</i>=15.9 Hz, 1H), 5.45 (d, <i>J</i>=7.8 Hz, 1H), 5.19 (d, <i>J</i>=8.0 Hz, 1H), 4.48 (dd, <i>J</i>=4.6, 11.3 Hz, 1H), 4.47 (dd, <i>J</i>=7.5, 11.5, 1H), 4.53 (dd, <i>J</i>=2, 11 Hz, 1H), 4.21 (dd, <i>J</i>=5.7, 11.2 Hz, 1H), 3.96 (ddd, <i>J</i>=3, 8, 11 Hz, 1H), 3.79 (m), 3.77 (m), 3.62 (t, <i>J</i>=9.0 Hz), 3.79 (m), 3.56 (t, <i>J</i>=9.1 Hz, 1H), 3.49 (t, <i>J</i>=9.3 Hz), 3.45 (m).</p> <p>Compuesto CC-8.3</p> <p>δ 8.85 (s, 1H), 7.76 (s, 2H), 7.37 (d, <i>J</i>=15.9 Hz, 1H), 7.22 (d, <i>J</i>=8.6 Hz, 2H), 6.99 (d, <i>J</i>=2.1 Hz, 1H), 6.91 (d, <i>J</i>=2.2 Hz, 1H), 6.71 (d, <i>J</i>=8.7 Hz, 2H), 6.26 (d, <i>J</i>=15.9 Hz, 1H), 5.42 (d, <i>J</i>=7.8 Hz, 1H), 5.19 (d, <i>J</i>=8.0 Hz, 1H), 4.53 (dd, <i>J</i>=4, 12 Hz, 1H), 4.24 (dd, <i>J</i>=5.6, 11.4, 1H), 4.51 (dd, <i>J</i>=3, 11.3 Hz, 1H), 4.47 (dd, <i>J</i>=8.8, 12.8 Hz, 1H), 3.96 (m, 1H), 3.82 (m), 3.80 (m), 3.64 (m), 3.56 (t, <i>J</i>=9.1 Hz, 1H), 3.53 (m), 3.50 (m).</p>
¹³ C-RMN (126 MHz, CD ₃ OD)	δ 169.2, 169.1, 163.9, 161.3, 156.8, 156.5, 147.7, 146.9, 146.2, 145.8, 133.9, 131.4, 126.8, 119.8, 116.7, 114.8, 113.0, 112.9, 106.0, 102.9, 102.2, 97.2, 78.11, 77.7, 75.5, 74.8, 74.3, 72.3, 71.0, 65.1, 64.6.
DEPT 135 RMN (126 MHz, CD ₃ OD)	δ 147.7, 133.9, 131.4, 116.7, 114.8, 112.9, 106.0, 102.9, 102.2, 97.2, 78.11, 77.7, 75.5, 74.8, 74.3, 72.3, 71.0, 65.1 (señal negativa), 64.6 (señal negativa).
DEPT 90 RMN (126 MHz, CD ₃ OD)	δ 147.7, 133.9, 131.4, 116.7, 114.8, 112.9, 106.0, 102.9, 102.2, 97.2, 78.11, 77.7, 75.5, 74.8, 74.3, 72.3, 71.0.
ESI(+)-EM (<i>m/z</i>)	919.5, 859.20, 873.20 y 773.20

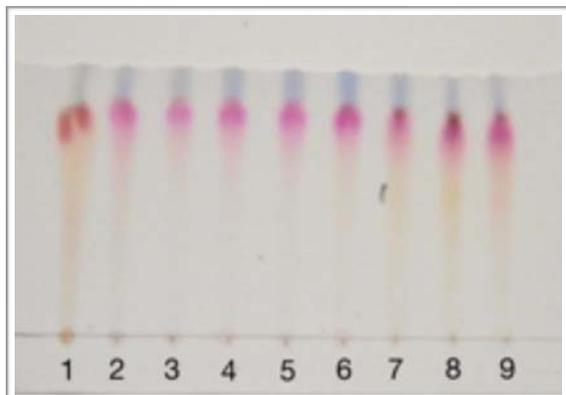
5.7 Purificación de las fracciones moradas (fraccionamiento secundario)

De la primera separación de extracto crudo realizada con Sephadex LH-20, se eligieron las fracciones moradas (COM4-5 hasta COM4-8) para realizar un segundo fraccionamiento. A esta separación se le denomina como Serie CA. Se montó una columna de Sílica gel C₁₈ con medidas de 18 x 1.5 cm di., para la fase móvil se empleó un gradiente de disolventes: H₂O-1% HCl (A) y MeOH (B), empezando con una proporción de A:B (2:1), posteriormente se aumentó la fuerza eluyente a A:B (1:1) y la última fracción se obtuvo empleando únicamente MeOH (2% HCl). De esta columna se obtuvieron 24 subfracciones, las cuales se colectaron con base en las manchas observadas a lo largo de ésta (Tabla 5). Se realizó un seguimiento por CCD de sílica gel C₁₈ de las subfracciones colectadas y se efectuó una re-agrupación de las mismas con base en la similitud de las manchas bajo luz visible y UV₂₅₄, así como su R.f (Imágenes 38-43).

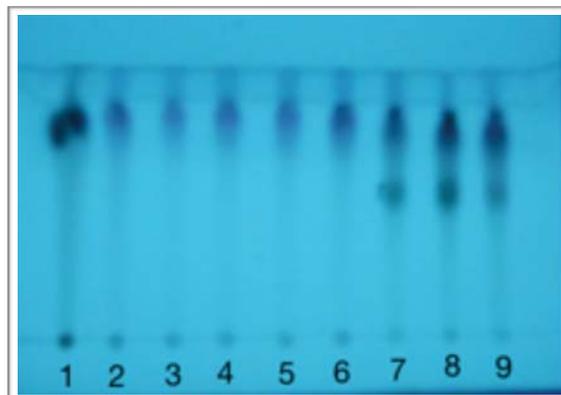
Tabla 5. Purificación de las fracciones moradas (fraccionamiento secundario).

Subfracción	Color disolución	Manchas observadas bajo UV ₂₅₄	Subfracción	Color disolución	Manchas observadas bajo UV ₂₅₄
CA-1	rosa claro	3	CA-13	rosa	3
CA-2	rosa	2	CA-14	rosa	3
CA-3	rosa	2	CA-15	rosa	3
CA-4	rosa	2	CA-16	rosa	2
CA-5	rosa	2	CA-17	rosa	2
CA-6	rosa	2	CA-18	rosa	2
CA-7	rosa	3	CA-19	rosa	2
CA-8	rosa	3	CA-20	fiusha	1
CA-9	rosa	3	CA-21	fiusha	1
CA-10	rosa claro	3	CA-22	fiusha	2
CA-11	rosa claro	2	CA-23	fiusha	3
CA-12	rosa claro	3	CA-24	rosa	2

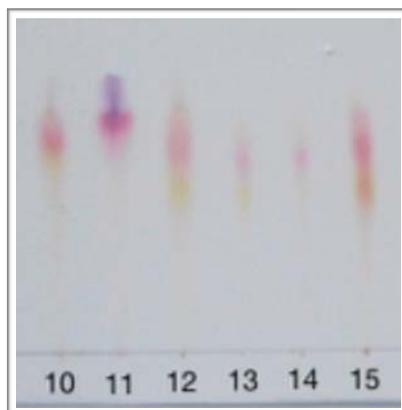
38)



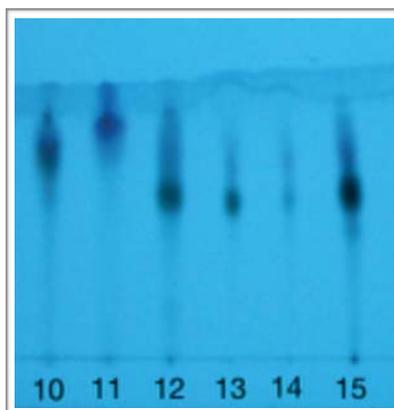
39)



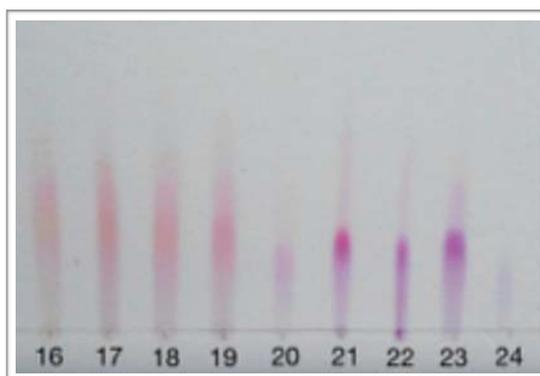
40)



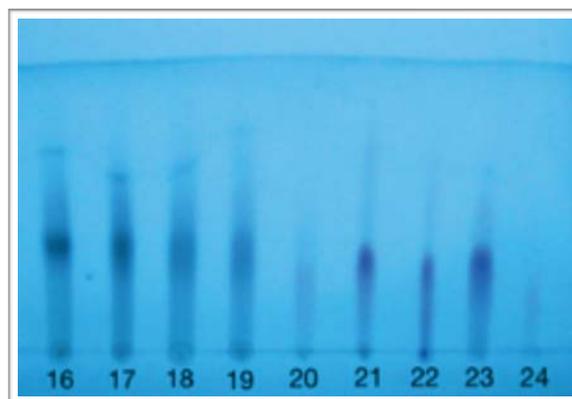
41)



42)



43)



Imágenes 38-43. Progreso de la columna, subfracciones CA-1 a CA-27. CCD sílica gel C₁₈ vistas bajo luz visible (izquierda) y luz UV₂₅₄ (derecha).

Muestra CA-A2

De las subfracciones CA-2 a la CA-5 se observan dos manchas, una color azul y otra color rosa, la cual es mucho más intensa bajo UV₂₅₄, por lo que se reúnen las fracciones obteniéndose 1.3 mg de muestra. Debido a la poca cantidad de muestra únicamente se analiza por ¹H-RMN.

Muestra CA-A1

De esta separación se observa que las subfracciones CA-20 a la CA-23 presentan una sola mancha con el mismo R.f. color magenta (Imagen 44). Se recuperan 3.5 mg y a esta muestra se le realizan los análisis de espectroscopía y espectrometría (FT-IR, ¹H-RMN, ESI⁺ y FAB⁺) para caracterizarla.

* Compuesto CA-A1



Imagen 44. Subfracción CA-A1.

Apariencia	Líquido viscoso color magenta
UV-vis (nm)	581, 306.
FT-IR (cm ⁻¹)	2954 (banda ancha), 1700 (muy intensa), 1447, 1202, 1167, 804, 617, 517.

¹ H-RMN (400 MHz, CD ₃ OD)	δ 8.90 (s, 1H), 7.77 (s, 2H), 7.38 (d, <i>J</i> =15.9 Hz, 1H), 7.30 (d, <i>J</i> =8.5 Hz, 2H), 7.00 (d, <i>J</i> =1.9 Hz, 1H), 6.90 (d, <i>J</i> =1.7, 1H), 6.76 (d, <i>J</i> =8.5 Hz, 2H), 6.24 (d, <i>J</i> =15.9 Hz, 1H), 5.41 (d, <i>J</i> =7.8 Hz, 1H), 5.14 (d, <i>J</i> =7.8 Hz, 1H), 4.48-4.48 (m, 2H), 3.98 (dd, <i>J</i> =1.0, 3.0 Hz, 1H), 3.95 (ddd, <i>J</i> =1.0, 3.0, 3.3 Hz, 1H), 3.78 (dd, <i>J</i> =8.0, 9.5 Hz, 1H), 3.74 (dd, <i>J</i> =8.0, 9.5 Hz, 1H), 3.71 (m, 1H), 3.62 (t, <i>J</i> =7.1 Hz, 1H), 3.57 (ddd, <i>J</i> =3.5, 7.0, 9.5 Hz, 1H), 3.55 (t, <i>J</i> =6.4 Hz, 1H), 3.53 (t, <i>J</i> =9.5 Hz, 1H), 3.42 (t, <i>J</i> =9.5 Hz, 1H).
FAB(+)-EM (<i>m/z</i>)	176, 226, 349, 393, 437, 453, 481 (matriz: alcohol nitrobenílico) 91, 19, 105, 129, 165, 181, 223, 303 (matriz: glicerol).
ESI(+)-EM (<i>m/z</i>)	827.2, 773.2 y 665.2

5.8 Purificación de las fracciones amarillas

Se realizó una CCD de sílica gel C₁₈ de las fracciones amarillas colectadas de la primera separación del extracto crudo con Sephadex LH-20 (COM4-9 a la COM4-15), en donde se observó que la mayoría de estas fracciones tienen entre 2 y 4 manchas. Algunas fracciones al ser manipuladas con diferentes disolventes, mostraron ser parcialmente solubles en agua, se aprovechó esta característica y se separó de estas muestras la parte soluble en agua y la parte restante se disolvió en metanol. Posteriormente, se realizó una cromatoplaqueta en sílica gel C₁₈ de estas separaciones empleando como fase móvil Agua:Metanol (1:1).

En la placa en C₁₈ se observó que la parte soluble en MeOH de la fracción V14 contenía una sola mancha con un R.f. de 0.48, la cual es amarilla a la luz visible y morada bajo luz UV₂₅₄. Del compuesto presente en la fracción V14 se obtuvieron 8 mg (Imagen 45), y se le realizaron las pruebas fisicoquímicas, espectroscópicas y espectrométricas para su caracterización.

* **Compuesto V14****Imagen 45.** Compuesto V14 seco.

Punto de fusión	185 °C comienza a fundir; 210 °C (descomposición)
Apariencia	Sólido amorfo color amarillo claro
Solubilidad	MeOH
UV-vis (nm)	214, 272, 334
FT-IR (cm ⁻¹)	3246, 2920, 1652, 1597, 1486, 1445, 1244, 1021, 831, 577, 504.
¹ H-RMN (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 13.50 (s, 0.5H), 13.49 (s, 0.5H), 7.98 (d, <i>J</i> =8.9 Hz, 2H), 6.93 (d, <i>J</i> =8.9 Hz, 2H), 6.87 (s, 0.5H), 6.86 (s, 0.5H), 6.85 (s, 0.5H), 6.84 (s, 0.5H), 4.85 (s, 1H), 4.60 (d, <i>J</i> =9.4 Hz, 0.5H), 4.57 (d, <i>J</i> =9.5 Hz, 0.5H), 4.43 (s, 1H), 4.18 (t, <i>J</i> =9.3 Hz, 0.5H), 3.99 (t, <i>J</i> =8.6 Hz, 0.5H), 3.90 (s, 1.5H), 3.87 (s, 1.5H), 3.69 (d, <i>J</i> =12.2 Hz).
¹ H-RMN (400 MHz, DMSO-d ₆ + D ₂ O)	δ 7.97 (d, <i>J</i> =9.0 Hz, 2H), 6.94 (d, <i>J</i> =8.9 Hz, 2H), 6.84 (s, 1H,), 6.83 (s, 0.5H), 6.83 (s, 0.5H), 4.59 (d, <i>J</i> =9.9 Hz, 0.5H), 4.57 (d, <i>J</i> =9.8 Hz, 0.5H), 4.15 (t, <i>J</i> =9.9 Hz, 0.5H), 3.98 (t, <i>J</i> =9.6 Hz, 0.5H), 3.89 (s, 1.5H), 3.86 (s, 1.5H), 3.68 (d, <i>J</i> =10.5 Hz, 1H), 3.35 (d, <i>J</i> =11.9, 6.7 Hz, 1H), 3.18-3.14 (m, 3H).
¹³ C-RMN (126 MHz, DMSO-d ₆)	δ 182.4, 182.04, 165.1, 164.0, 163.9, 161.4, 160.4, 159.7, 157.0, 156.9, 128.7, 121.1, 116.1, 109.8, 109.7, 104.7, 104.2, 103.1, 91.2, 90.3, 81.9, 81.7, 79.1, 73.0, 72.7, 71.0, 70.9, 70.4, 69.8, 61.8, 56.6, 56.4.
HMBC (DMSO-d ₆)	δ (128.3, 7.98), (116.3, 6.94), (102.8, 6.85), (89.9, 6.84), (90.8, 6.83), (72.6, 4.59), (69.4, 4.18), (69.9, 3.99), (56.2, 3.90), (56.2, 3.87), (61.5, 3.70), (61.5, 3.36), (78.3, 3.18), (81.4, 3.14), (70.62, 3.08)
FAB(+)-EM (<i>m/z</i>)	313, 339, 368, 391, 412, 430, 439, 473, 447, 600
ESI (+)-EM (<i>m/z</i>)	447.1, 469.1 y 915.2

5.9 Teñido del colorante natural en fibra de algodón

Con el fin de enfocar los análisis de este proyecto hacia el estudio de objetos de patrimonio cultural, se realizó un teñido con el colorante azul sobre fibras de algodón mordentado (la fibra se sumerge en un baño de agua a 80 °C durante una hora el cual contiene alumbre disuelto, la fibra se retira de la disolución y se deja secar). Debido a la poca cantidad obtenida del colorante, las cantidades con las que se decidió realizar el teñido son las mínimas necesarias para realizar los diversos análisis. Para ello se disuelve en un vial de vidrio el extracto crudo de las flores en la mínima cantidad de agua y se introduce una hebra del hilo de algodón mordentado en el vial para teñir la fibra, el proceso se realiza a temperatura ambiente. La hebra se retira inmediatamente después de haber sido sumergida y se deja secar a la sombra . El color resultante de la hebra es azul oscuro (Imagen 46). A la fibra de algodón se le realiza un análisis de espectroscopía de Infrarrojo empleando la técnica de ATR.

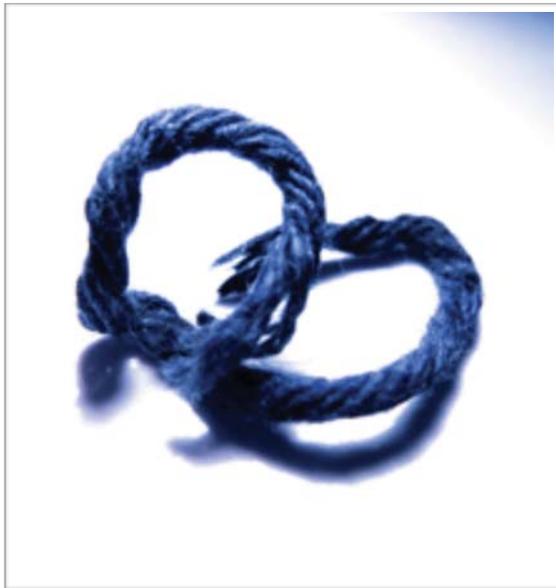


Imagen 46. Fibra de algodón mordentada y teñida con el colorante azul.

5. 10 Microscopía Electrónica de Barrido con detector de rayos-X característicos (SEM-EDS)

Se realizó un mapeo de análisis elemental químico empleando un microscopio electrónico de barrido y un detector de Rayos-X característicos (EDS), JEOL JSM 5600 LV, el análisis se realizó en el Instituto de Física, UNAM. Las condiciones para estas pruebas fue un a voltaje de 20 kV y un aumento de 80X y bajo vacío; la preparación de las muestras estuvo a cargo del Técnico del Instituto de Física, el Ingeniero en Química Mario Monroy Escamilla.

El estudio se realizó a cuatro muestras: Extracto crudo, colorante purificado (COM4-2 y COM3-2) y a la fibra de algodón mordentada y teñida; de cada muestra se obtuvo una imagen de la superficie del colorante y el análisis por EDS de cada imagen se realizó de manera global y puntual (puntos con un mayor contraste). A continuación, se muestran las imágenes SEM de las distintas muestras (Imagen 47-51); los espectros EDS y las tablas con las abundancias relativas de cada elemento químico se encuentran en el Subcapítulo 6.7 *Fibra teñida* de este trabajo.

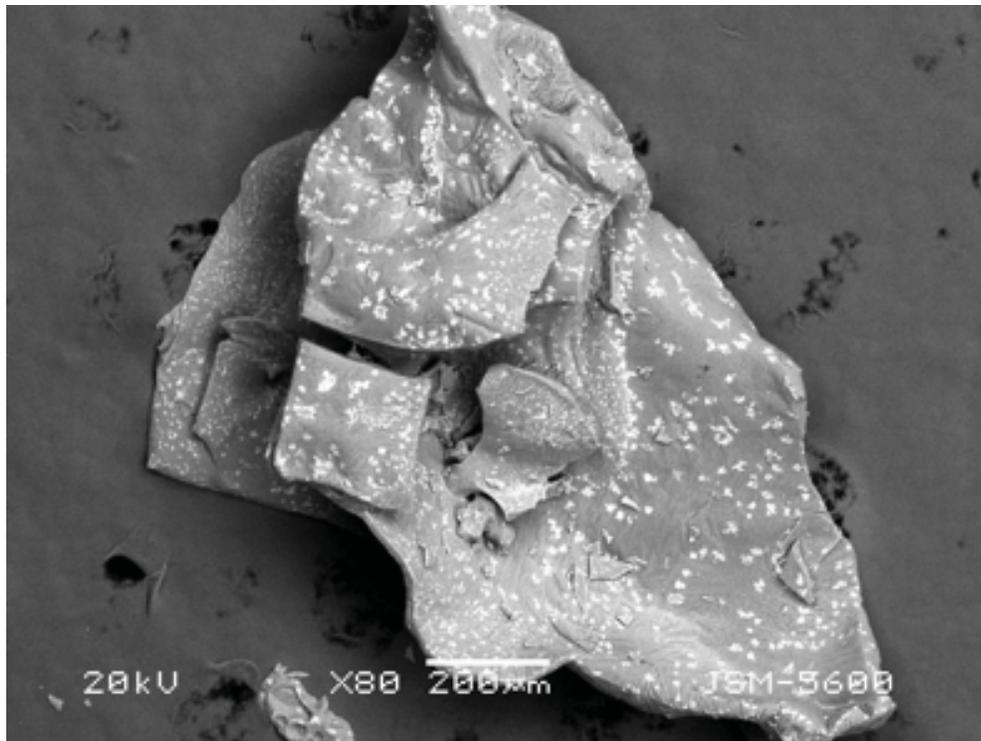


Imagen 47. Partícula del extracto crudo del colorante

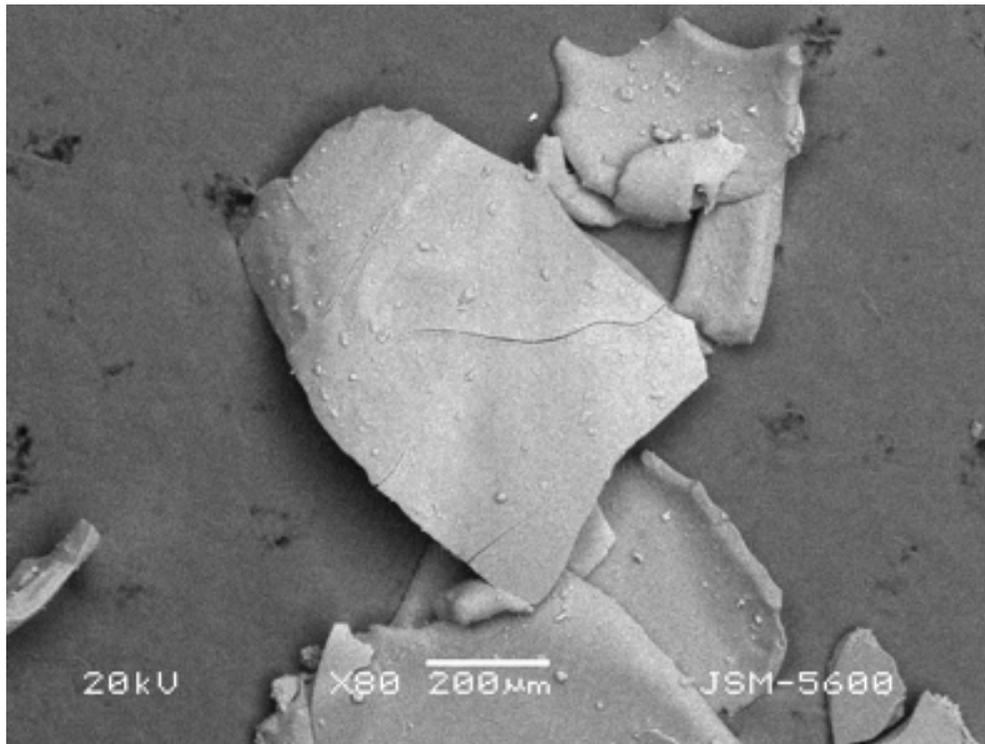


Imagen 48. Partícula del colorante azul purificado (COM3-2)

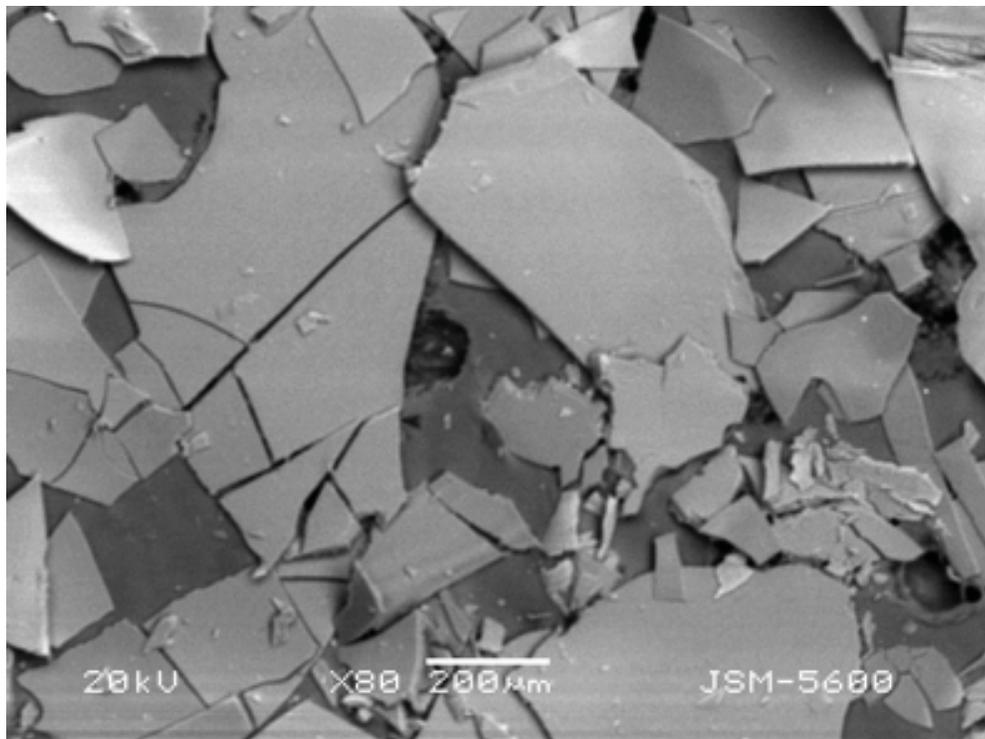


Imagen 49. Partícula del colorante azul purificado (COM4-2)

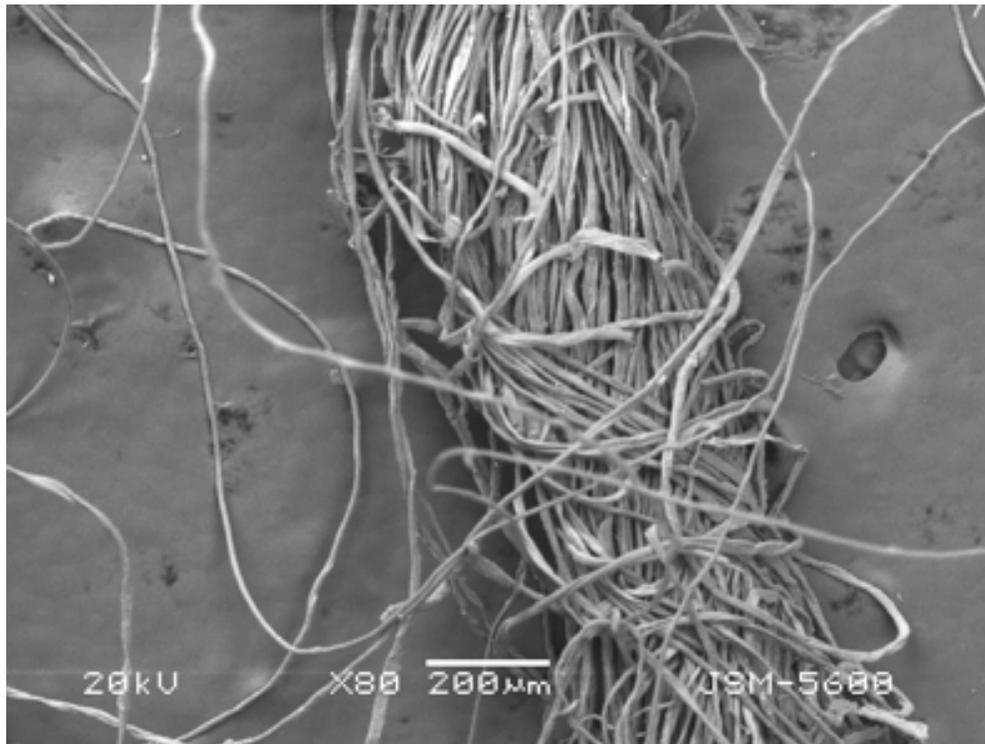


Imagen 50. Fibra de algodón mordentada y teñida con el colorante azul purificado

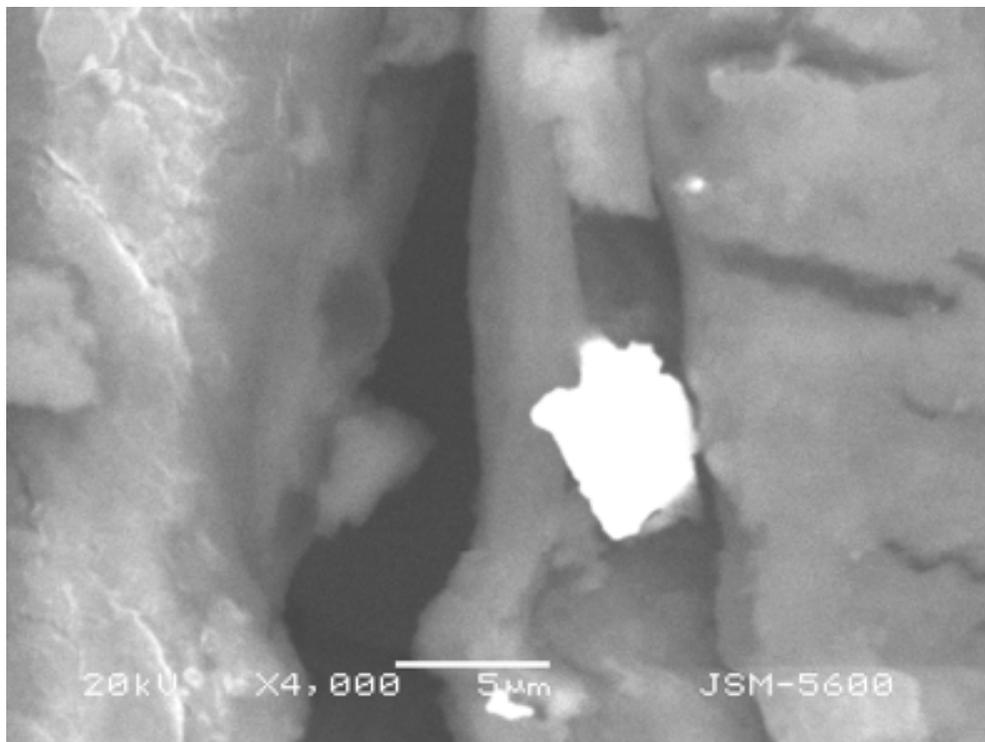
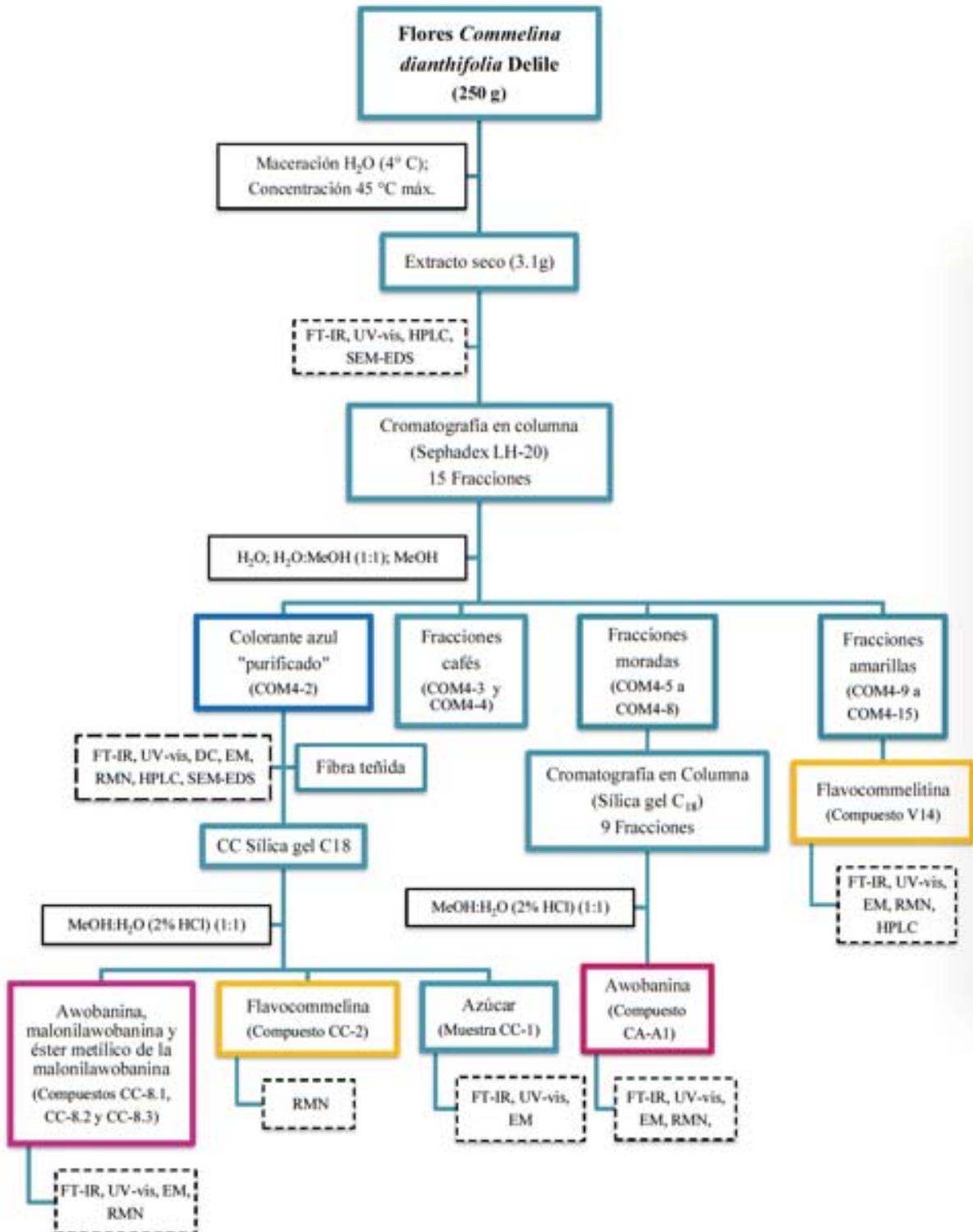


Imagen 51. Partícula retenida en la fibra de algodón teñida (acercamiento).

A manera de resumen, se presenta un diagrama de flujo del proceso experimental realizado en este estudio:



6 Discusión de resultados

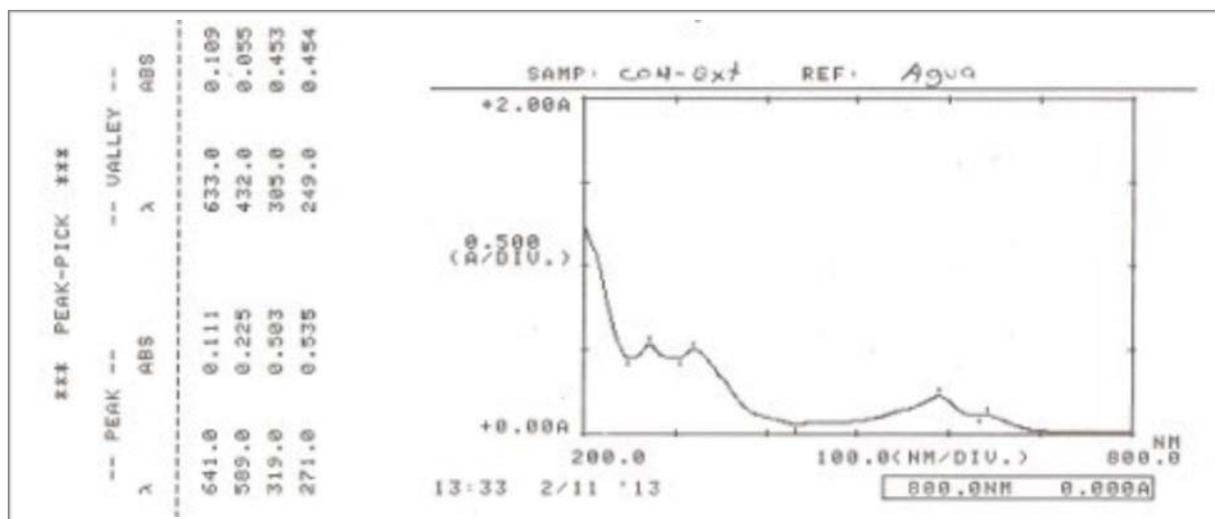
A continuación, se presenta el análisis de la información recabada en este estudio sobre el colorante azul de las flores de *Commelina dianthifolia* Delile.

6.1 Extracto crudo

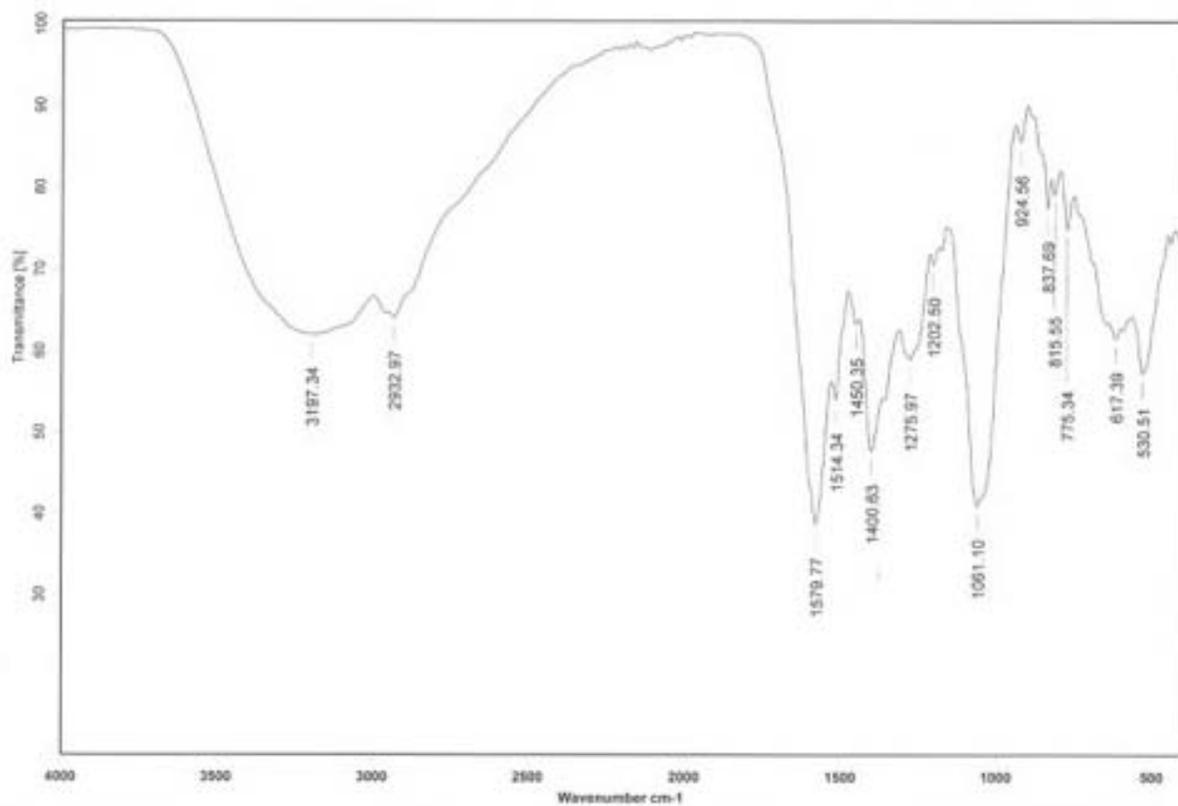
Como primera observación, las flores del género *Commelina* son sumamente delicadas. La planta abre sus botones durante las primeras horas del día y sólo abre un botón por bráctea; una vez que se ha cerrado el botón, no vuelve a abrir. Como peculiaridad, se observó que algunas flores colectadas tenían tonalidades violáceas. La delicadeza de los pétalos también se refleja en las propiedades del colorante: se descompone a temperaturas mayores de 60 °C, si se deja en contacto con la luz o el agua (humedad), el color va decayendo hasta volverse amarillo/verdoso. Así también, mostró una gran afinidad por disolverse en el agua, de ahí que sea fácil aplicarlo sobre soportes de papel o en fibras textiles de algodón; se descarta como técnica de teñido una infusión (baño de agua caliente) y se sugiere como una hipótesis que el jugo de las flores se aplicaba directamente sobre los hilos o prendas, tal y como solía hacerse con el colorante del caracol púrpura, *Purpura pansa*. El colorante absorbe humedad del ambiente con facilidad y comenzar su descomposición, por lo que, es necesario mantenerlo en un desecador para preservarlo. Si el colorante se expone al ambiente, deja de ser un polvo de fácil manejo para tener consistencia viscosa. El colorante únicamente se disolvió en agua, otros disolventes como el MeOH e inclusive el EtOH no lograron disolver el colorante azul. Sin embargo, con el MeOH es posible observar la disolución de un componente color amarillo.

En los análisis preliminares, se observó que en CCD de C₁₈ el extracto crudo del colorante está conformado en su mayoría por moléculas que absorben en la región del espectro visible (380-780 nm), es decir, dos componentes coloridos principales: azul y amarillo. No se observan componentes extras bajo luz UV_{λ254}. En el espectro UV-vis obtenido del extracto crudo prevalecen los valores del color azul: 641, 589, 319 y 271 nm (Espectro 1), el espectro de UV-vis del colorante presenta una forma similar los obtenidos en estudios con especies de *Commelina communis*⁶⁸.

Espectro 1. UV-vis Extracto crudo del colorante (Análisis cualitativo; Referencia: Agua).



El espectro de infrarrojo del extracto crudo (Espectro 2), se observa que éste contiene principalmente compuestos con grupos hidroxilo (banda ancha y muy intensa), grupos carbonilo, carbonos alifáticos y aromáticos. En la Tabla 6 se presenta las asignaciones de las principales bandas de absorción al grupo funcional al que corresponden y el tipo de vibración del enlace. Estos grupos funcionales pueden encontrarse en compuestos flavonoides.

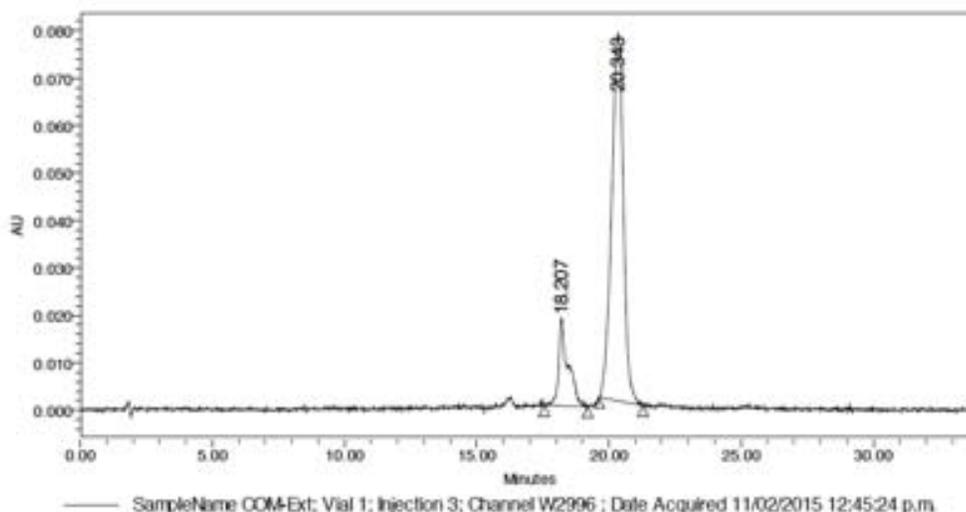
Espectro 2. FT-IR Extracto crudo del colorante (Soporte: pastilla KBr).**Tabla 6.** Principales bandas de absorción del espectro IR en el extracto crudo.

Frecuencia (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Tipo de vibración
3197	Alcohol/ Aromático	estiramiento enlace O-H estiramiento enlace C-H
1400 y 617	Alcohol	torsión enlace O-H
1276	Alcohol (fenol)	estiramiento enlace C-OH
1061	Alcohol (secundario)	estiramiento enlace C-OH
2933	Alcano (sp^3)	estiramiento asimétrico enlace H-C-H
838 y 775	Aromático	torsión fuera del plano enlace C-H
2000-1600 (sobretonos)	Aromático	sobretonos enlace C-H
1580	Carbonilo de cetona	estiramiento enlace C=O

Para poder conocer más acerca de la naturaleza de los compuestos del colorante azul se decidió realizar distintas pruebas fisicoquímicas. La primera de ellas es su estabilidad en disolución acuosa con respecto al cambio de pH. El cambio de coloración de las disoluciones (rojo en pH ácido, morado en pH ligeramente ácido y verde en pH básico), la alta estabilidad del color rojo en las disoluciones de pH ácido y la pérdida del color de las disoluciones con pH ligeramente ácido y pH básico en días sucesivos nos dan un indicio de que el colorante puede estar constituido por antocianinas cuyas características de estabilidad al cambio de pH fueron descritas en el Subcapítulo 3.2.1 *Características y propiedades químicas* de este trabajo.

En HPLC en fase reversa (sílica gel C₁₈) y en condiciones ligeramente ácidas de la fase móvil (1% TFA), se observa en el Cromatograma 1 (detector UV en 533 nm) dos picos y los espectros de UV-vis tienen bandas de absorción características de las antocianinas sometidas a condiciones ácidas (Tabla 7). Por otra parte, el Cromatograma 2 (detector UV en 380 nm) muestra la presencia de más compuestos. Los espectros UV-vis de los picos más abundantes del cromatograma son característicos de compuestos color amarillo como flavonas o flavonoles por dos máximos de absorción en ~270 y ~330 nm (Tabla 8), mientras que el último pico muestra bandas características de una antocianina (este pico tiene el mismo tiempo de retención en el Cromatograma 1 a 533 nm).

Cromatograma 1. HPLC Extracto crudo (533 nm)



Peak Results					
Name	RT	Area	% Area	Int Type	Processed Channel Descr.
1	18.207	463369	16.14	bb	PDA 533.0 nm
2	20.343	2408216	83.86	bb	PDA 533.0 nm

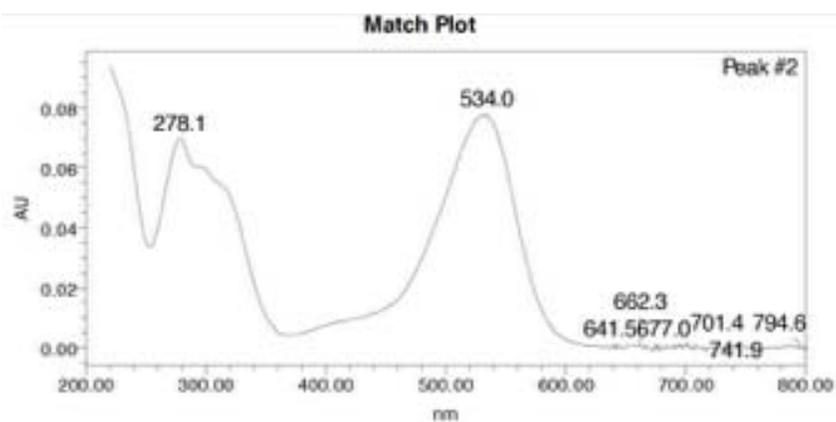
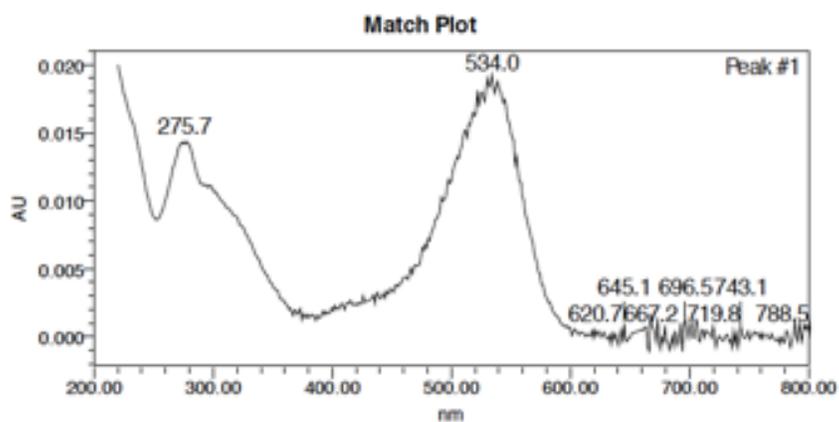
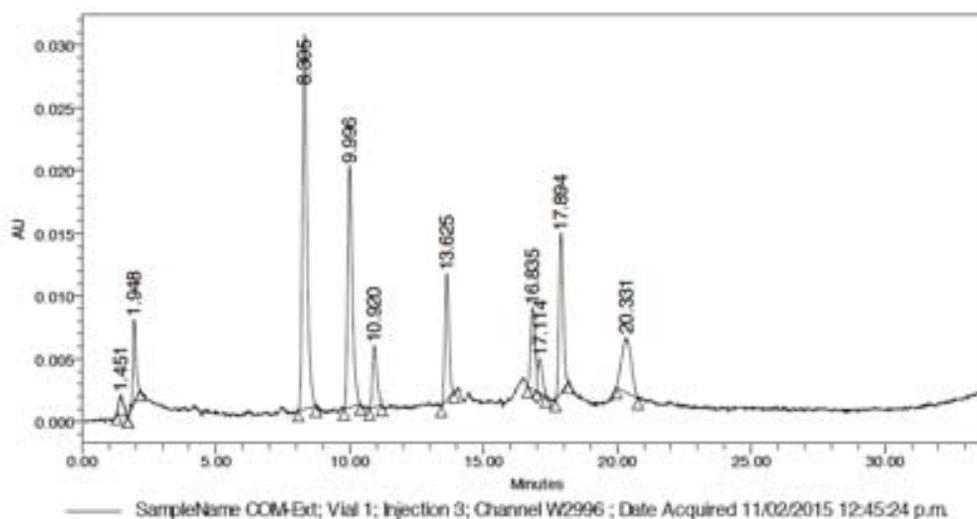


Tabla 7. Datos del Cromatograma 1 del extracto crudo (533 nm).

No. pico	Tiempo retención (min)	Área (%)	λ UV-vis (nm)
1	18.21	16.1	276 y 534
2	20.34	83.9	278 y 534

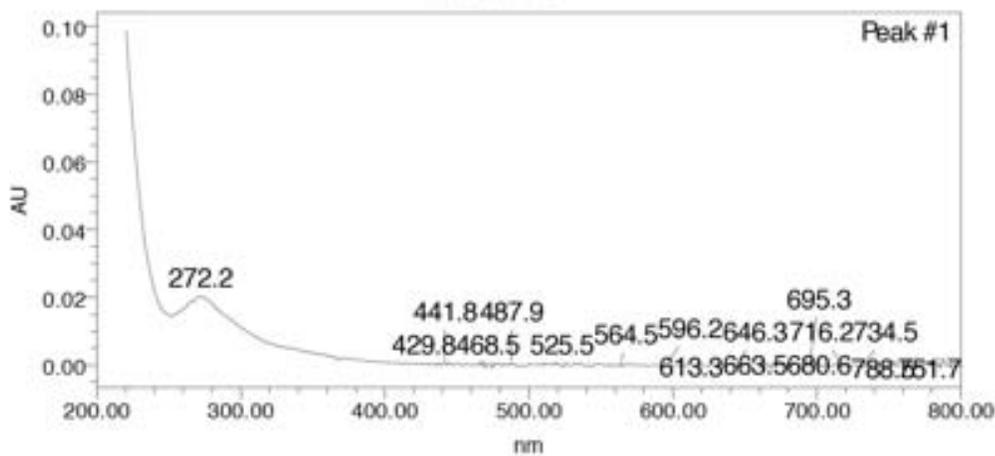
Cromatograma 2. HPLC Extracto crudo (380 nm)

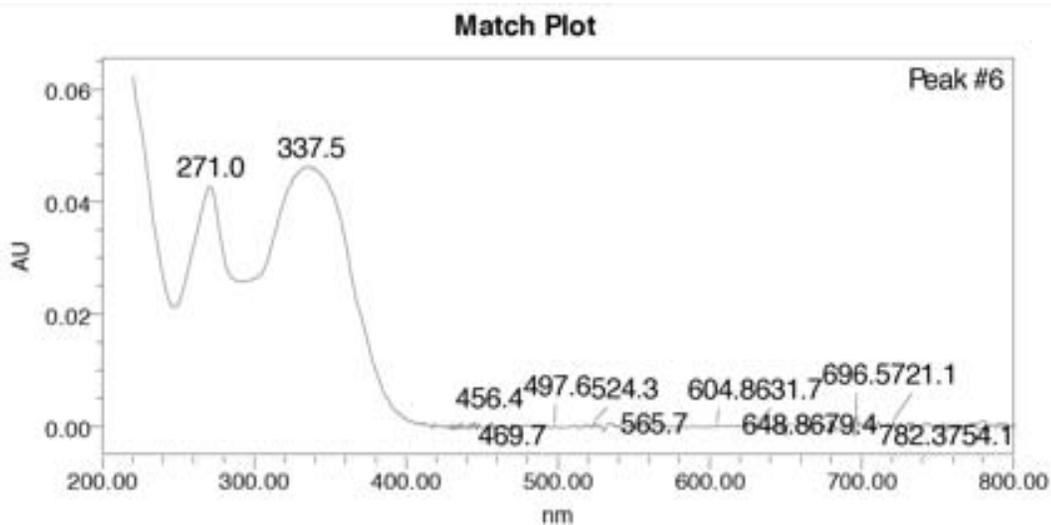
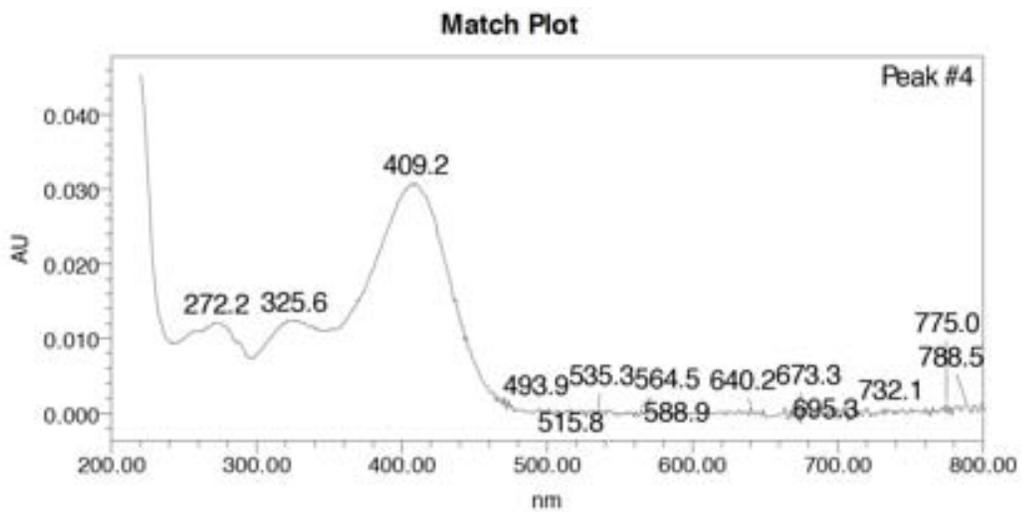
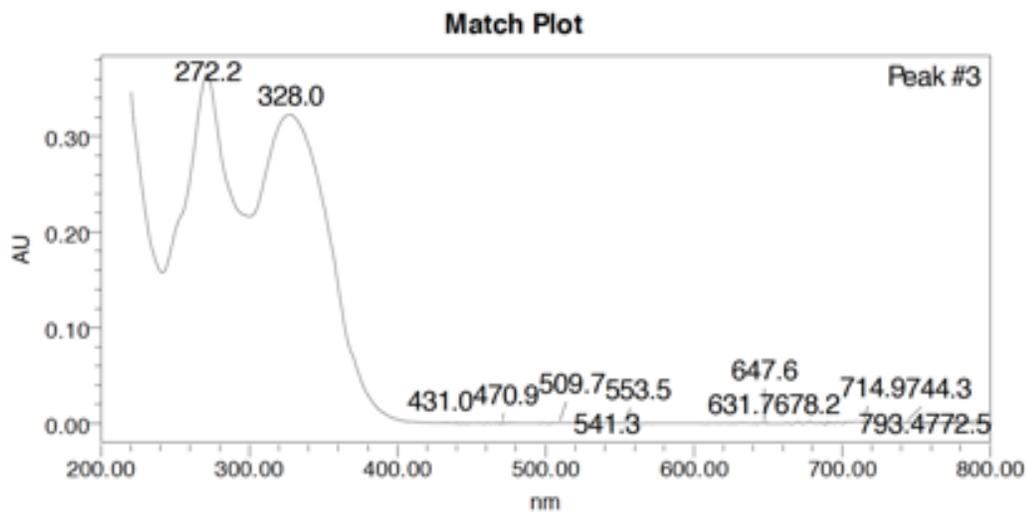


Peak Results

Name	RT	Area	% Area	Int Type	Processed Channel Descr.
1	1.451	19644	1.67	BB	PDA 380.0 nm
2	1.948	53711	4.56	BB	PDA 380.0 nm
3	8.305	351486	29.87	BB	PDA 380.0 nm
4	9.996	235287	19.99	BB	PDA 380.0 nm
5	10.920	56864	4.83	BB	PDA 380.0 nm
6	13.625	103965	8.83	BB	PDA 380.0 nm
7	16.835	75377	6.41	BV	PDA 380.0 nm
8	17.114	32593	2.77	VB	PDA 380.0 nm
9	17.894	139171	11.83	BB	PDA 380.0 nm
10	20.331	106648	9.23	BB	PDA 380.0 nm

Match Plot





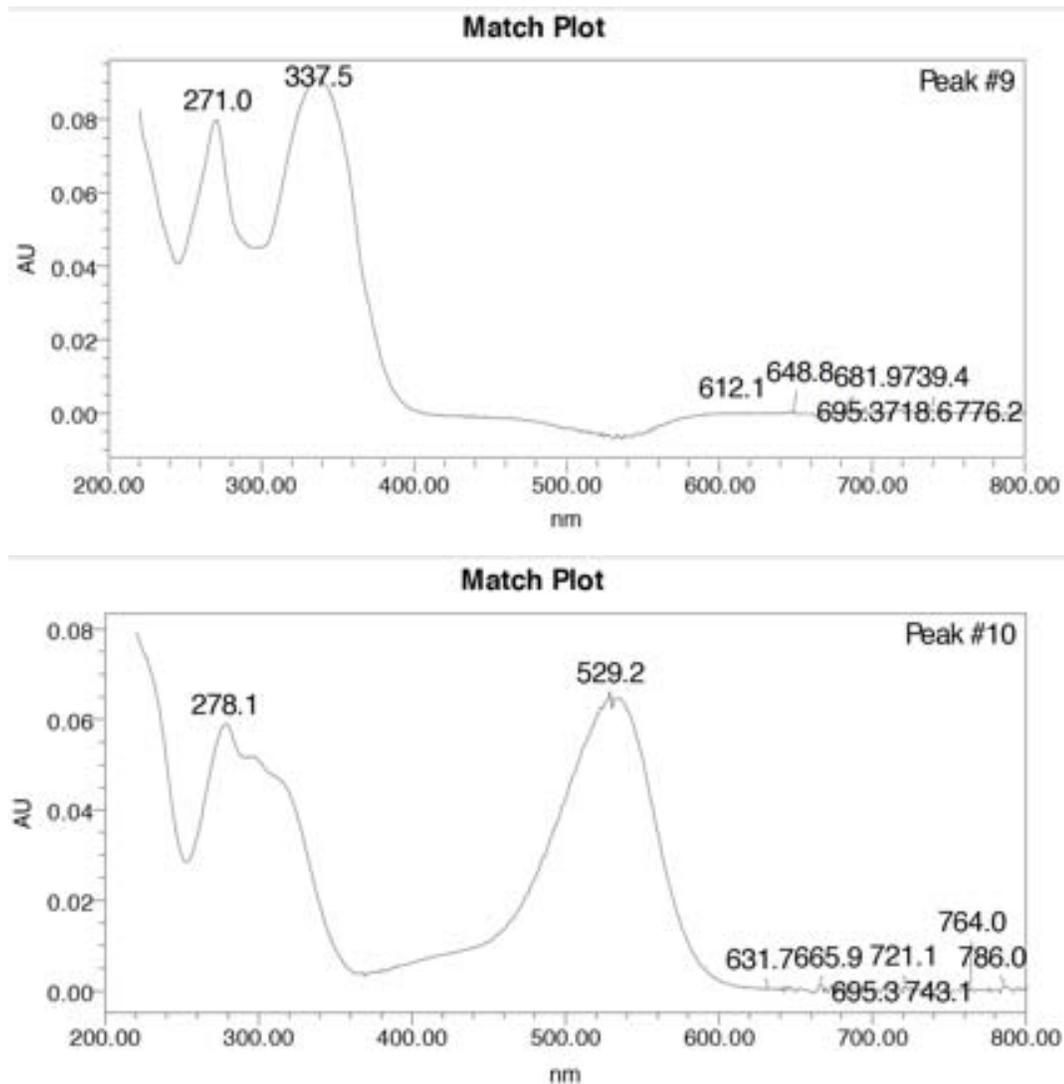


Tabla 8. Datos del cromatograma del extracto crudo (380 nm)

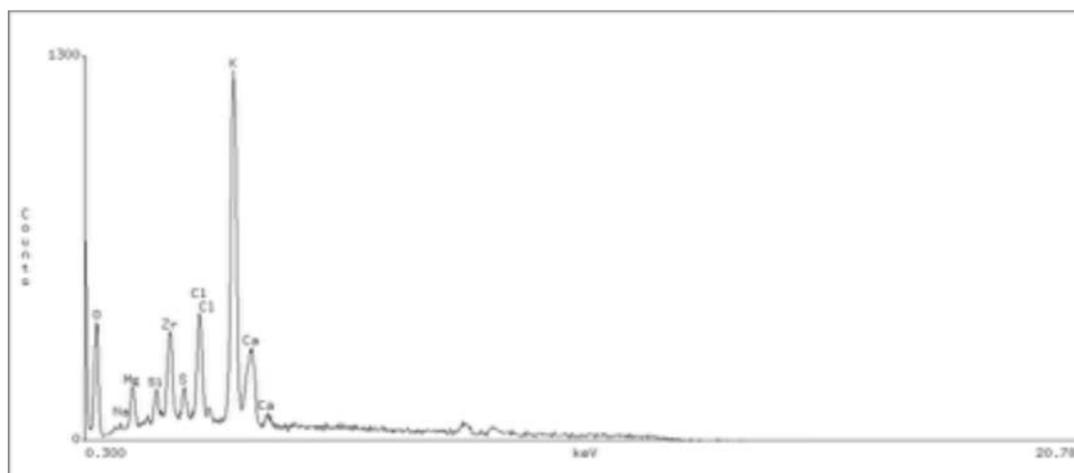
No. pico	Tiempo retención (min)	Área (%)	λ UV-vis (nm)
3	8.31	29.9	272 y 328
4	9.99	20.0	272, 325 y 409
6	13.63	8.8	271 y 338
9	17.89	11.8	271 y 337
10	20.33	9.2	278 y 529

Con la información obtenida en las pruebas fisicoquímicas preliminares y con los espectros de IR y de UV-vis, se refuerza la hipótesis de que el colorante azul está conformado principalmente por compuestos de tipo flavonoide.

En las imágenes SEM (Imagen 47) se aprecia que el extracto crudo tiene una constitución amorfa y sobre la superficie se observan partículas de mayor contraste. Los análisis de detección de rayos X característicos (EDS) globales revelan la presencia de K, Cl, P, Ca, Mg, S y Na; de los cuales, el potasio sobresale por tener la mayor proporción (Espectro 3). Se aprecia en la superficie la acumulación de otras partículas (mayor contraste, más brillantes), las cuales tienen una proporción aproximada de K:Cl (1:1) y con Mg, Ca y P en menor cantidad, por lo que estas partículas más brillantes pudieran ser sales provenientes del agua con la que se realizó la extracción o sales de la misma planta (Espectro 4). Con este mapeo elemental, se corrobora que el colorante presenta entre sus componentes al magnesio, elemento metálico primordial en el complejo de commelinina. **Nota:** En algunos espectros se asignó una banda como Zr (zirconio), la cual corresponde a la banda de P (fósforo).

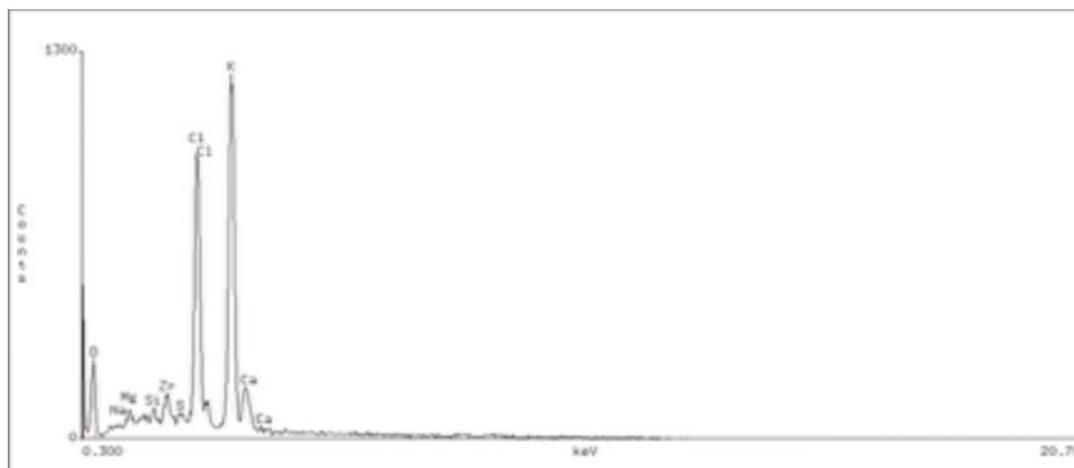
Espectro 3. SEM-EDS Extracto crudo

Element	k-ratio (calc.)	ZAF	Atom %	Element	Wt %	Err. (1-Sigma)
O -K	0.0926	6.314	76.38	O	58.50	+/- 1.27
Ca-K	0.0479	1.312	3.27	Ca	6.28	+/- 0.14
P -K	0.0197	1.389	1.85	P	2.74	+/- 0.08
Na-K	0.0001	4.127	0.02	Na	0.03	+/- 0.09
Mg-K	0.0084	2.657	1.92	Mg	2.23	+/- 0.11
Si-K	0.0024	1.575	0.28	Si	0.38	+/- 0.06
K -K	0.2104	1.163	13.07	K	24.46	+/- 0.22
Zr-K	0.0000	1.380	0.00	Zr	0.00	+/- 0.00
S -K	0.0037	1.249	0.30	S	0.46	+/- 0.06
Cl-K	0.0408	1.207	2.90	Cl	4.92	+/- 0.11
Total			100.00	Total	100.00	



Espectro 4. SEM-EDS Extracto crudo (Zona puntual)

Element	k-ratio (calc.)	ZAF	Atom %	Element Wt %	Wt % Err. (1-Sigma)
O -K	0.0698	7.327	71.19	51.11	+/- 1.43
Ca-K	0.0108	1.399	0.84	1.52	+/- 0.11
P -K	0.0003	1.308	0.03	0.04	+/- 0.06
Na-K	0.0000	3.329	0.00	0.00	+/- 0.00
Mg-K	0.0002	2.565	0.06	0.06	+/- 0.09
Si-K	0.0000	1.321	0.00	0.00	+/- 0.00
K -K	0.2572	1.213	17.78	31.19	+/- 0.28
Zr-K	0.0000	1.353	0.00	0.00	+/- 0.00
S -K	0.0000	1.030	0.00	0.00	+/- 0.00
Cl-K	0.1428	1.126	10.11	16.08	+/- 0.18
Total			100.00	100.00	

**6.2 Colorante azul “purificado”**

Con la información preliminar del extracto crudo y los reportes de metalo-antocianinas en estudios de *Commelinas*, se optó por realizar una purificación del extracto mediante permeación en gel (Sephadex LH-20) y empleando disolventes neutros (H_2O y MeOH) para evitar la disociación del posible complejo azul. En este proceso de separación, las moléculas con un mayor tamaño eluyeron primero y las más pequeñas quedaron retenidas en los poros del polímero de azúcar, equilibrándose con la fase móvil y la fase estacionaria, por lo que su elución fue más lenta. Como se observó, el orden de elución de esta separación comenzó con fracciones color azul (colorante azul “purificado”), posteriormente fracciones color marrón, después fracciones moradas/magentas y finalmente fracciones amarillas; esto nos indica que las fracciones azules tienen compuestos de un

gran tamaño molecular y que las últimas fracciones color amarillo tienen compuestos más pequeños y menos polares, puesto que ya no son totalmente solubles en agua y más afines a disolverse en MeOH y EtOH.

Se obtuvo el espectro FT-IR de esta fracción azul, el colorante “purificado” (Espectro 5) y en la Tabla 9 se muestran las asignaciones de las bandas de absorción principales y el tipo de vibración del enlace al que pertenecen. La banda intensa localizada en 1569 cm^{-1} es característica de la vibración del enlace carbonilo de una cetona, la baja frecuencia indica que el enlace $\text{C}=\text{O}$ se encuentra conjugado, la resonancia afecta la fuerza y el largo del enlace (constante de fuerza, k) dándole un carácter de enlace sencillo y provocando un desplazamiento de la banda de absorción a una menor frecuencia.

Espectro 5. FT-IR Colorante azul “purificado”

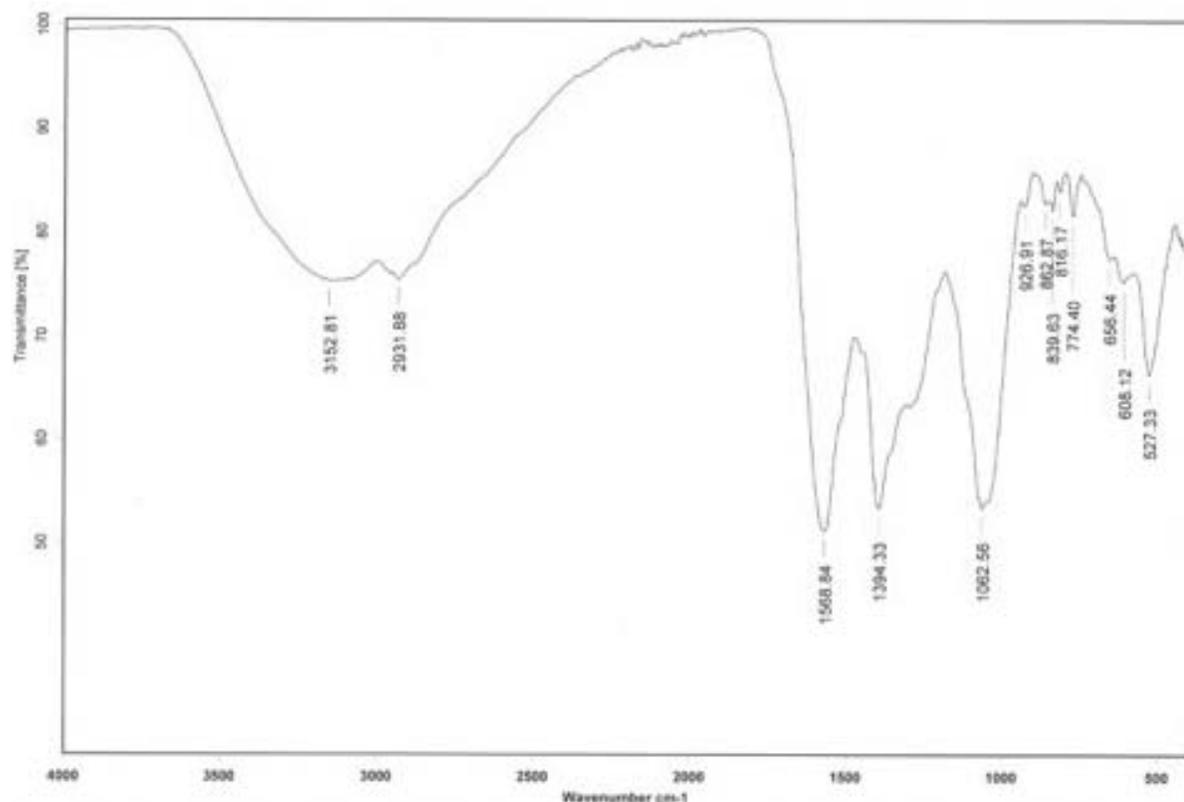
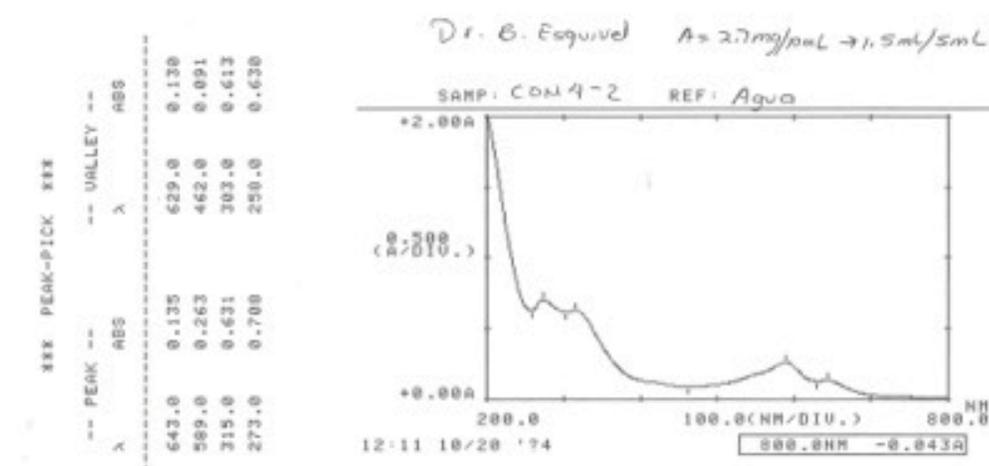


Tabla 9. Principales bandas de absorción del espectro IR en el colorante purificado.

Frecuencia (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Tipo de vibración
3153	Alcohol/ Aromático	estiramiento enlace O-H estiramiento enlace ∞ -H
1394 y 656	Alcohol	torsión enlace O-H
1274	Alcohol (fenol)	estiramiento enlace C-OH
1062	Alcohol (secundario)	estiramiento enlace C-OH
2932	Alcano (sp^3)	estiramiento asimétrico enlace H-C-H
863, 840 y 774	Aromático	torsión fuera del plano enlace ∞ -H
2000-1600 (sobretonos)	Aromático	sobretonos enlace ∞ -H
1569	Carbonilo de cetona	estiramiento enlace C=O

En el espectro de UV-vis los máximos de bandas de absorción se encuentran en 273, 316, 590 y 643 nm (Espectro 6); estos valores corresponden con los reportados experimentalmente para el complejo de commelinina reportados por Hayashi⁶⁸ y difieren de los valores reportados para las 3 metalo-antocianinas ya mencionadas en la sección 3.8. El espectro UV-vis del colorante azul empleando como disolvente H₂O (1% HCl) produjo un la desaparición de la banda en 643 nm, un cambio hipsocrómico en la banda de 589 nm a 528 nm, y en las bandas de 315 y 273 nm se produjo, por el contrario, un ligero cambio batocrómico a 318 y 274 nm respectivamente (Espectro 7). La banda en 589 nm está asociada al anillo B, por lo que la disminución de la longitud de onda indica que la molécula modificó su estructura en esta zona. El comportamiento del colorante purificado nuevamente es el mismo que el reportado para el complejo commelinina aislado de la *Commelina communis*⁶⁸ (Tabla 10).

Espectro 6. UV-vis Colorante purificado (Concentración: 0.27 mg/mL)



Espectro 7. UV-vis Comparación Colorante purificado + HCl (Análisis cualitativo)

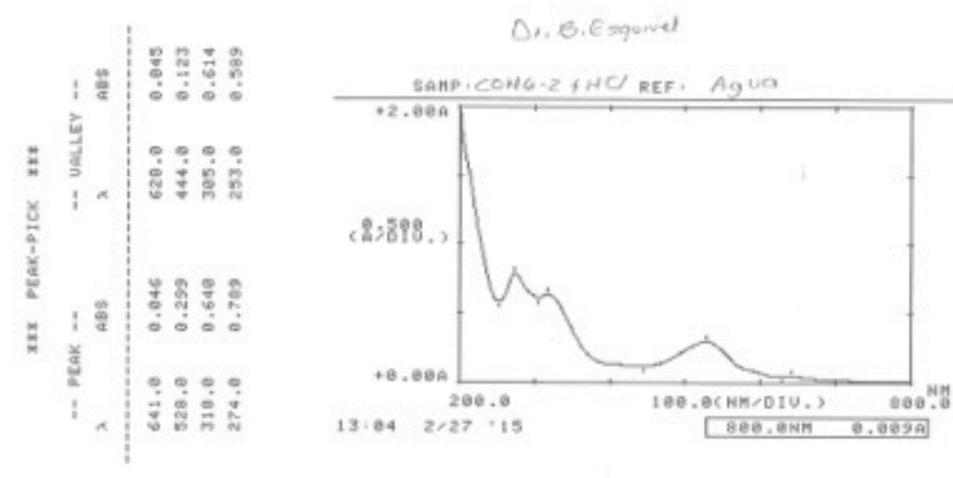
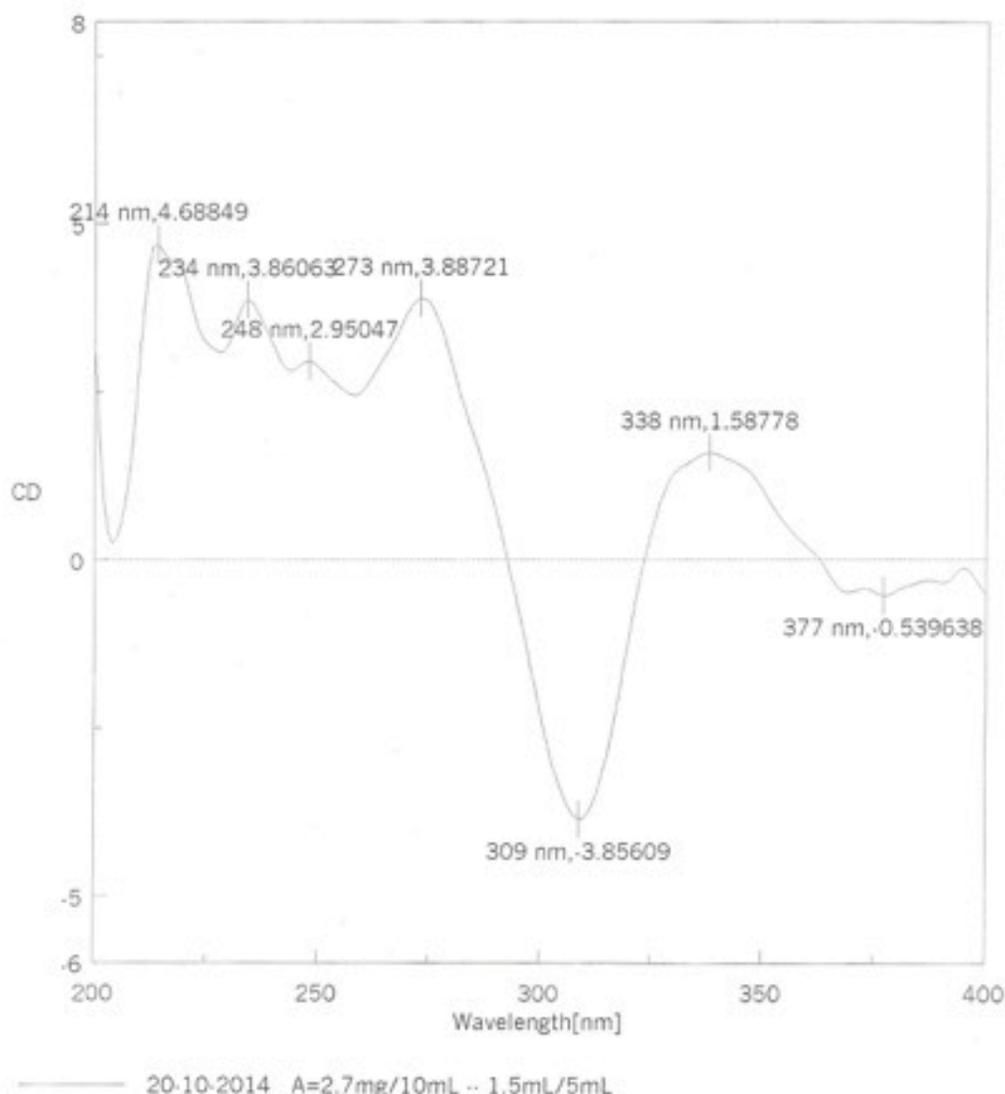


Tabla 10. Valores teóricos y experimentales del colorante azul en UV-vis.

Colorante azul (nm) <i>Commelina dianthifolia</i> Delile		Commelinina (nm) <i>Commelina communis</i> ⁶⁸	
neutro	1% HCl	neutro	1% HCl
643	-	643	-
589	528	591	528
315	318	316	317
273	274	273	274

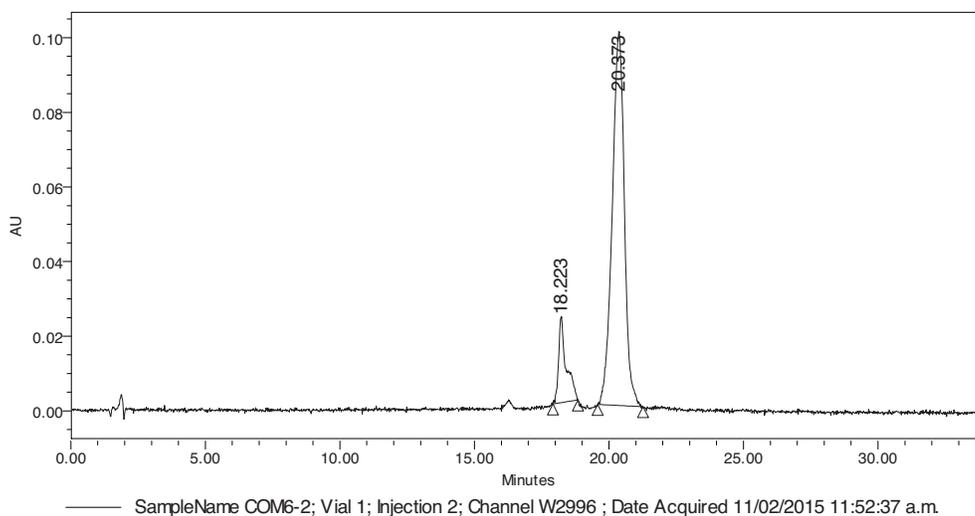
El espectro DC (200-300 nm) mostró efectos Cotton de signo positivo y negativo, este espectro es similar en valores y apariencia al espectro DC del complejo de commelinina en esta zona del espectro^{85 y 88} (Espectro 8). Por tanto, el efecto Cotton del colorante azul obtenido indica que las moléculas presente se asocian quiralmente, sugiriendo un efecto de co-pigmentación entre antocianinas y flavonas⁵⁸. Como el espectro de DC no abarca todas las longitudes de onda del espectro visible, no es posible asegurar el signo de las bandas en la zona 300-700 nm, sin embargo, la presencia de un efecto Cotton en la zona de 200-300 nm sugiere que el apilamiento entre las antocianinas tiene un giro hacia la izquierda⁸⁷.

Espectro 8. DC Colorante azul “purificado” (Referencia: agua; Temperatura ambiente)



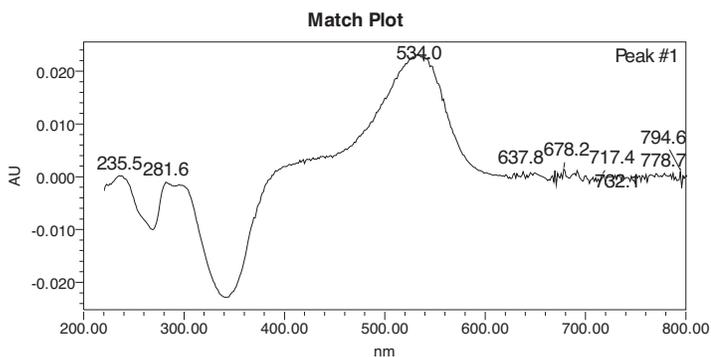
En HPLC, el colorante se analizó bajo las mismas condiciones que el extracto crudo. El Cromatograma 3 a 533 nm muestra 2 compuestos principales, el tiempo de retención y el espectro UV de cada pico cromatográfico son los mismos que aparecen en el cromatograma del extracto crudo. El Cromatograma 4 a 380 nm difiere del cromatograma del extracto crudo a 380 nm ya que sólo se aprecian 4 compuestos mayoritarios, cuyos datos cromatográficos son se presentan en la Tabla 11.

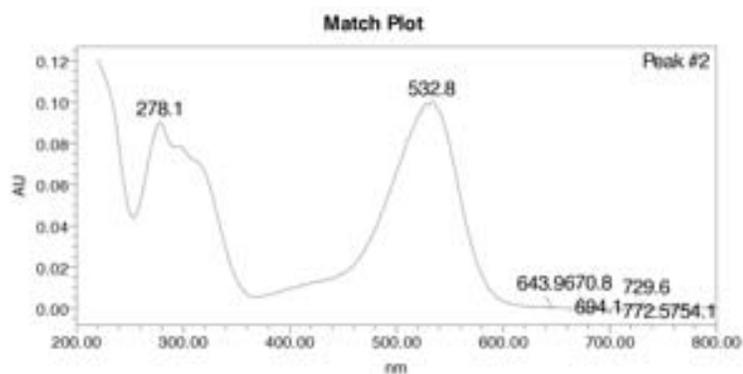
Cromatograma 3. Colorante azul “purificado” (533 nm)



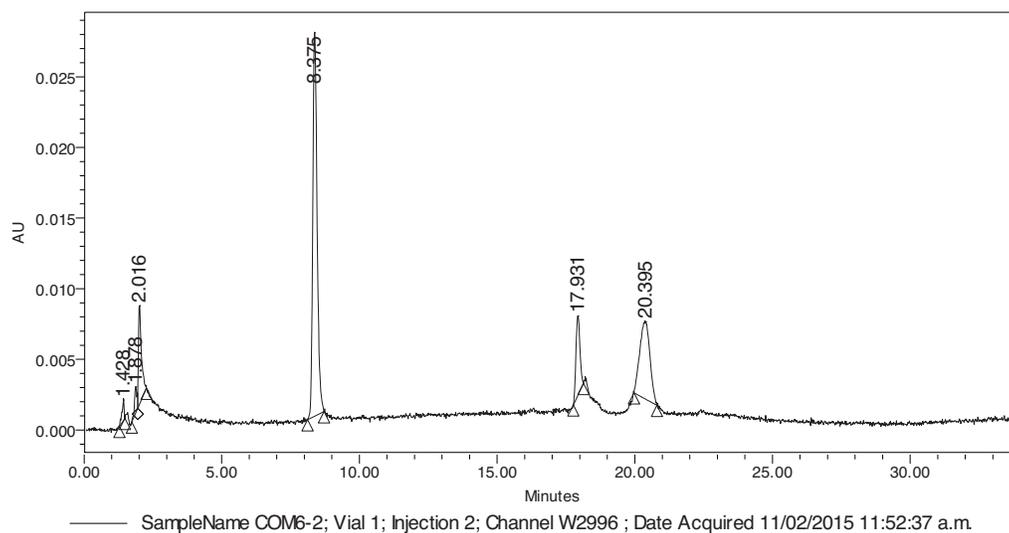
Peak Results

Name	RT	Area	% Area	Int Type	Processed Channel Descr.
1	18.223	456554	12.72	bb	PDA 533.0 nm
2	20.373	3131757	87.28	bb	PDA 533.0 nm



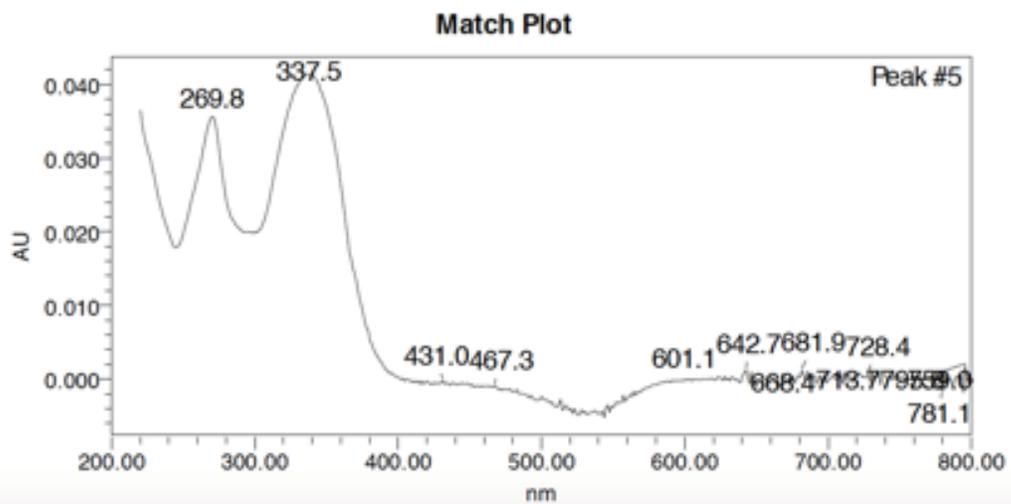
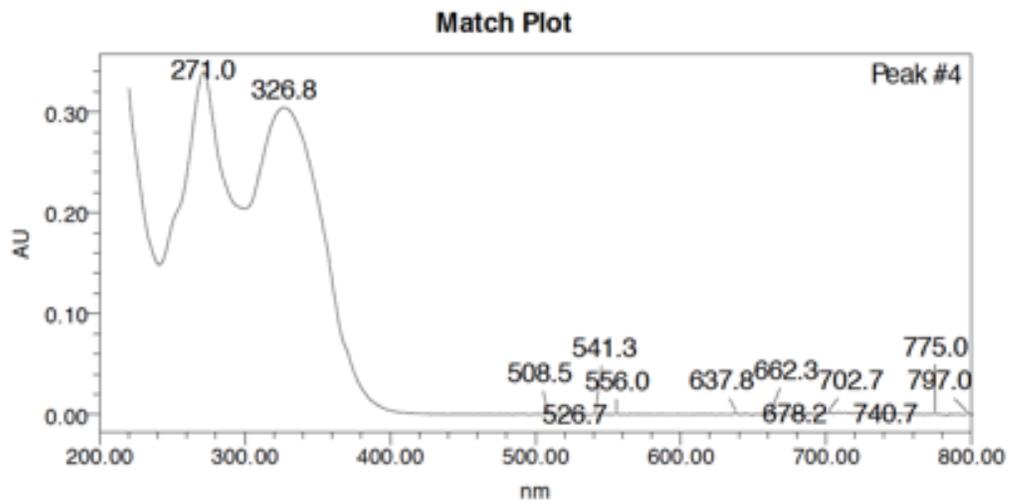
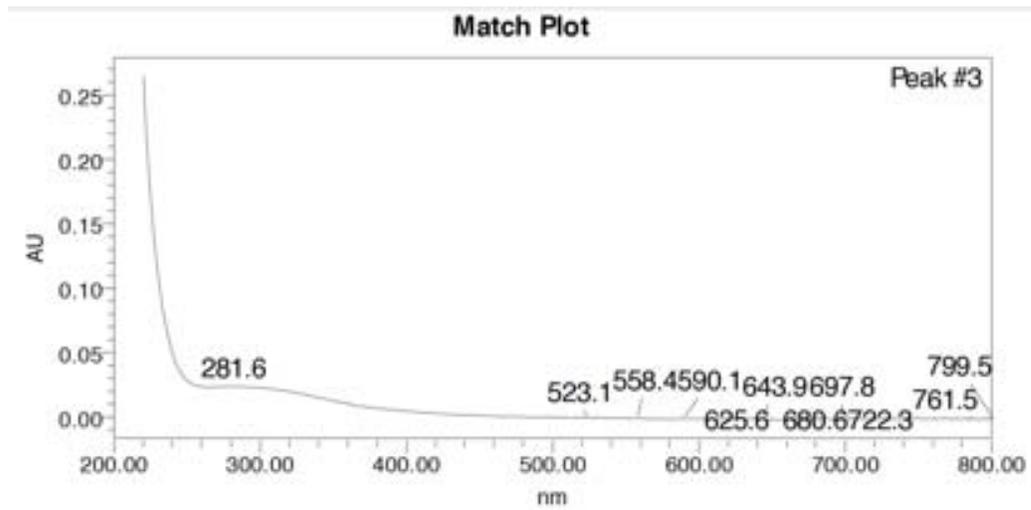


Cromatograma 4. Colorante azul “purificado” (380 nm)



Peak Results

Name	RT	Area	% Area	Int Type	Processed Channel Descr.
1	1.428	7751	1.37	BB	PDA 380.0 nm
2	1.878	11495	2.03	BV	PDA 380.0 nm
3	2.016	53251	9.42	VB	PDA 380.0 nm
4	8.375	295134	52.21	BB	PDA 380.0 nm
5	17.931	56853	10.06	BB	PDA 380.0 nm
6	20.395	140767	24.90	BB	PDA 380.0 nm



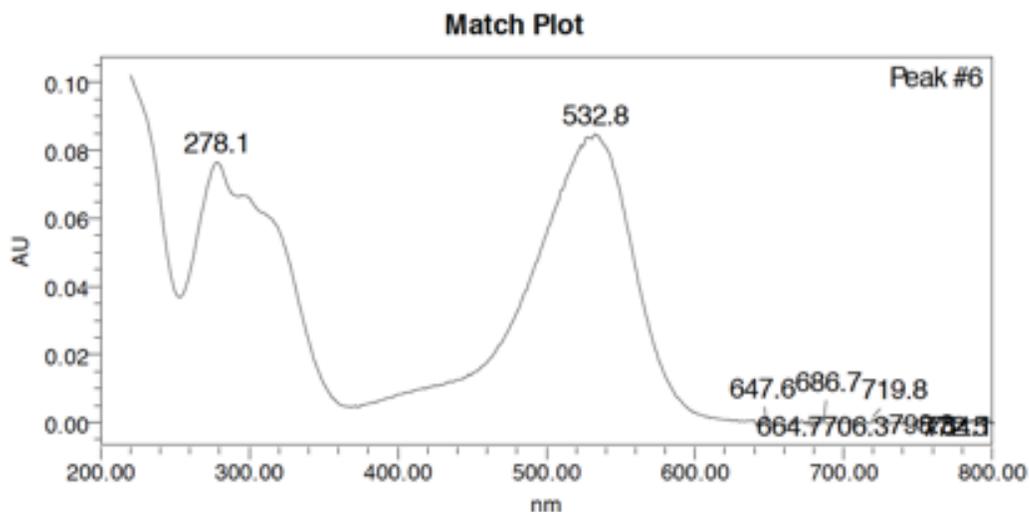
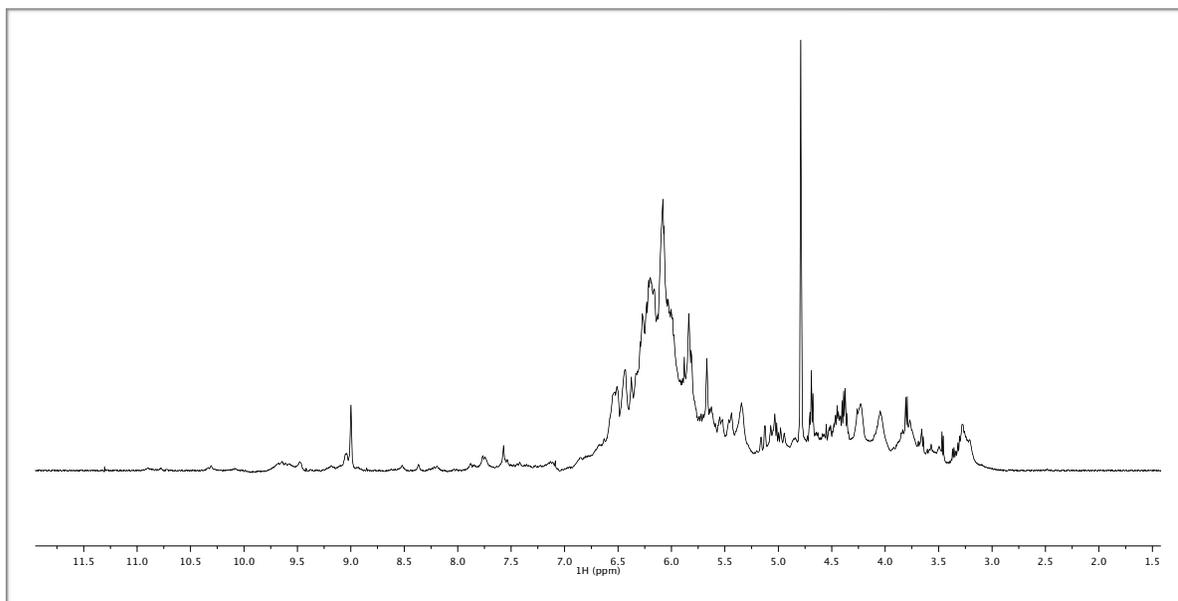


Tabla 11. Datos cromatográficos separación por HPLC del extracto crudo a 380 nm

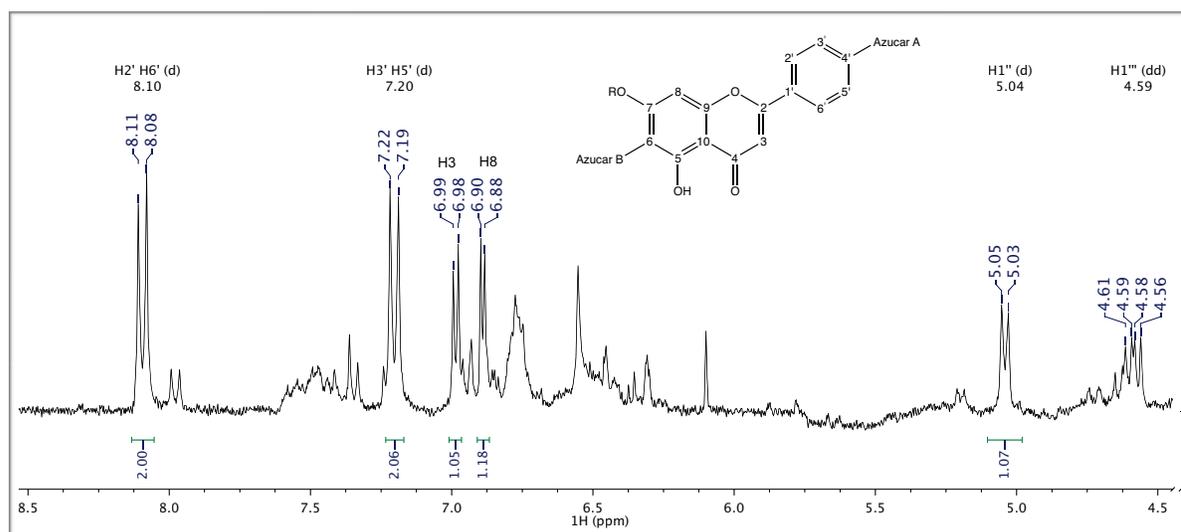
No. Pico	Tiempo de retención (min)	Área (%)	λ UV-vis (nm)
3	2.01	9.42	281
4	8.38	52.21	271 y 327
5	17.94	10.06	270 y 337
6	20.40	24.90	278 y 533

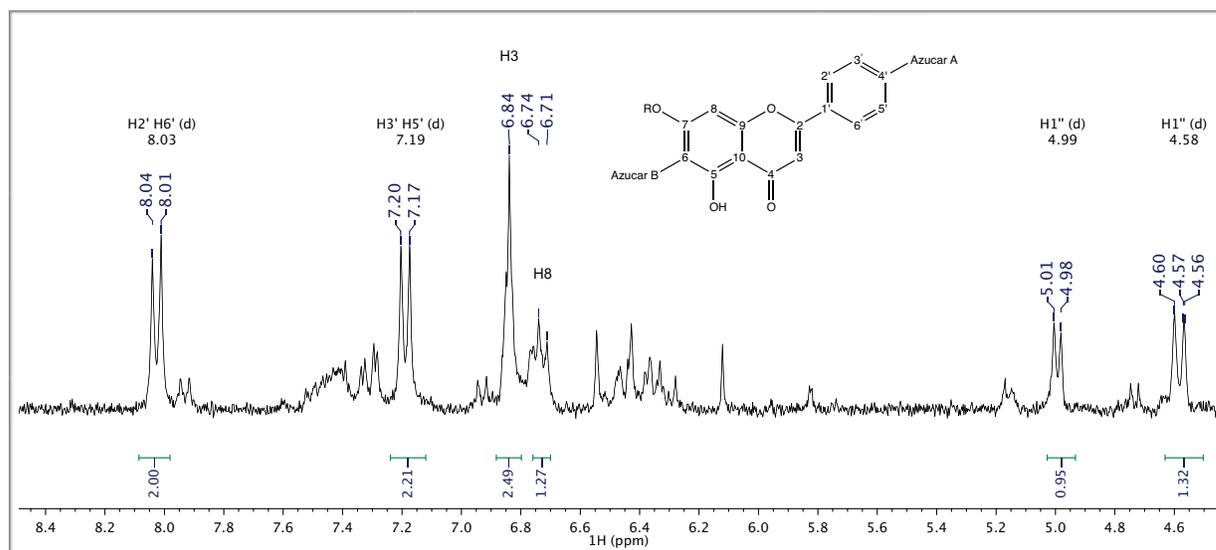
El pico 3 corresponde a un compuesto altamente polar y por la apariencia del espectro UV-vis (baja intensidad de absorción) el compuesto no presenta una coloración intensa, descartando así que sea una flavona o antocianina. Los picos 4 y 5, por el contrario, sus espectros UV-vis muestran que éstos pueden ser flavonas y el pico 6 una antocianina.

Para complementar el análisis del colorante azul purificado, se obtuvo el espectro de RMN de ^1H (500 MHz, D_2O), sin embargo, la complejidad de la muestra no permitió la distinción de patrón alguno para una antocianina o flavona (Espectro 9). El desplazamiento químico de las señales que sí logran distinguirse están localizadas entre 8-6 ppm, características para protones aromáticos; señales en 6-4 ppm para protones de moléculas de azúcar (protones alifáticos cercanos a elementos de alta densidad electrónica y protones de alcoholes primarios y secundarios) y una señal intensa producida por moléculas de agua en 4.8 ppm.

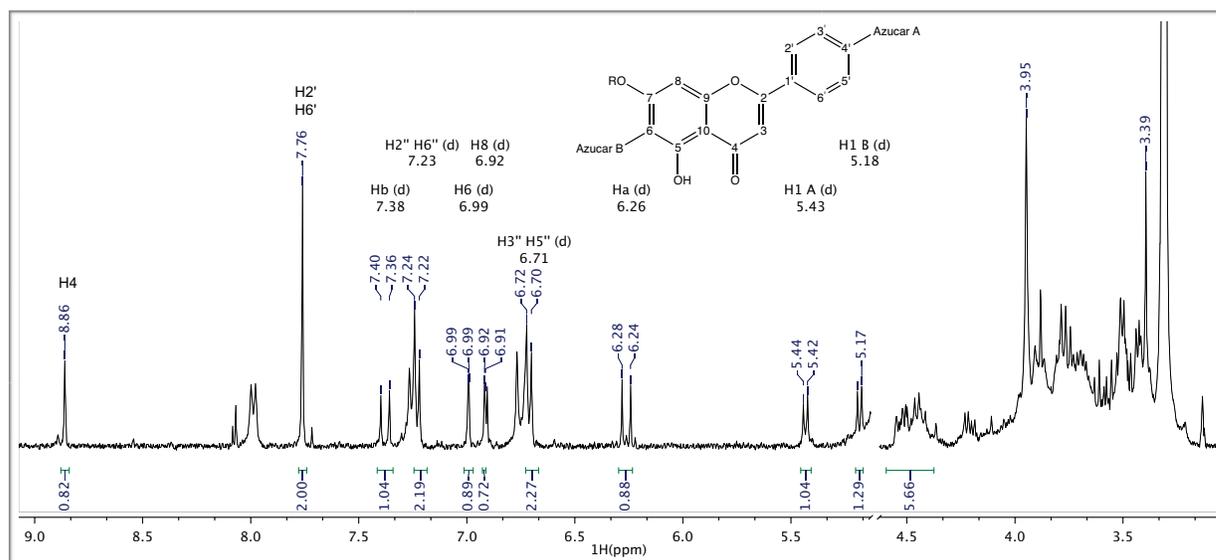
Espectro 9. RMN-¹H Colorante azul “purificado” (500 MHz, D₂O)

En el Espectro 10 de RMN-¹H empleando como disolvente DMSO-*d*₆ y el Espectro 11 de RMN-¹H empleando como disolvente DMSO-*d*₆ + D₂O, por el contrario, se observaron las señales que coinciden para una flavona glicosidada, la cual se encontró también en la muestra CC-2, y que resulta ser la flavocommelina (el análisis para la elucidación de esta flavona se discute en la Subcapítulo 6.3.2 *Compuesto CC-2*).

Espectro 10. RMN-¹H Colorante azul “purificado” (300 MHz, DMSO-*d*₆)

Espectro 11. RMN-¹H Colorante azul “purificado” (300 MHz, DMSO-*d*₆ + D₂O)

Se realizó también el análisis de RMN de ¹H empleando como disolvente CD₃OD + TFA (Espectro 12), a diferencia de los espectros anteriores, en este espectro se observaron las señales características de una antocianina glicosidada hallada también en la muestra CC-8, la cual es identificada como la malonilawobanina (el análisis para la elucidación de esta antocianina se discute en la sección 6.3.3 *Compuestos en CC-8*).

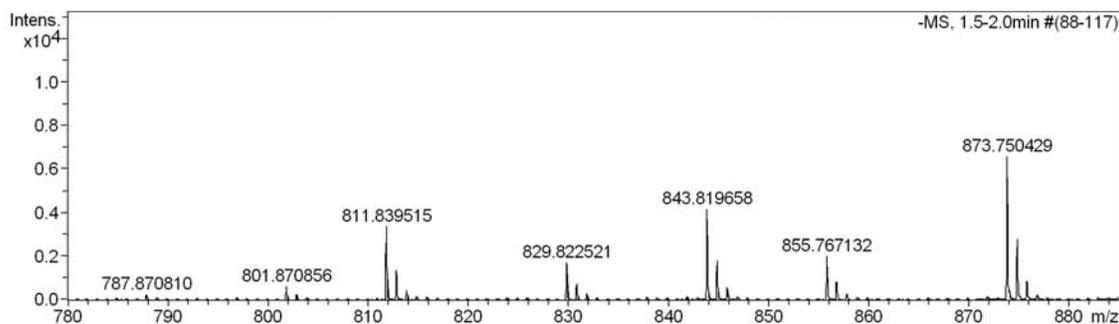
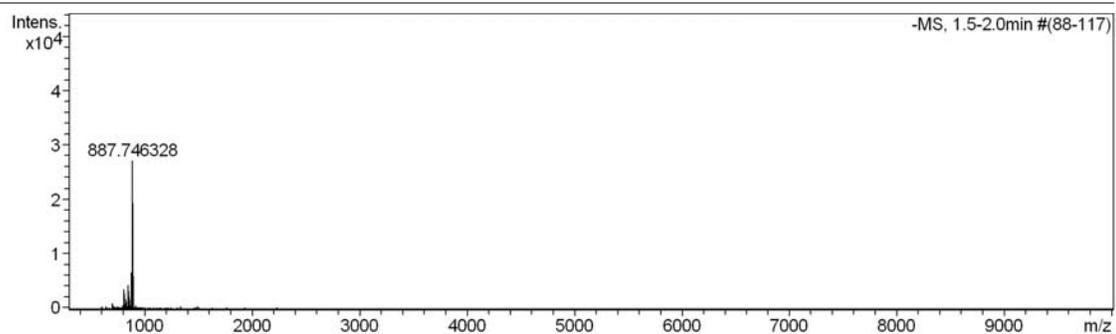
Espectro 12. RMN-¹H Colorante azul “purificado” (300 MHz, CD₃OD + TFA)

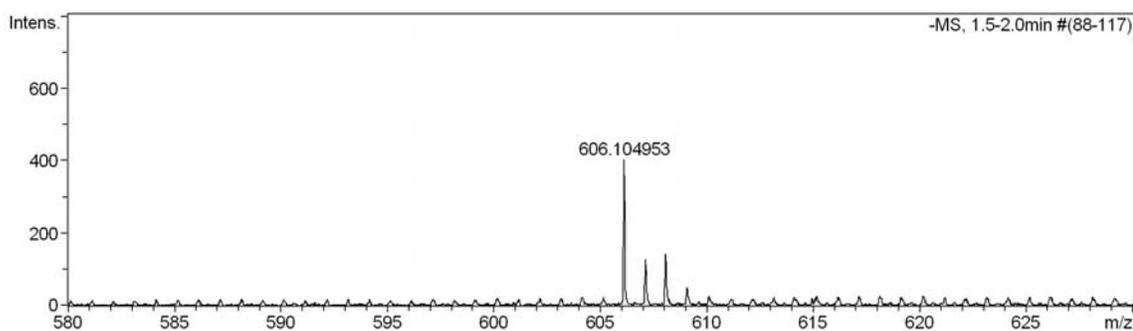
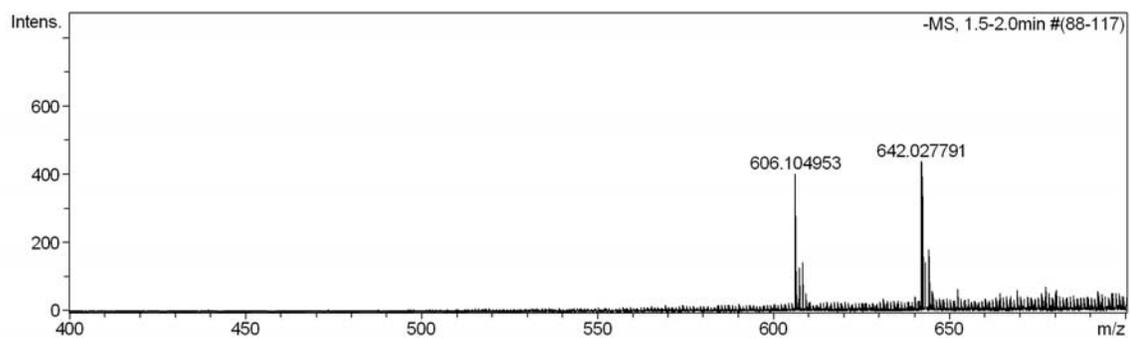
En espectroscopía de masas, empleando la técnica de Ionización por Electro-spray en modo negativo, MeOH: H₂O (1:1) (Espectro 13), se encontró como ión molecular el pico en (*m/z*) 887.7463 y picos minoritarios en (*m/z*) 873.75, 855.76, 843.81, 829.97, 811.83, 642.02 y 606.10. En esta prueba se esperaba obtener picos de mayor valor de *m/z* y que correspondieran con los fragmentos multicargados reportados para el complejo de commelinina⁷⁵. Empleando la misma técnica, pero cambiando la mezcla de disolventes a EtOH:H₂O (1:1), se tuvieron los mismos picos más otros en (*m/z*) 901.95, 801.87 y 787.87 (Espectro 14). De estos valores, el pico en (*m/z*) 873.73 es igual a la masa molecular del éster metílico de la malonilawobanina. El espectro realizado con la técnica de Impacto electrónico presentó picos *m/z* en 345 y 367, los cuales no proporcionan información trascendental (Espectro 15).

Espectro 13. ESI(-)-EM Colorante azul "purificado" (MeOH:H₂O, 1:1)

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	3200 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	20000 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Waste

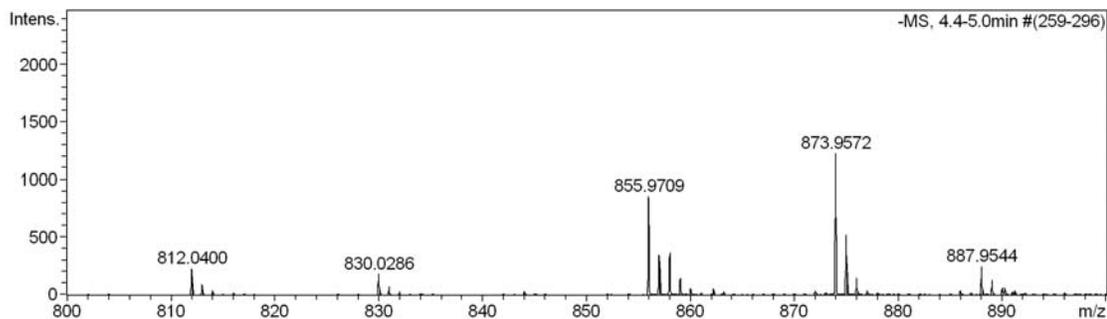
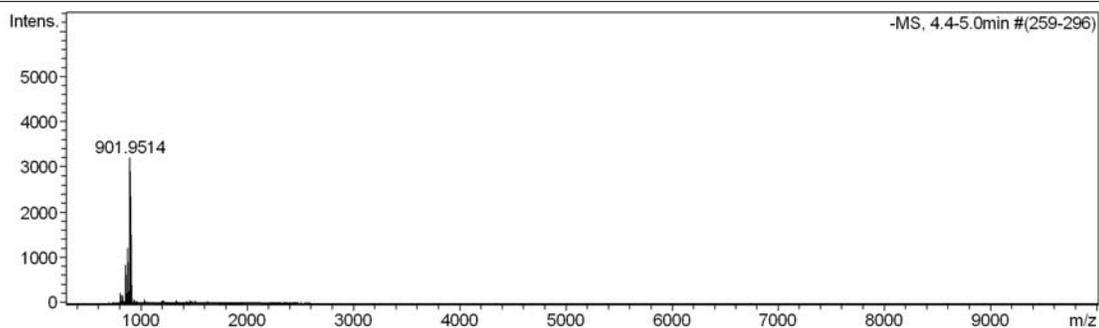


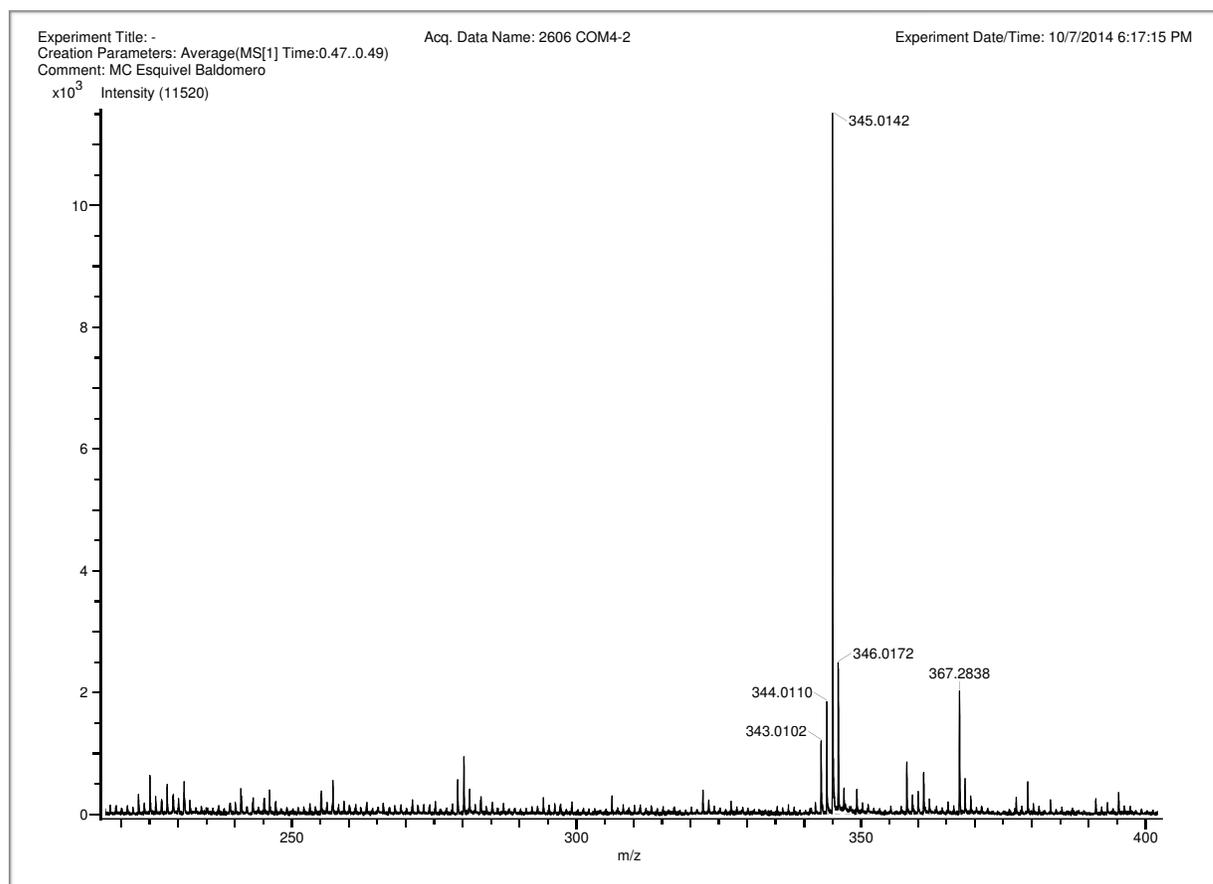


Espectro 14. ESI(-)-EM Colorante azul “purificado” (EtOH:H₂O, 1:1)

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	3200 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	10000 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Waste

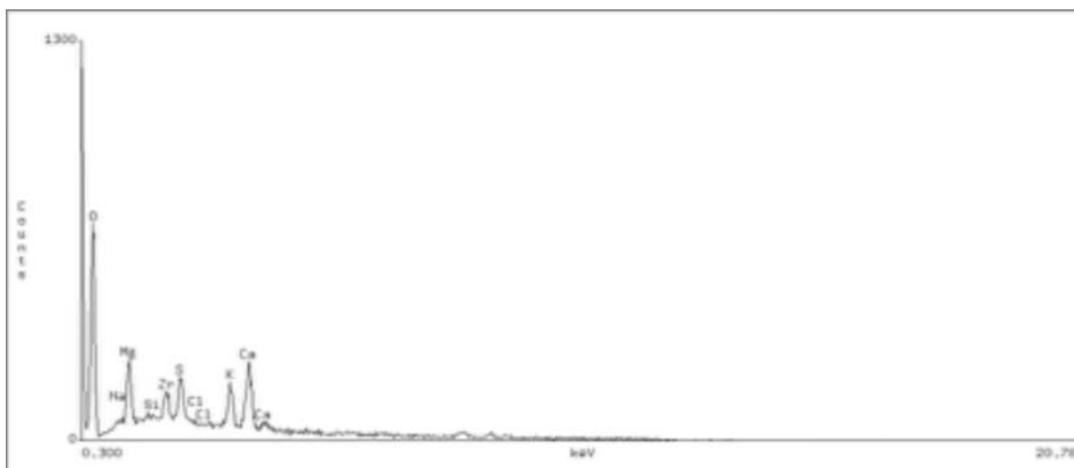


Espectro 15. IE-EM Colorante azul “purificado”

Finalmente, se realizó a la muestra un análisis elemental mediante la detección de Rayos-X característicos (EDS). Se mandaron dos muestras del colorante purificado (COM3-2 y COM4-2) para observar si existía alguna diferencia; ambos presentaron en la imagen SEM una morfología plana, laminar quebradiza y ya no se distinguieron partículas pequeñas superficiales de gran contraste (Imagen 48 y 49). La composición elemental química global también cambió en comparación con la muestra del extracto crudo (Espectro 16); la proporción de los elementos presentes Mg:Ca:K:S es 2:2:1:1, confirmando que el colorante purificado tenía magnesio en alta proporción, componente indispensable en los complejos de metalo-antocianinas.

Espectro 16. SEM-EDS Colorante azul “purificado”

Element	k-ratio (calc.)	ZAF	Atom %	Element Wt %	Wt % Err. (1-Sigma)
O -K	0,2583	3,067	88,59	79,22	+/- 1,28
Ca-K	0,0661	1,167	3,44	7,71	+/- 0,18
P -K	0,0038	1,516	0,33	0,58	+/- 0,10
Na-K	0,0002	4,418	0,06	0,08	+/- 0,20
Mg-K	0,0207	2,845	4,34	5,90	+/- 0,22
Si-K	0,0000	1,685	0,00	0,00	+/- 0,00
K -K	0,0348	1,168	1,86	4,07	+/- 0,13
Zr-K	0,0000	1,508	0,00	0,00	+/- 0,00
S -K	0,0186	1,318	1,37	2,45	+/- 0,11
Cl-K	0,0000	1,292	0,00	0,00	+/- 0,00
Total			100,00	100,00	

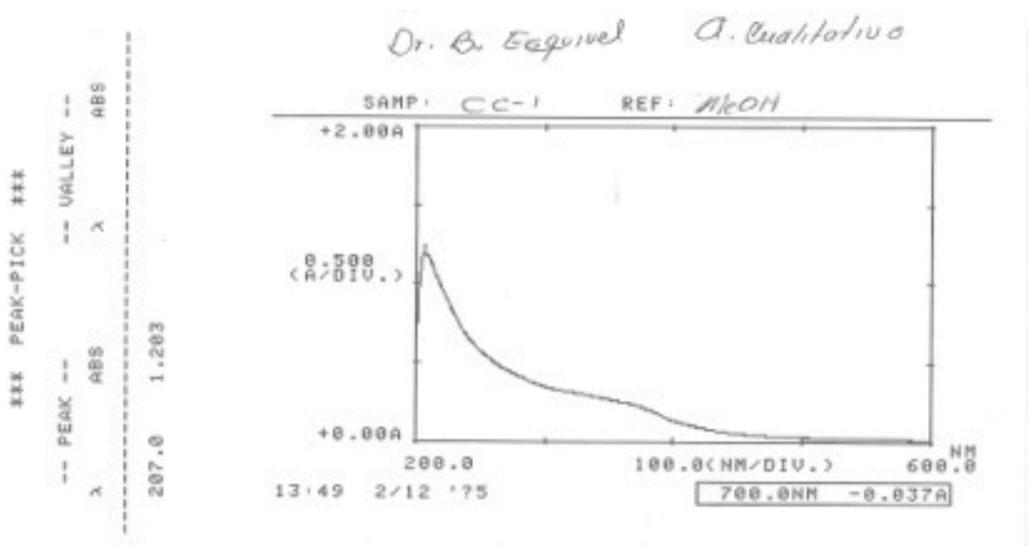


6.3 Separación del colorante “purificado”

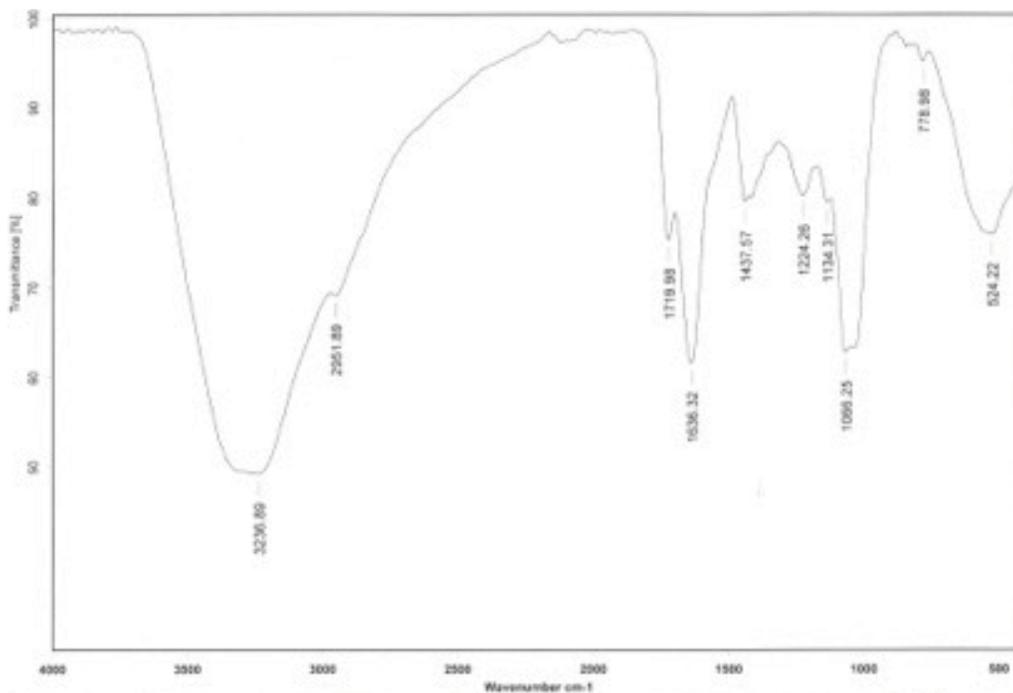
A través de los diferentes análisis realizados al colorante “purificado” y al extracto crudo, es altamente probable que el colorante es una metalo-antocianina, y para identificar los flavonoides que la integran se realizó una separación en columna empleando sílica gel C₁₈ y una fase móvil ligeramente ácida, H₂O-2% HCl:MeOH (1:1), para garantizar la disociación del complejo de la metalo-antocianina durante el proceso. De esta separación se analizaron 3 muestras:

6.3.1 Muestra CC-1

La fracción recolectada mostró en CCD una mancha color marrón. El espectro UV-vis muestra únicamente un máximo de absorción definido en 207 nm (Espectro 17), aunque también es posible distinguir otra banda muy ancha aproximadamente en 380 nm.

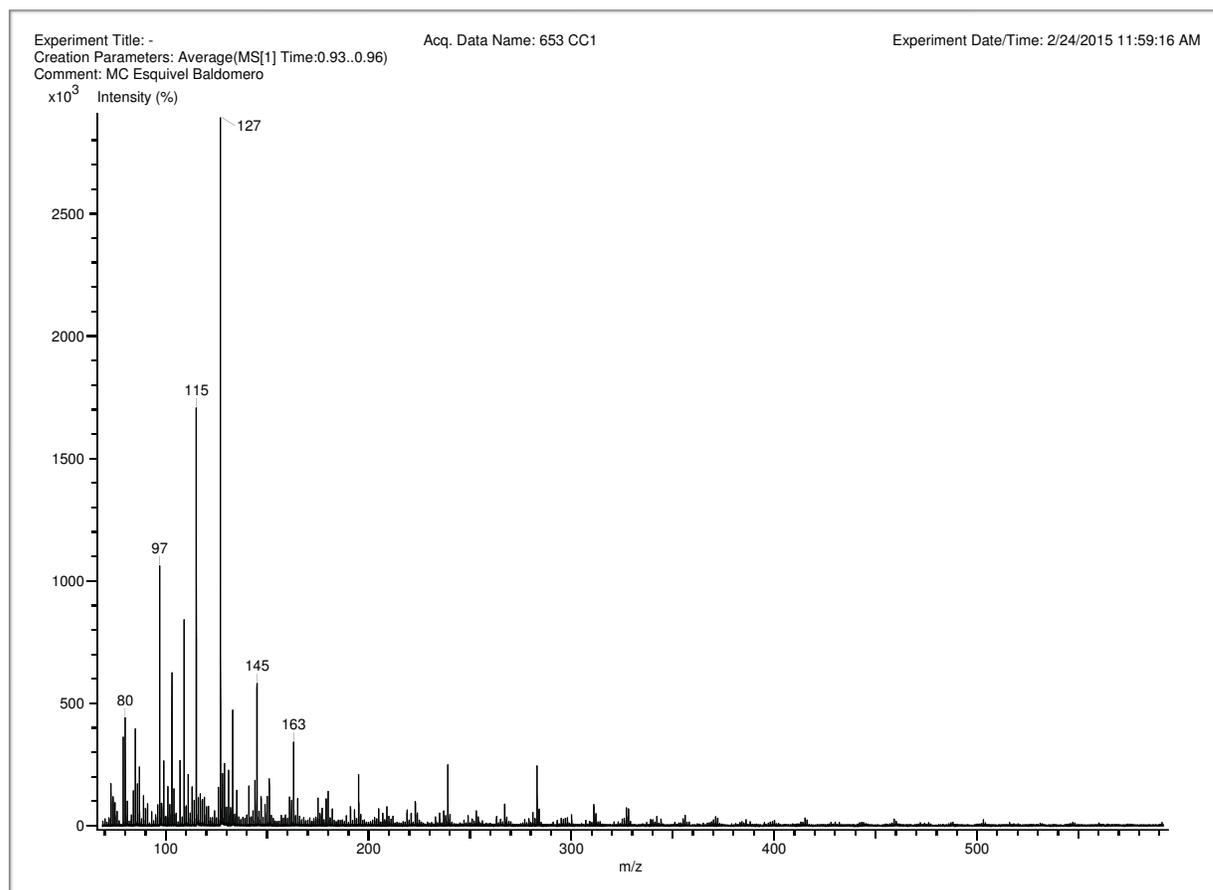
Espectro 17. UV-vis Muestra CC-1 (Análisis cualitativo; Referencia: agua)

En espectroscopía de infrarrojo (Espectro 18), se observaron las bandas características para los siguientes grupos funcionales: hidroxilos (3237 y 1134 cm^{-1}), hidrocarburos alifáticos (2952 cm^{-1}) y aromáticos (1636 , 1438 , 779 , 524 cm^{-1} y sobretonos) y carbonilo (1720 cm^{-1}).

Espectro 18. FT-IR Muestra CC-1 (Técnica: película)

En espectrometría de masas empleando la técnica de Análisis Directo en Tiempo Real (DART), el espectro mostró un patrón de fragmentación propio de azúcares por las pérdidas consecutivas de 18 unidades de m/z : 163, 145, 127 y 109. El pico base está en (m/z) 127 y no es posible asignar el pico del ión molecular. Por lo tanto, esta muestra contiene esencialmente a moléculas de azúcar (Espectro 19).

Espectro 19. DART-MS Muestra CC-1



6.3.2 Compuesto CC-2

Esta muestra color marrón, tras ser aplicada en una CCD y revelarse con *óleum* + calor, se observó la presencia de una mancha color amarillo muy brillante en la placa. La poca cantidad de muestra (9 mg) limitó en análisis únicamente a ¹H-RMN; en el espectro de esta muestra se encontró

un solo compuesto con señales propias para un glicósido de flavona. Se observaron señales en la región ~ 7 ppm de protones de tipo aromático y señales entre 5.5-4.0 ppm de protones alifáticos cercanos a grupos desprotectores, en esta zona aparecen los protones alifáticos de los azúcares. La peculiaridad de este espectro radicó en que algunas señales se duplican, este fenómeno es propio de C-glicósidos y se le conoce como isomerismo rotacional⁹³. La flavocommelina es el nombre que se le dio a la flavona aislada del complejo de commelina, la 7-O-metil 6-C,4'-O-bis- β -D-glucosil apigenina⁷¹ (Figura 27).

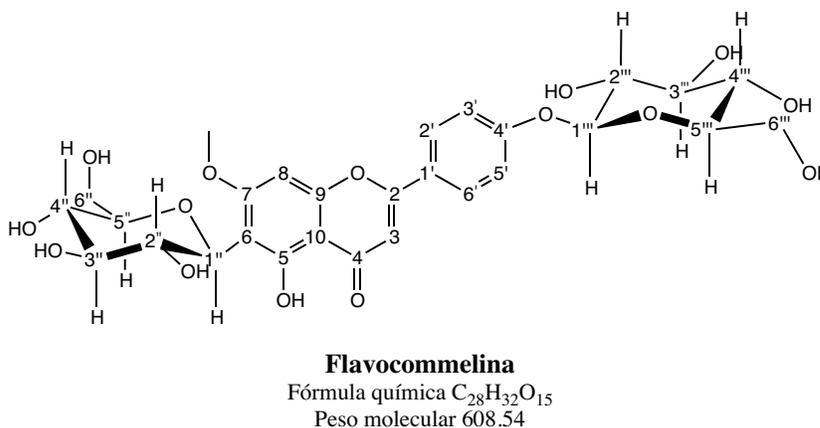
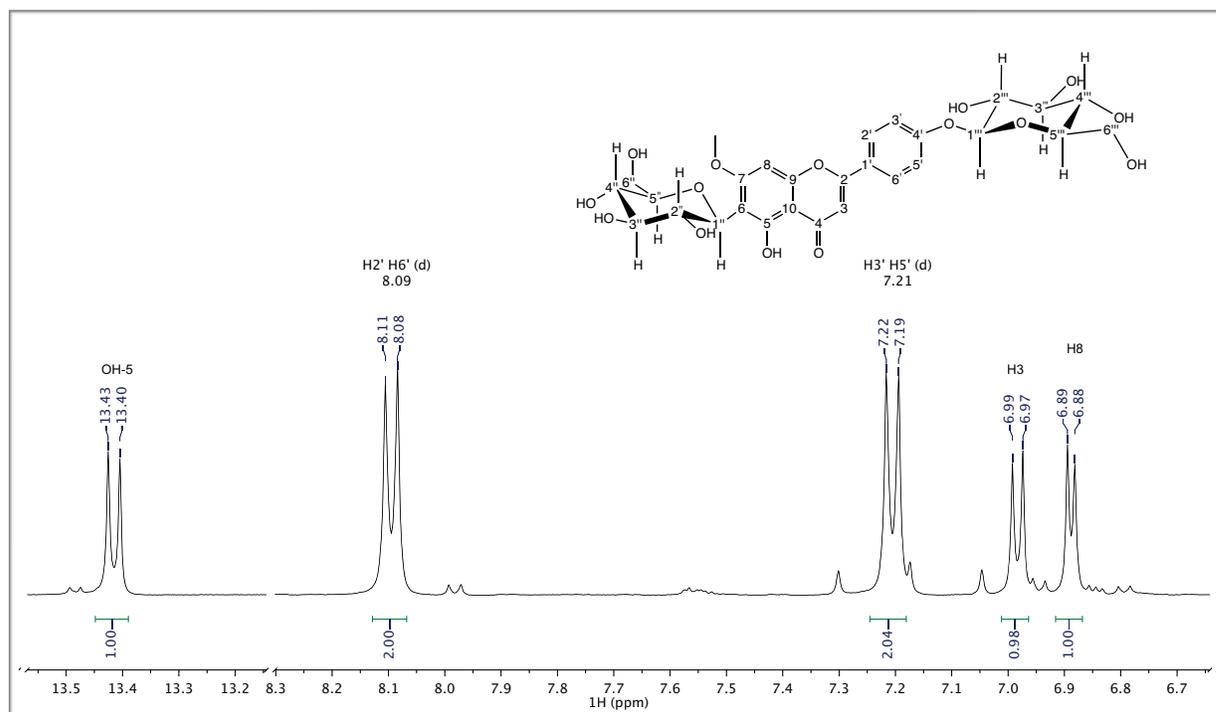


Figura 27. Estructura de la flavocommelina (Compuesto CC-2)^{71 y 89}.

En el Espectro 20 se observa una señal que se encuentra muy desplazada a campo bajo, 13.43 (13.40) ppm, es un singulete que pertenece a un protón muy desprotegido, este protón corresponde al hidroxilo del C5, cuya desprotección es causada por varios factores: el enlace con un oxígeno, la cercanía a un anillo aromático y a un grupo carbonilo y la formación de un enlace de hidrógeno. La señal se tomó como referencia de integración para un protón. En 8.09 y 7.21 ppm se encontraron dos dobles con una constante de acoplamiento de 8.5 Hz que integran cada una a dos protones, estas señales corresponden a un sistema AAXX' para un anillo aromático *para* sustituido, dicho sistema se encuentra en el anillo B de la flavona. Posteriormente, se observaron una simple en 6.99 (6.97) ppm y otra en 6.89 (6.88) ppm, estas señales son las únicas que restan en la zona de protones aromáticos, su multiplicidad indica que no están acopladas con otros protones, por lo que

una de estas señales debe de estar en la posición C3 y la otra en el anillo A (el anillo A, por tanto, debe tener las demás posiciones sustituidas), ambas señales integran a un protón respectivamente.

Espectro 20. RMN-¹H Compuesto CC-2 (400 MHz, DMSO-*d*₆)



En 5.04 ppm se observa un doblete con una $J=6.9$ Hz y en 4.60 (4.58) ppm hay otra señal doble con una $J=9.3$ Hz ambas integran a un protón, en esta zona regularmente se presentan las señales para los protones anoméricos, por lo que se deduce que la molécula tiene dos unidades de azúcar. En 3.90 (3.87) ppm aparece un singulete intenso que integra a 3H, el desplazamiento, multiplicidad e integración sugieren que pertenece a los protones de un grupo metilo (Espectro 21).

Se comparan los resultados experimentales con los reportados en los estudios hechos al colorante aislado de *Commelina communis* y se encuentra que el compuesto corresponde a la flavona hallada en el complejo de commelinina, la flavocommelina⁸⁸. En la Tabla 11 se muestran las asignaciones de las señales del compuesto:

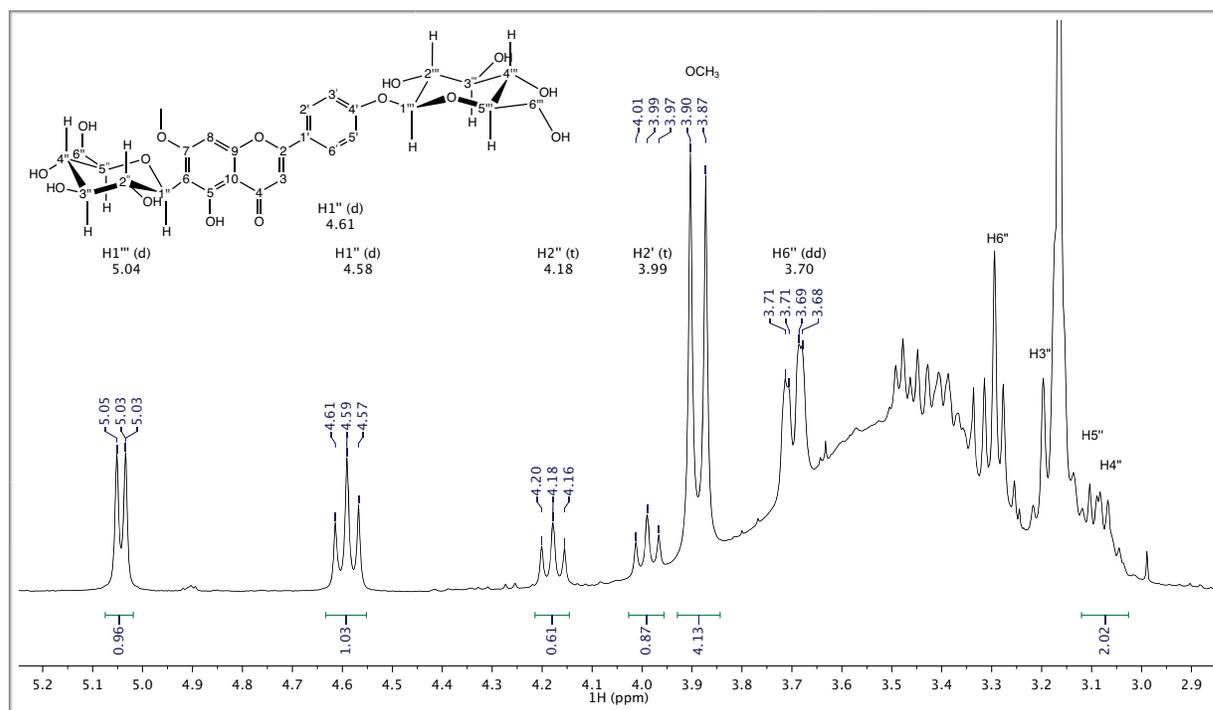
Espectro 21. RMN-¹H Compuesto CC-2 (400 MHz, DMSO-*d*₆)

Tabla 11. Asignación de las señales del espectro para el compuesto CC-2.

Posición	multiplicidad	δ (ppm)	J (Hz)	Integración
OH-5	s	13.43, 13.40	-	1H
H2'/H6'	d	8.09	8.5	2H
H3'/H5'	d	7.21	8.4	2H
H3	s	6.99, 6.97	-	1H
H8	s	6.89, 6.88	-	1H
H1'''	d	5.04	6.9	1H
H1''	d	4.60, 4.58	9.3	1H
H2''	t	4.18, 3.99	9.1, 9.2	1H
H6''	dd	3.70	10.8, 2.8	1H
	m	3.29	-	1H
H3''	m	3.22	-	-
H5''	m	3.12	-	-
H4''	m	3.07	-	-
OCH ₃	s	3.90, 3.87	-	3H

6.3.3 Compuestos en CC-8

El aspecto de esta muestra es de un sólido amorfo color magenta. En placa de CCD de C_{18} se observó un compuesto mayoritario con R.f 0.37. En el espectro de FT-IR (Espectro 22) de la muestra, se observaron las bandas de absorción para los siguientes grupos funcionales (Tabla 12):

Espectro 22. FT-IR Compuestos en CC-8 (Técnica: Película MeOH)

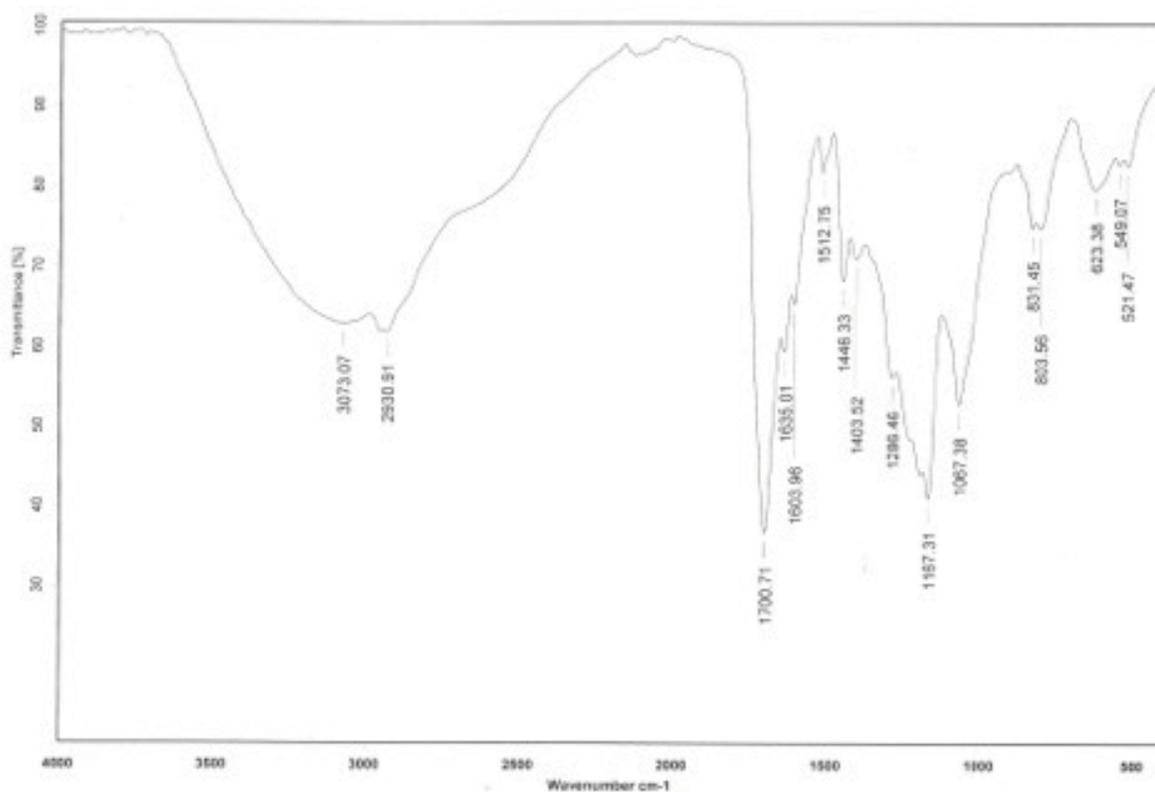
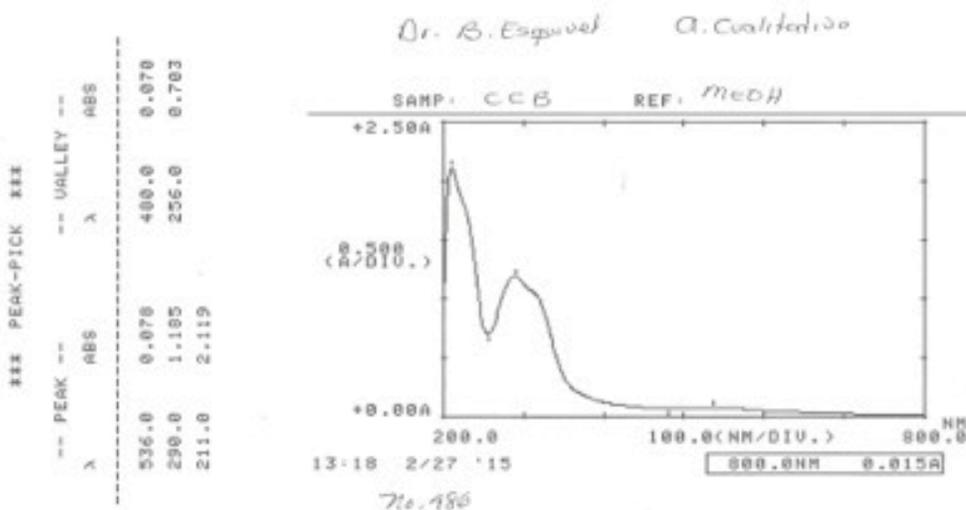


Tabla 12. Principales bandas de absorción del espectro de infrarrojo de la muestra CC-8.

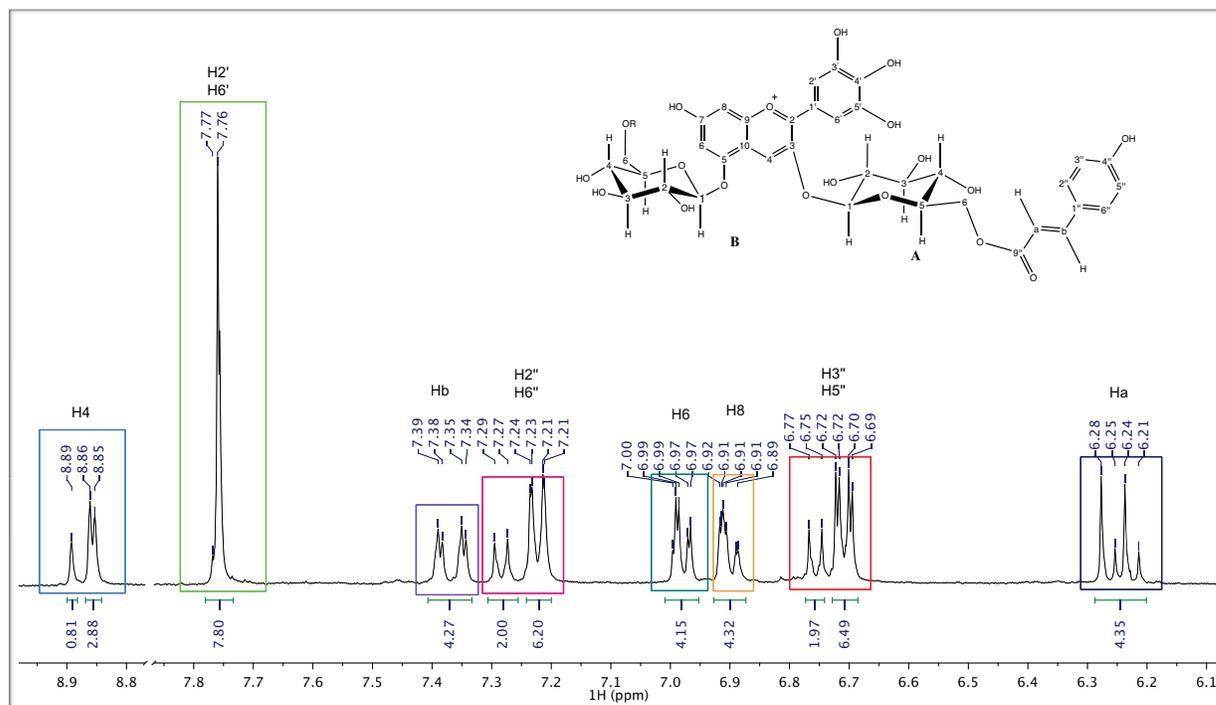
Frecuencia (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Tipo de vibración
3073	Alcohol/ Aromático	estiramiento enlace O-H estiramiento enlace C-H
549	Alcohol	torsión enlace O-H
1286	Alcohol (fenol)	estiramiento enlace C-OH
1067	Alcohol (secundario)	estiramiento enlace C-OH
831, 833 y 623	Aromático	torsión fuera del plano enlace C-H
1635, 1604, 1446 y 1403	Aromático	sobretonos enlace C-H
1701	Carbonilo de éster	estiramiento enlace C=O
1167	Éter aromático	estiramiento simétrico y asimétrico enlace (C=C)-O-R

Se obtuvo el espectro UV-vis (Espectro 23), en donde se observan tres máximos de absorción en 536, 290 y 211 nm. La banda en 290 nm presenta un pequeño “hombro”. El perfil del espectro concuerda para el esperado por las antocianinas y los valores en espectro de FT-IR sugieren que es una antocianina glicosidada.

Espectro 23. UV-vis Compuestos CC-8 (Análisis cualitativo; Referencia: MeOH).

En el espectro de ^1H -RMN obtenido de la muestra CC-8 se aprecia que está conformado por una mezcla de compuestos (Espectro 24). Las señales alrededor de 7 ppm corresponden a protones de tipo aromático y las señales entre 5-4 ppm corresponden a los protones alifáticos desplazados a campo alto por algún grupo desprotector, estas señales son características de los protones de azúcar.

Espectro 24. RMN- ^1H Compuestos en CC-8 (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD} + \text{TFA}$)



Se observaron tres señales simples desplazadas a campo bajo (8.89, 8.86 y 8.85 ppm), y asumiendo que la muestra contiene antocianinas, por los valores de las bandas de absorción en el espectro de UV, estas señales deben de corresponder al protón del C-4 de una antocianina, teniendo por tanto un total de tres antocianinas en la muestra. Al tratarse de una mezcla, los compuestos se encuentran en diferente proporción, por lo que se toma la integración de la primera señal (8.89 ppm) como referencia de 1H; las señales restantes (8.86 y 8.85 ppm) integran a 2H y 1H cada una, por lo que la relación de las antocianinas es de 1:2:1. En el espectro correspondiente a la muestra CC-8, se enmarcan en cuadros de diferente color las señales de los protones con la misma posición en el núcleo flavonoide para cada antocianina.

La señal más desplazada a campo bajo (8.89 ppm) es un singulete que integra a 1H, por lo que el protón que produce esta señal debe de estar cercano a grupos/sistemas desprotectores. Esta posición desprotegida, como ya se mencionó, se sitúa en el C4, ya que este carbono está participando en un sistema que presenta resonancia entre el heterociclo y el anillo A de la antocianina, esta señal se toma como referencia de integración para las señales restantes del espectro. La señal en 7.77 ppm es un singulete de alta intensidad y que se encuentra traslapado con otros dos singuletes, ambos en 7.76 ppm de las otras antocianinas y en conjunto estas señales integran a 8H; por lo que estas señales corresponden a los protones de un anillo aromático de un sistema A₂, en donde la simetría en la molécula provoca que los protones sean químicamente equivalentes y produzcan una señal simple, este sistema se presenta en el anillo B del núcleo flavonoide. En la zona 7.40-7.30 ppm se encontraron tres señales dobles, su integración corresponde a la relación 1:2:1 para dar un total de 4H y la constante de acoplamiento (*J*) es de 15.9 Hz en cada una; esta misma constante de acoplamiento se presenta en tres dobletes ubicados en zona de 6.30-6.20 ppm y que también integran a cuatro protones, por tanto, el sistema corresponde a protones vinílicos, la magnitud de la constante de acoplamiento nos indica que estos protones están en una posición *trans* (el rango típico suele encontrarse entre 14-19 Hz). En 7.28 ppm se encuentra un doblete con una constante de 8.6 Hz que integra a 2H y que tiene su contraparte en 6.76 ppm con la misma constante de acoplamiento e integración; el desplazamiento de ambas señales son características para protones aromáticos, la multiplicidad, integración y constante de acoplamiento son característicos de un sistema A₂X₂' de un anillo bencénico 1-4 disustituido. Este sistema se repite en 7.22 ppm y en 6.71 ppm, cada señal integra a 6H, lo que concuerda con la proporción de las dos antocianinas restantes. Señales de los protones vinílicos y un anillo aromático *para* sustituido indican la presencia de un grupo cumaril que respalda el carbonilo en 1701 cm⁻¹ en el espectro de FT-IR. En 7.00-6.97 ppm se encuentran tres señales dobles con una constante de acoplamiento de 2.0, 2.1 y 2.1 Hz respectivamente, y que integran a cuatro protones, en la región de 6.92-6.89 ppm se encuentran otras tres señales con las mismas características. El desplazamiento químico indica que se encuentran en la zona de los protones de tipo aromático; la multiplicidad y el valor de la constante de acoplamiento indican que para cada anillo hay dos protones y que éstos se encuentran en posición *meta*. Estos protones corresponden al anillo A de la antocianina.

la malonil awobanina, es probable que las dos antocianinas restantes (awobanina y el éster de la malonilawobanina) hayan sido producidas durante el desarrollo de la columna con disolventes ácidos (MeOH-1% HCl) debido al carácter lábil del grupo malonil. A continuación, se muestran las estructuras químicas de estas antocianinas y una tabla con las asignaciones para cada compuesto (Figura 28 y Tabla 13).

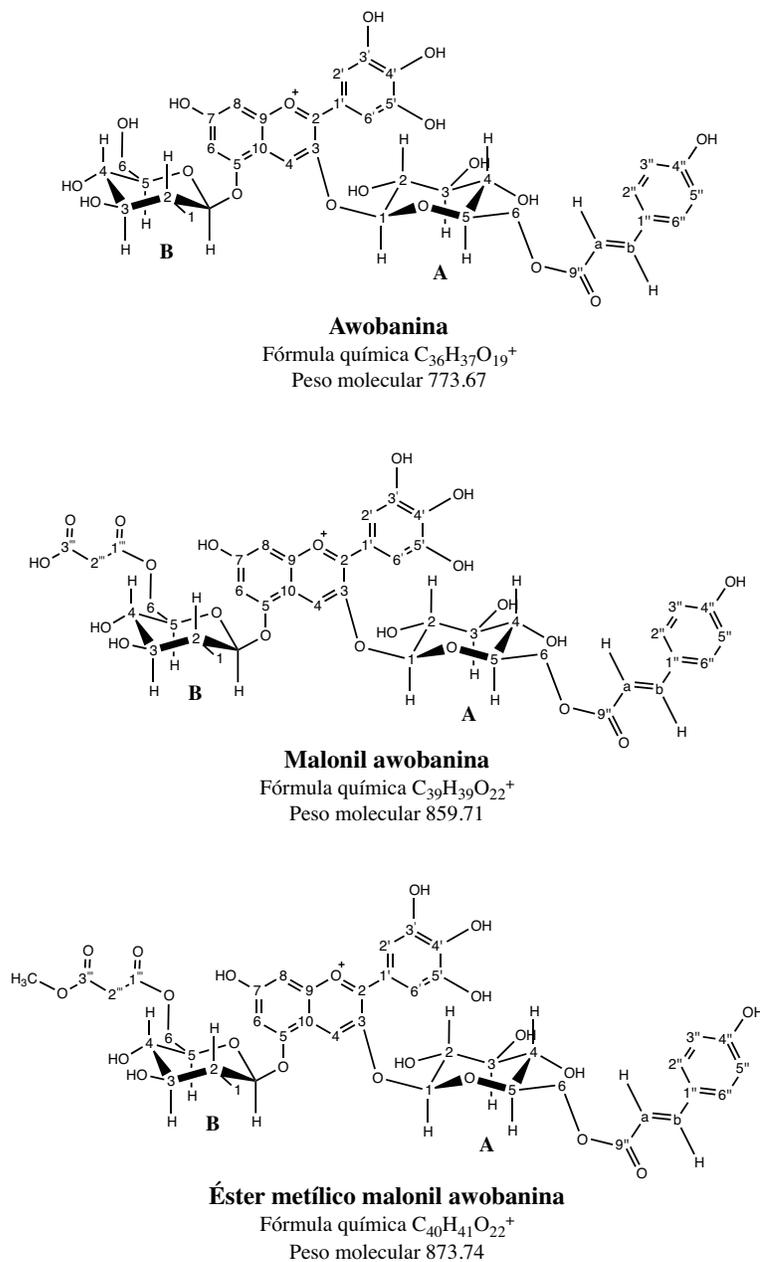


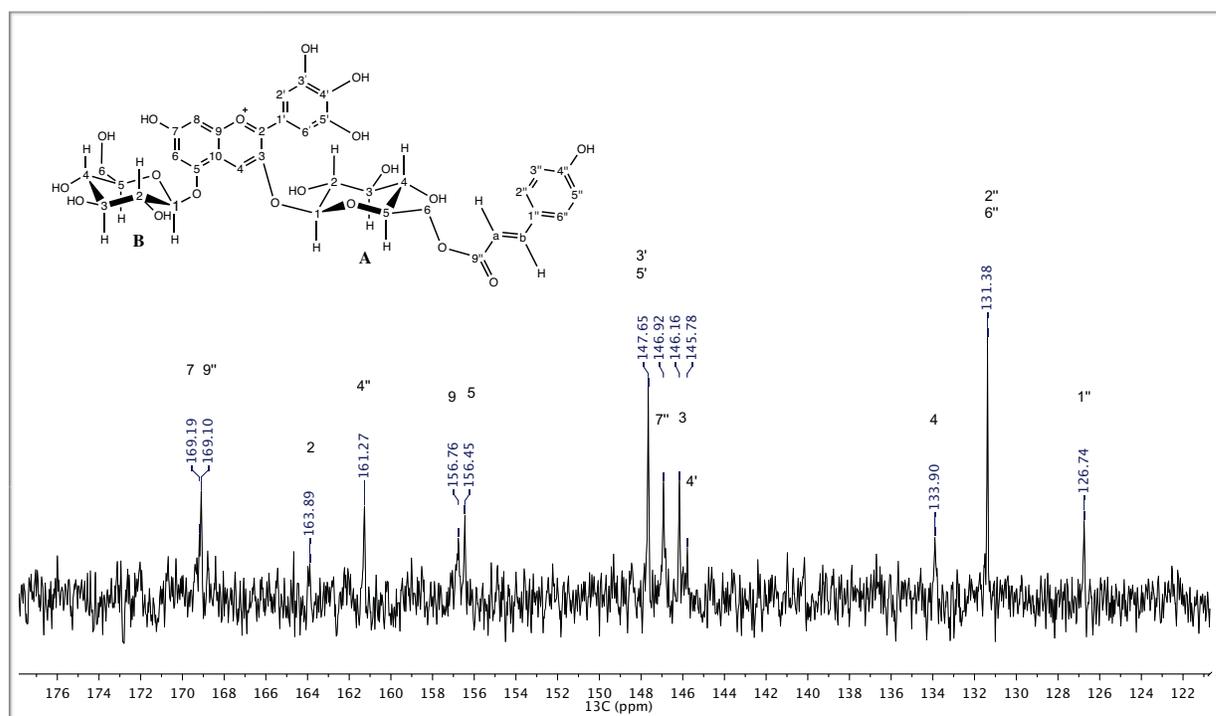
Figura 28. Estructuras químicas, peso molecular y fórmula química de la awobanina, malonilawobanina y el éster metílico de la malonilawobanina⁹⁰.

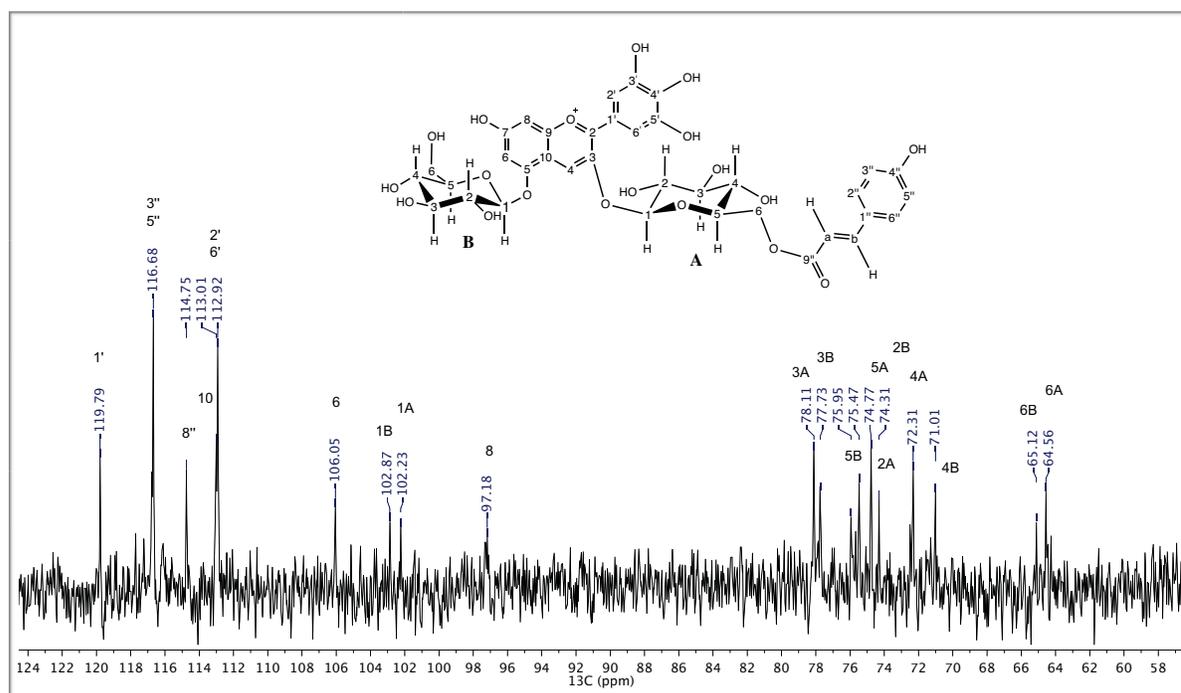
Tabla 13. Asignaciones de las tres antocianinas en la muestra CC-8 en ¹H-RMN.

Muestra CC-8 (400 MHz, CD ₃ OD+TFA)									
	Awobanina			Malonil awobanina			Éster malonil awobanina		
Posición	δ (ppm)	m	J (Hz)	δ (ppm)	m	J (Hz)	δ (ppm)	m	J (Hz)
H4	8.89	s	-	8.86	s	-	8.85	s	-
H2' / H6'	7.77	s	-	7.76	s	-	7.76	s	-
Hβ	7.35	d	15.9	7.37	d	15.9	7.37	d	15.9
H2'' / H6''	7.28	d	8.6	7.22	d	8.5	7.22	d	8.6
H6	6.97	d	2.0	6.99	d	2.1	6.99	d	2.1
H8	6.89	d	1.2	6.91	d	2.0	6.91	d	2.2
H3'' / H5''	6.76	d	8.6	6.71	d	8.7	6.71	d	8.7
Hα	6.23	d	15.9	6.25	d	15.9	6.26	d	15.9
H1B	5.45	d	7.8	5.45	d	7.8	5.42	d	7.8
H1A	5.18	d	8.0	5.19	d	8.0	5.19	d	8.0
H6aA	4.52	dd	2.9, 11.8	4.48	dd	4.6, 11.3	4.53	dd	4, 12
H6bA	4.50	dd	7.8, 13.1	4.47	dd	7.5, 11.5	4.24	dd	5.6, 11.4
H6aB	3.98	dd	7.4, 1.9	4.53	dd	2, 11	4.51	dd	3, 11.3
H6bB	3.73	dd	5.3, 11.3	4.21	dd	5.7, 11.2	4.47	dd	8.8, 12.8
H5A	3.96	ddd	3, 8, 11.5	3.96	ddd	3, 8, 11	3.96	m	-
H5B	3.60	t	9.5	3.79	m	-	3.79	m	-
H4A	3.53	m	-	3.49	t	9.3	3.53	m	-
H4B	3.45	m	-	3.45	m	-	3.50	m	-
H3A	3.64	m	-	3.62	t	9.0	3.64	m	-
H3B	3.59	t	9.5	3.56	t	9.1	-	m	-
H2A	3.79	dd	8, 9.5	3.79	m	-	3.82	m	-
H2B	3.77	dd	8, 9.5	3.79	m	-	3.80	m	-
2'''	-	-	-	3.35	s	-	3.35	s	-
OCH ₃	-	-	-	-	-	-	3.67	s	-

Por otra parte, el espectro de carbono la muestra CC-8 únicamente muestra las señales de un compuesto, las cuales al ser comparadas con en la literatura científica, corresponden a la awobanina⁹⁰ (Figura , Espectro 26 y 27). En el espectro únicamente se encuentra una señal de carbonilo en 169.1 ppm y no se observan señales de carbonos -CH₃, las cuales se encuentran regularmente entre 60-50 ppm, la ausencia de estas señales descarta que el espectro corresponda a la malonilawobanina y/o al éster metílico de la malonil awobanina (Tabla 14).

Espectro 26. RMN-¹³C Compuesto CC-8 (400 MHz, CD₃OD)



Espectro 27. RMN- ^{13}C Compuesto CC-8 (400 MHz, CD_3OD)

Espectro 28. Experimentos DEPT 90 y 135

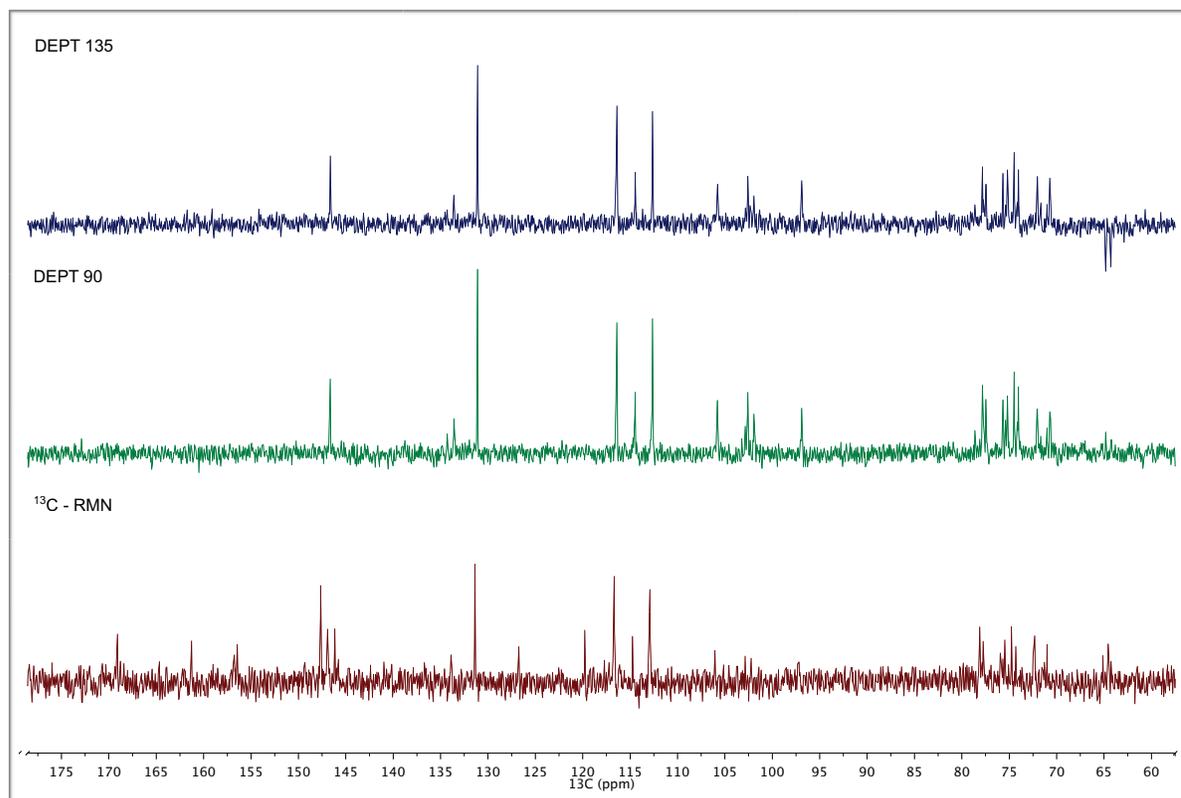


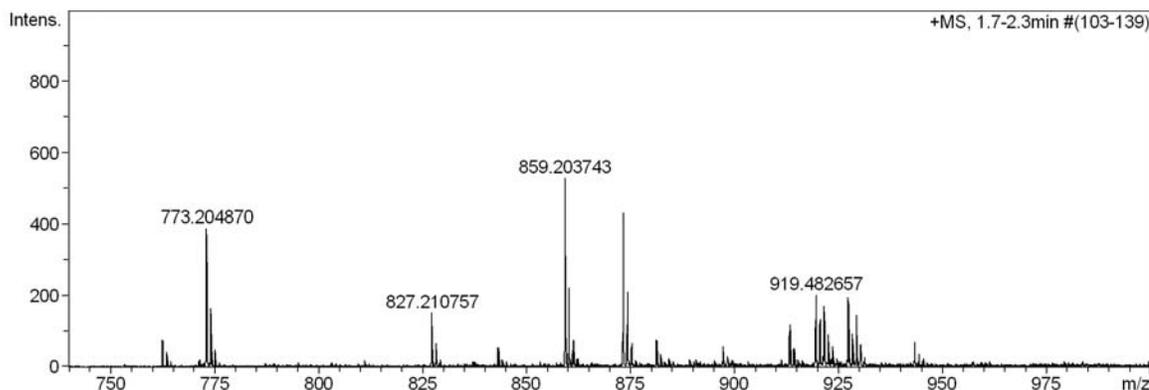
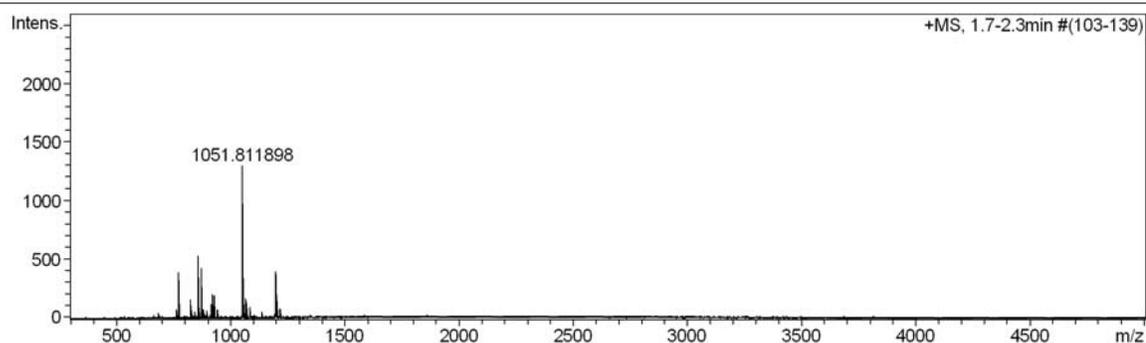
Tabla 14. Asignaciones del compuesto presente en la muestra CC-8 en RMN-¹³C

Posición	¹³ C (ppm)	DEPT 90	DEPT 135	Posición	¹³ C (ppm)	DEPT 90	DEPT 135
C7	169.2	-	-	C10	113.0	-	-
C=O	169.1	-	-	C2' C6'	112.9	positivo	positivo
C2	163.9	-	-	C6	106.0	positivo	positivo
C4''	161.3	-	-	C1B	102.9	positivo	positivo
C9	156.8	-	-	C1A	102.2	positivo	positivo
C5	156.4	-	-	C8	97.2	positivo	positivo
C3' C5'	147.6	-	-	C3A	78.1	positivo	positivo
Ca	146.9	positivo	positivo	C3B	77.7	positivo	positivo
C3	146.2	-	-	C5B	76.0	positivo	positivo
C4'	145.8	-	-	C5A	75.5	positivo	positivo
C4	133.9	-	-	C2B	74.3	positivo	positivo
C6'' C2''	131.4	positivo	positivo	C2A	74.3	positivo	positivo
C1''	126.7	-	-	C4A	72.3	positivo	positivo
C1'	119.2	-	-	C4B	71.0	positivo	positivo
C3'' C5''	116.7	positivo	positivo	C6B	65.1	-	negativo
Cβ	114.8	positivo	positivo	C6A	64.6	-	negativo

La presencia de estas tres antocianinas se corrobora en el espectro de masas bajo la técnica ESI en modo positivo (Espectro 29). El pico en m/z 773.2 corresponde a la masa molecular de la awobanina; el pico en m/z 859.2 es para la malonilawobanina y el pico en m/z 873.2 corresponde a la masa molecular del éster metílico de la malonilawobanina⁹⁰. De estos tres picos, el de mayor abundancia es para la malonilawobanina y el minoritario es para la awobanina, esta información concuerda con lo observado en el espectro de ¹H-RMN. Posiblemente el pico en m/z 919.5 corresponda a la antocianina violanina, la cual fue encontrada y caracterizada en la especie *Commelina communis*⁹⁰.

Espectro 29. ESI(+)-EM Compuestos CC-8 (MeOH).**Acquisition Parameter**

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4200 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	5000 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Waste



Como observaciones finales, se relaciona los componentes y compuestos identificados en este fraccionamiento del colorante azul “purificado” (azúcares, flavocommelina, awobanina, malonilawobanina y el éster metílico de la malonilawobanina) con los picos del Cromatograma 3 (380 nm), cuya muestra pertenece también al colorante azul “purificado”.

Los primeros picos del cromatograma corresponden a la primera fracción colectada columna (fracción CC-1), los valores de las bandas de absorción de sus espectros de UV-vis son similares y el espectro de masas por la técnica DART (Espectro 19) posee el perfil de azúcares, por lo tanto, los primeros picos del cromatograma (#1 al #3) corresponden a moléculas de azúcar. El primer compuesto mayoritario (pico #4 en 8.37 min), produce un espectro de UV-vis con bandas de absorción en 271 y 327 nm característicos de una flavona, la muestra CC-2 presenta a simple vista

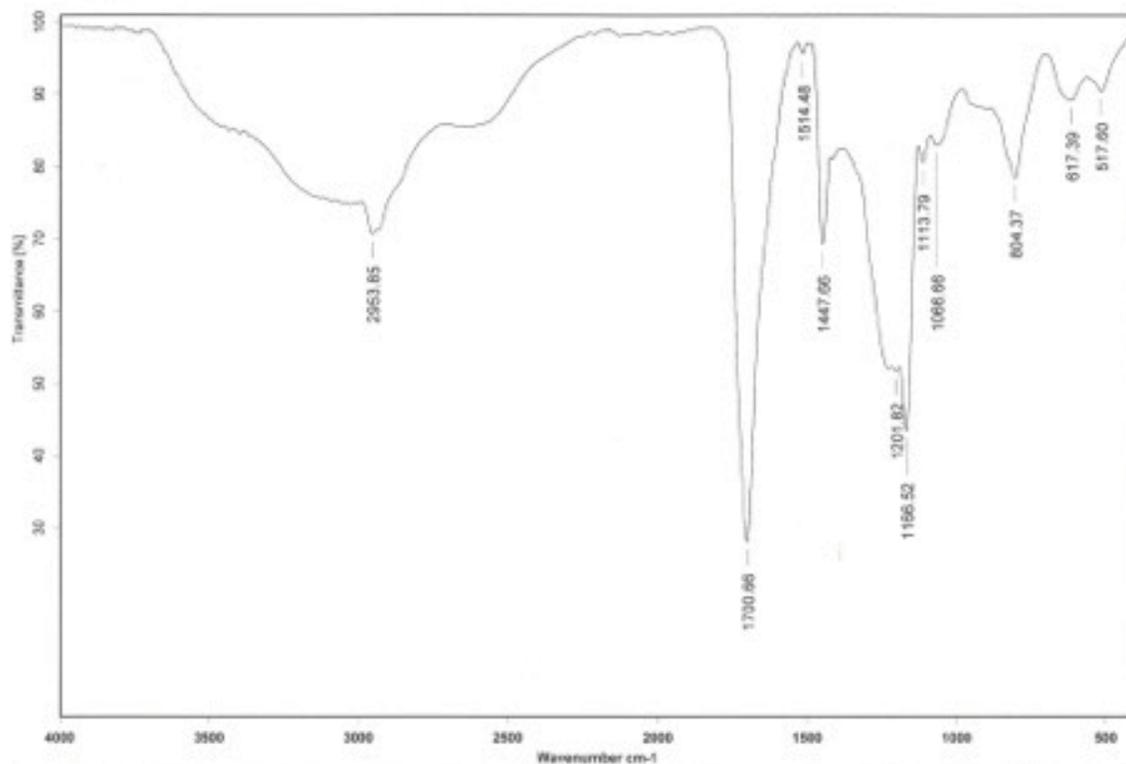
un color amarillo, por lo que al no encontrarse otro compuesto mayoritario con espectro de UV-vis similar, este pico corresponde a la flavocommelina. Así también, un compuesto mayoritario en el pico #6 en 20.40 min y que presenta un espectro UV-vis con bandas de absorción principales en 278 y 532 nm características de una antocianina, se relaciona con la fracción CC-8 que contiene a la malonilawobanina y cuyo espectro UV-vis presenta valores similares (Tabla 15).

Tabla 15. Comparación de los compuestos mayoritarios en el Cromatograma 3 con los componentes obtenidos del fraccionamiento del colorante azul “purificado”.

Fracción	Componente identificado	UV-vis fracción (nm)	No. pico en Cromatograma 3	Tiempo retención	UV-vis Crom (nm)
CC-1	Azúcares	207 y 380	1, 2 y 3	1.4, 1.8 y 2.0	281 (pico #3)
CC-2	Flavocommelina	-	4	8.37	271 y 327
CC-8	Malonilawobanina (awobanina y éster de la malonilawobanina)	211, 290 y 536	6	20.40	278 y 532

6.3 Fracciones moradas: Compuesto CA-A1

Como se mencionó en la Sección 4.7, se logró aislar 3.5 mg de un compuesto en la muestra denominada como CA-A1. En el espectro de infrarrojo se observan bandas de absorción características de los grupos funcionales características de un compuesto de tipo flavonoide y especialmente se observa una banda muy intensa en 1701 cm^{-1} , lo que indica que hay una fuerte presencia de grupos carbonilo en la muestra (Espectro 30). En Tabla 16 se encuentran las asignaciones de las frecuencias de las bandas de absorción principales y al tipo de vibración del enlace al que pertenecen.

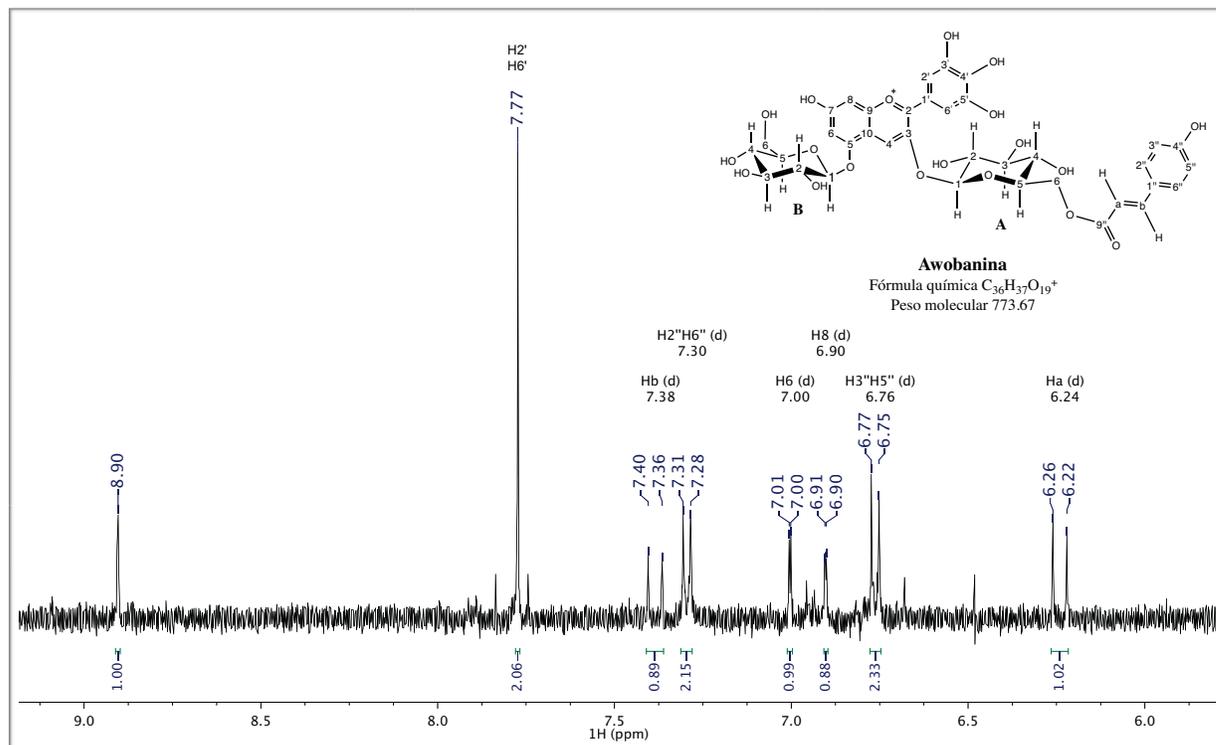
Espectro 30. FT-IR Compuesto CA-A1 (Técnica: Película MeOH)**Tabla 16.** Principales grupos funcionales presentes en el espectro de FT-IR de la muestra CA-A1.

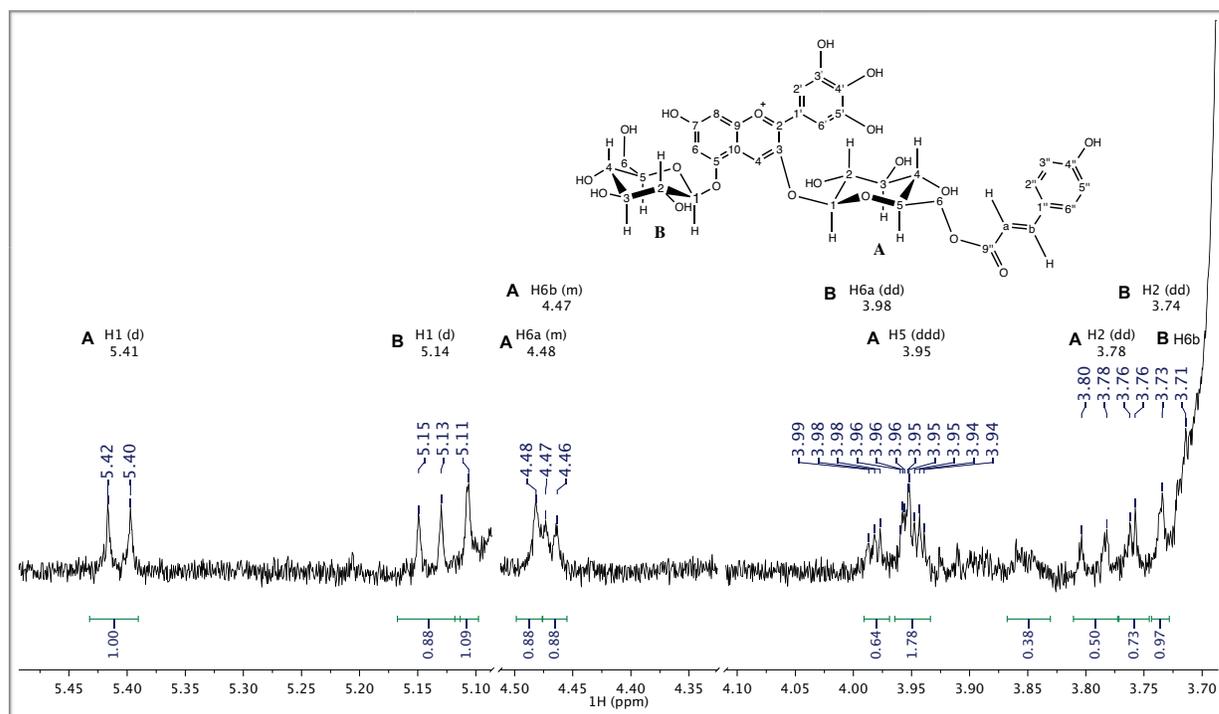
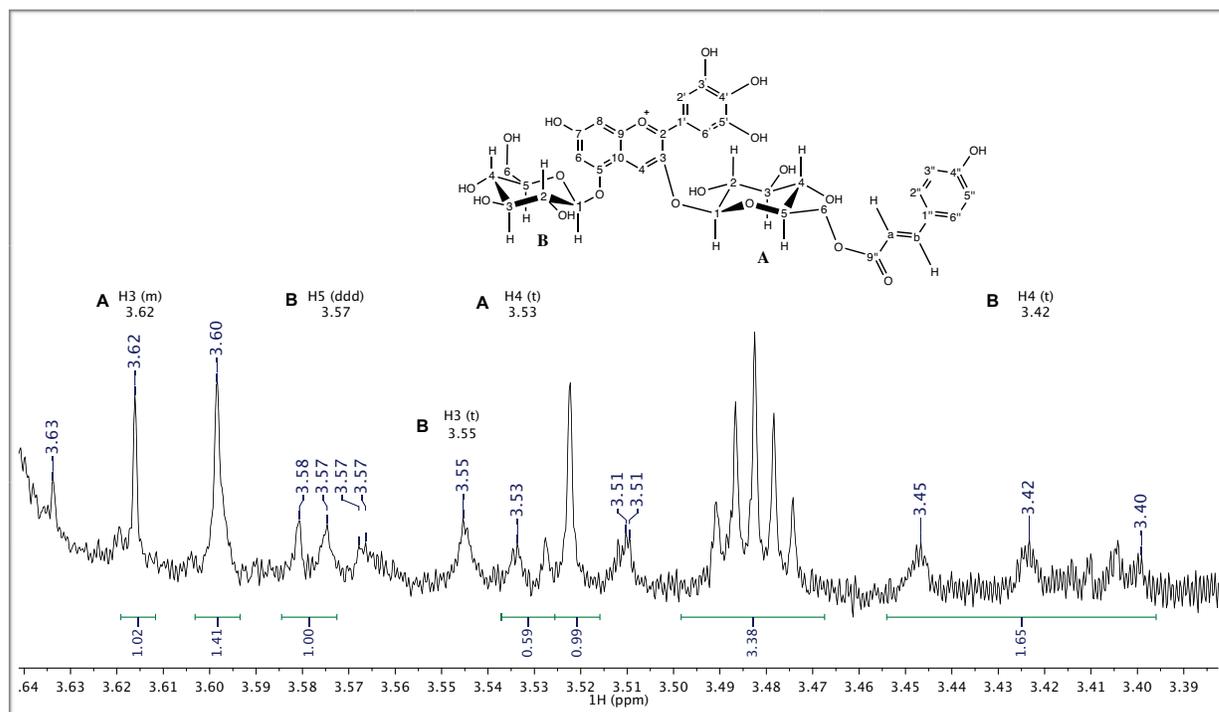
Frecuencia (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Tipo de vibración
>3000	Alcohol/ Aromático	estiramiento enlace O-H estiramiento enlace C-H
2954	Alcano (sp^3)	estiramiento asimétrico enlace H-C-H
518	Alcohol	torsión enlace O-H
1202	Alcohol (fenol)	estiramiento enlace C-OH
1167	Alcohol (secundario)	estiramiento enlace C-OH
804 y 617	Aromático	torsión fuera del plano enlace C-H
2000-1600 (sobretonos)	Aromático	sobretonos enlace C-H
1701	Carbonilo de éster	estiramiento enlace C=O
1167	Éter aromático	estiramiento simétrico y asimétrico enlace (C=C)-O-R

En el espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD} + \text{TFA}$) se aprecia que la muestra contiene un compuesto mayoritario y cuyo perfil espectroscópico es propio de una antocianina (Espectro 31-33). Se observan señales de protones aromáticos entre 9-6 ppm y señales de protones alifáticos con base de oxígeno entre 5.5-3.5 ppm, las cuales pertenecen a los protones de un azúcar. Los valores de desplazamiento químico, multiplicidad, constante de acoplamiento e integración del compuesto en la muestra CA-A1 son los mismos que el compuesto presente en la muestra CC-8 y concuerdan con los valores de la antocianina awobanina⁹⁰.

Es importante mencionar que en el espectro de CA-A1 no se aprecia un singlete entre ~ 3.4 ppm (Espectro 33), característica de los protones de un grupo malonil cuya integración correspondería a dos protones. De igual forma, no se aprecian señales simples entre ~ 2.2 ppm de grupos acetil y cuya integración correspondería a 3H. Por lo tanto, la molécula no puede ser ni la malonilawobanina ni el éster metílico de la malonilawobanina o algún derivado acetilado en las unidades de azúcar.

Espectro 31. Compuesto CA-A1 (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD} + \text{TFA}$)



Espectro 32. Compuesto CA-A1 (400 MHz, CD₃OD + TFA)Espectro 33. Compuesto CA-A1 (400 MHz, CD₃OD + TFA)

En la Tabla 17 se muestran las asignaciones para el compuesto CA-A1 y los datos reportados para la antocianina Awobanina⁹⁰.

Tabla 17. Asignaciones del compuesto CA-A1 y los reportados para la Awobanina

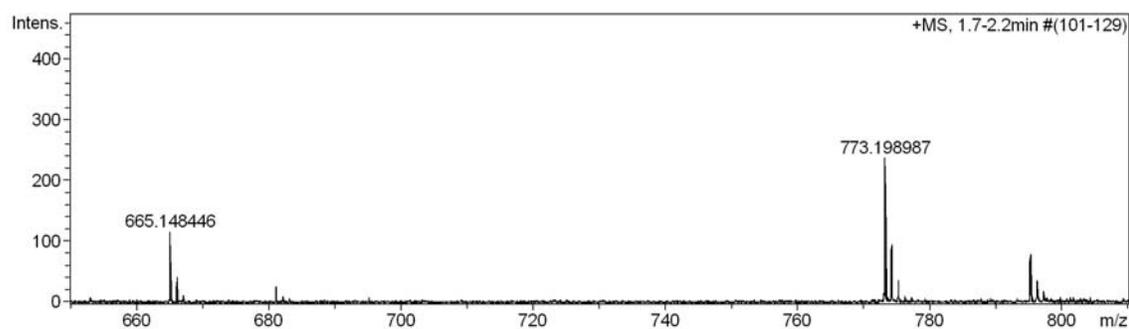
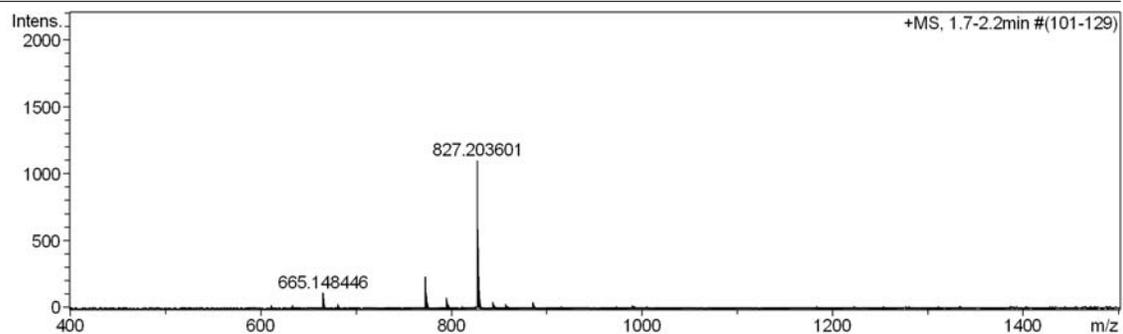
Posición	Muestra CA-A1				Awobanina (teórico ⁹⁰)			
	δ (ppm)	m	J (Hz)	I	δ	m	J	I
H4	8.90	s	-	1H	8.84	s	-	1H
H2'/H6'	7.77	s	-	2H	7.68	s	-	2H
H β	7.38	d	15.9	1H	7.35	d	16	1H
H2''/H6''	7.30	d	8.5	2H	7.25	d	8.5	2H
H6	7.00	d	1.9	1H	6.94	d	2	1H
H8	6.90	d	1.7	1H	6.83	d	2	1H
H3''/H5''	6.76	d	8.5	2H	6.73	d	8.5	2H
H α	6.24	d	15.9	1H	6.22	d	16	1H
H1A	5.41	d	7.8	1H	5.48	d	8	1H
H1B	5.14	d	7.8	1H	5.17	d	8	1H
H6aA	4.48	m	-	2H	4.50	dd	3, 12	1H
H6bA	4.47				4.48	dd	7, 12	1H
H6aB	3.98	dd	1, 3	1H	3.99	dd	2, 11	1H
H5A	3.95	ddd	1.7, 3, 3.3	1H	3.93	ddd	3, 7, 9.5	1H
H2A	3.78	dd	8, 9.5	1H	3.81	dd	8, 9.5	1H
H2B	3.74	dd	8, 9.5	1H	3.76	dd	8, 9.5	1H
H6bB	3.71	m	-	1H	3.73	dd	5, 11	1H
H3A	3.62	t	7.1	1H	3.64	t	9.5	1H
H5B	3.57	ddd	3.5, 7, 9.5	1H	3.61	ddd	3.5, 7, 9.5	1H
H3B	3.55	t	6.4	1H	3.58	t	9.5	1H
H4A	3.53	t	9.5	1H	3.53	t	9.5	1H
H4B	3.42	t	9.5	1H	3.45	t	9.5	1H

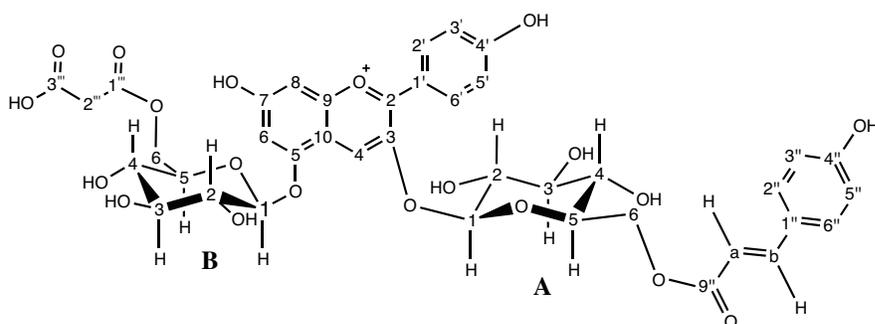
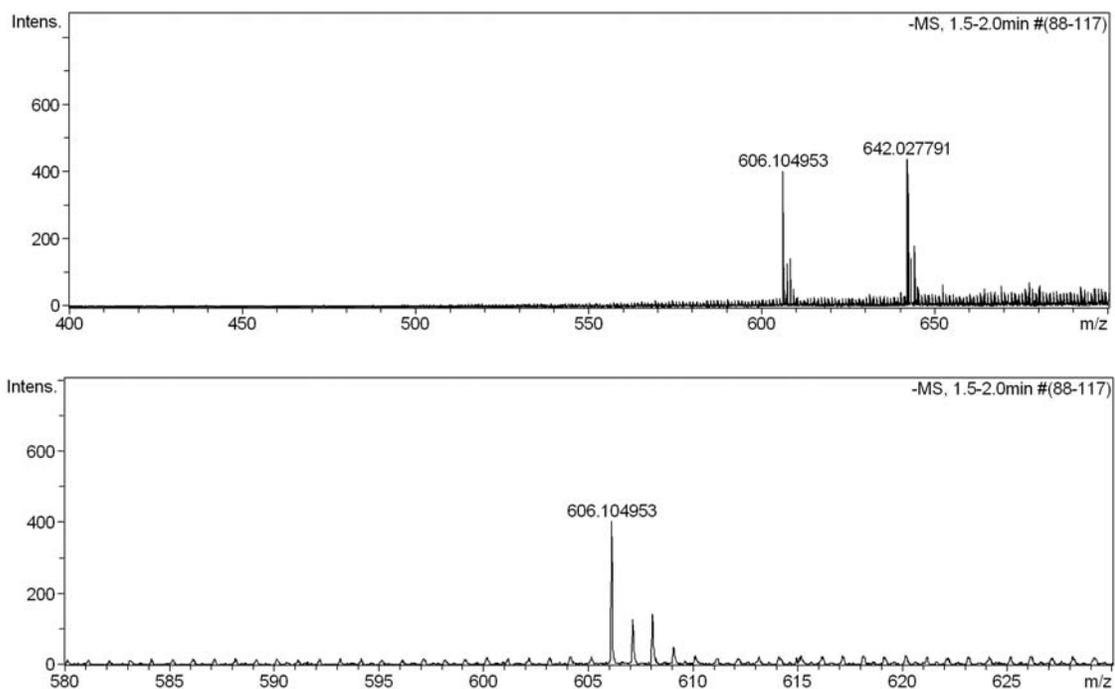
Finalmente, se realizó a la muestra un análisis de espectrometría de masas bajo la técnica de *electrospray* (ESI-EM) en modo positivo. En esta técnica, los fragmentos obtenidos son los cationes más estables (m/z): 827.2, 773.2 y 665.1. Se observó que el pico que caracteriza a la awobanina está presente en m/z 773.2, sin embargo, se aprecian otros picos, los cuales corresponden a los iones moleculares de otros compuestos. Se sugiere que el pico de m/z 827.2 corresponde a un derivado de la pelargonidina, 3-O-(6-O-p-cumaril- β -D-glucósido)-5-O(6-O-malonil- β -D-glucosil) pelargonidina, cuya estructura asemeja a la malonilawobanina salvo el patrón de sustitución en el anillo B de un solo hidroxilo en la posición C4' (Figura 29)

Espectro 34. ESI(+)-EM Compuesto CA-A1 (Disolvente: MeOH)

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4200 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	5000 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Waste





Fórmula química $C_{39}H_{39}O_{20}^+$
 Peso molecular 827.71

Figura 29. Derivado de la pelargonidina, la estructura asemeja a la malonilawobanina salvo el patrón de hidroxilación del anillo B.

Algo importante por mencionar, es que una de las fracciones moradas de la separación por permeación en gel, presentó la reconstrucción del colorante azul. Esto sucedió cuando la fracción no se concentró inmediatamente durante el progreso de la columna y se almacenó en el

refrigerador para preservar el contenido de ésta. La baja temperatura del refrigerador provocó que la disolución se congelara, lo peculiar de esta situación fue que en la parte central del vial se reconstruyó el colorante azul (Imagen 52). Al descongelarse la fracción, ésta volvió a su color violeta original. Una hipótesis para explicar este fenómeno es que, conforme el agua se va congelando en las paredes del vial, la concentración del líquido aún sin congelar va aumentando, permitiendo que los compuestos se encuentren más cercanos entre sí, y por tanto, facilitando las interacciones intermoleculares y reconstruir, bajo estas condiciones, un complejo azul.



Imagen 52. Vial que presentó la reconstrucción de un complejo azul al ser congelado.

6.4 Fracciones amarillas: Compuesto V14

Para este compuesto amarillo se reunió la cantidad suficiente para realizar los diferentes análisis espectroscópicos y espectrométricos. Primeramente se analizó el espectro de infrarrojo empleando la técnica de ATR (Espectro 35). En la Tabla 18 se muestra las asignaciones de las bandas de absorción de los diferentes grupos funcionales y el tipo de vibración a la que corresponden. Nuevamente, los grupos funcionales identificados en el espectro caracterizan a los compuestos de tipo flavonoide y por la presencia de las bandas de alcoholes alifáticos, es muy probable que la molécula tenga azúcares en su estructura.

Espectro 35. FT-IR Compuesto V14 (Técnica: ATR)

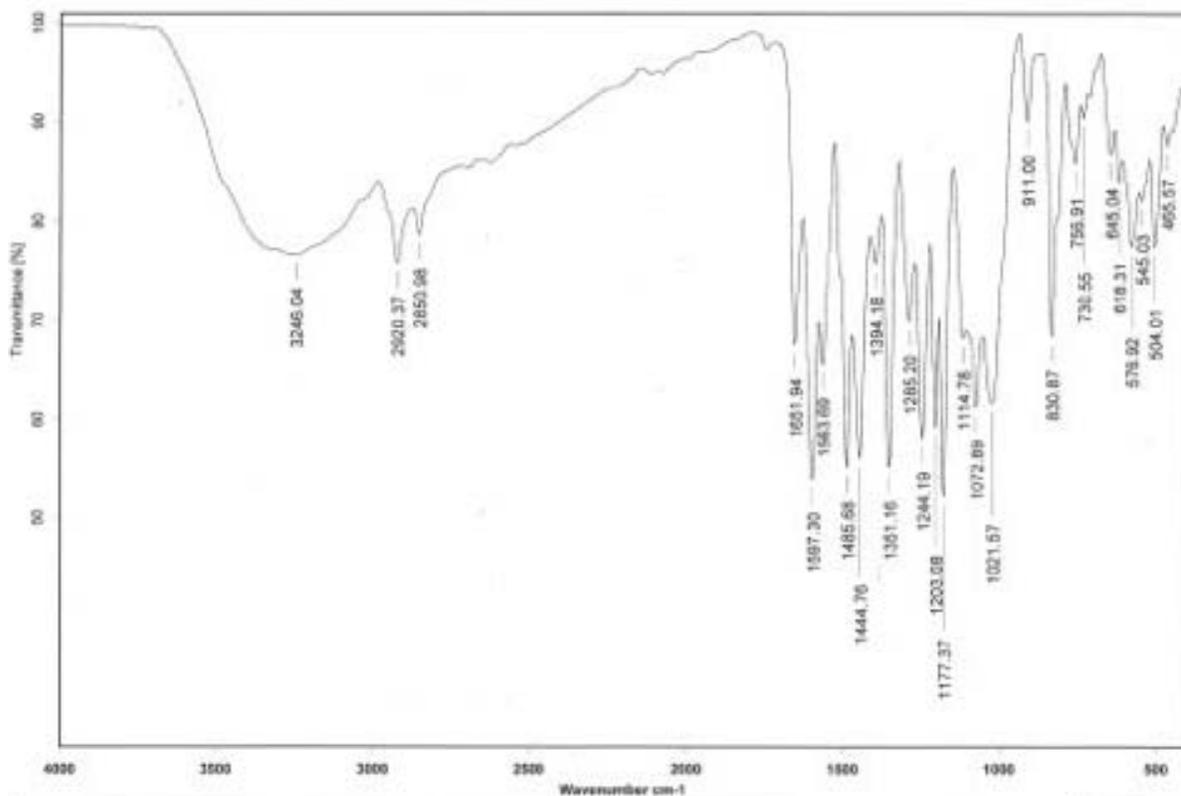


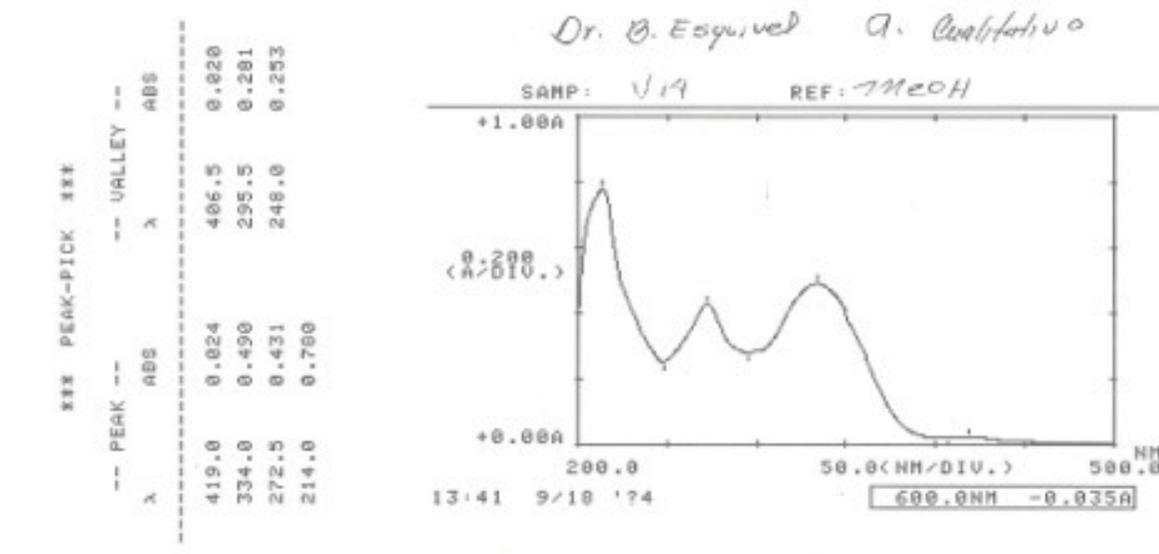
Tabla 18. Asignaciones de las bandas de absorción del compuesto V14 en el espectro de IR.

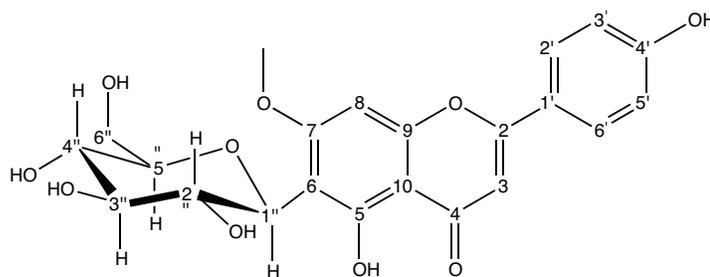
Frecuencia (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Tipo de vibración
3246	Alcohol/ Aromático	estiramiento enlace O-H estiramiento enlace π -H
2920 2851	Alqueno (metileno) Alqueno (metilo)	estiramiento asimétrico enlace H-C-H
2000-1600	Aromático	sobretonos enlace π -H
1652	Carbonilo de cetona	estiramiento enlace C=O

1597, 1564, 1486 y 1445	Aromático	estiramiento enlace C=C
1244 y 1072	Éter (aromático)	estiramiento simétrico y asimétrico enlace (C=C)-O-R
1203	Alcohol (fenol)	estiramiento enlace C-OH
1177	Alcohol (secundario)	estiramiento enlace C-OH
831	Aromático (disustitución <i>para</i>)	torsión fuera del plano enlace $\text{O}-\text{H}$
577	Alcohol	torsión enlace O-H

Se tomó el punto de fusión del compuesto aislado y se encontró que éste comenzó a fundir a 185°C, pero no lo hizo por completo, y a 210 °C comenzó su descomposición. En el espectro UV-vis (Espectro 36) se observó que los valores en la longitud de onda se encuentran con frecuencia en compuestos flavonoides tipo flavonas o flavonoles; estos valores son similares al compuesto de flavocommelitina reportado por Takeda y aislado de *Commelina communis*⁷¹ (Figura 30).

Espectro 36. UV-vis Compuesto V14 (Referencia: MeOH)





Flavoccommelitina

Fórmula química $C_{22}H_{22}O_{10}$

Peso molecular 446.12

Figura 30. Estructura química de la flavoccommelitina (Compuesto V14)⁷¹.

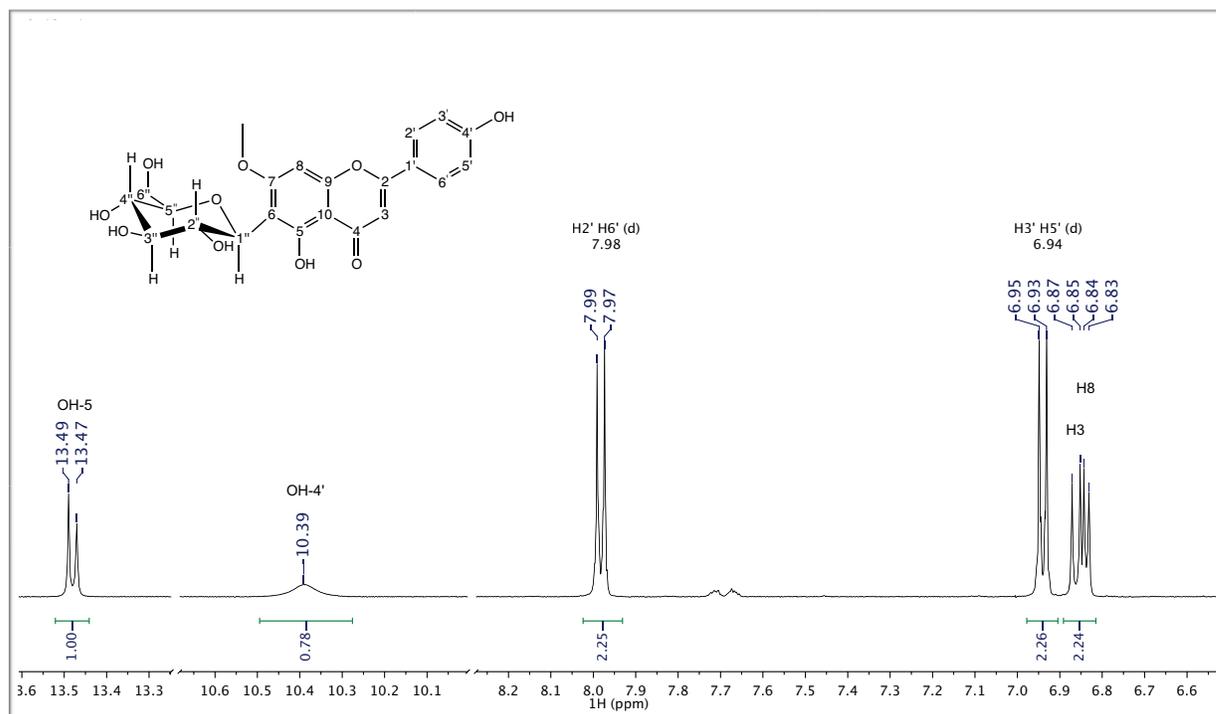
En el espectro de RMN- 1H (400 MHz, DMSO- d_6) como un primer acercamiento hacia su análisis, se observó que hay protones que tienen un carácter aromático por encontrarse en la zona ~ 7 ppm, se encontraron también protones de tipo alifático en la región entre 5-4 ppm, los cuales han sido desplazados a mayores ppm (campo bajo) debido a una desprotección por grupos vecinos con una alta densidad electrónica, en esta zona aparecen las señales de protones de unidades de azúcar (Espectro 37 y 38). De forma simultánea, se revisó el espectro de 1H -RMN (400 MHz) empleando como disolventes DMSO+ D_2O , el agua deuterada permitió distinguir las señales que realizan un rápido intercambio de protón/deuterio en un grupo hidroxilo (Espectro 39 y 40). De manera similar al compuesto encontrado en la muestra CC-2, la molécula presentó isomería rotacional, por lo que algunas señales se encuentran duplicadas.

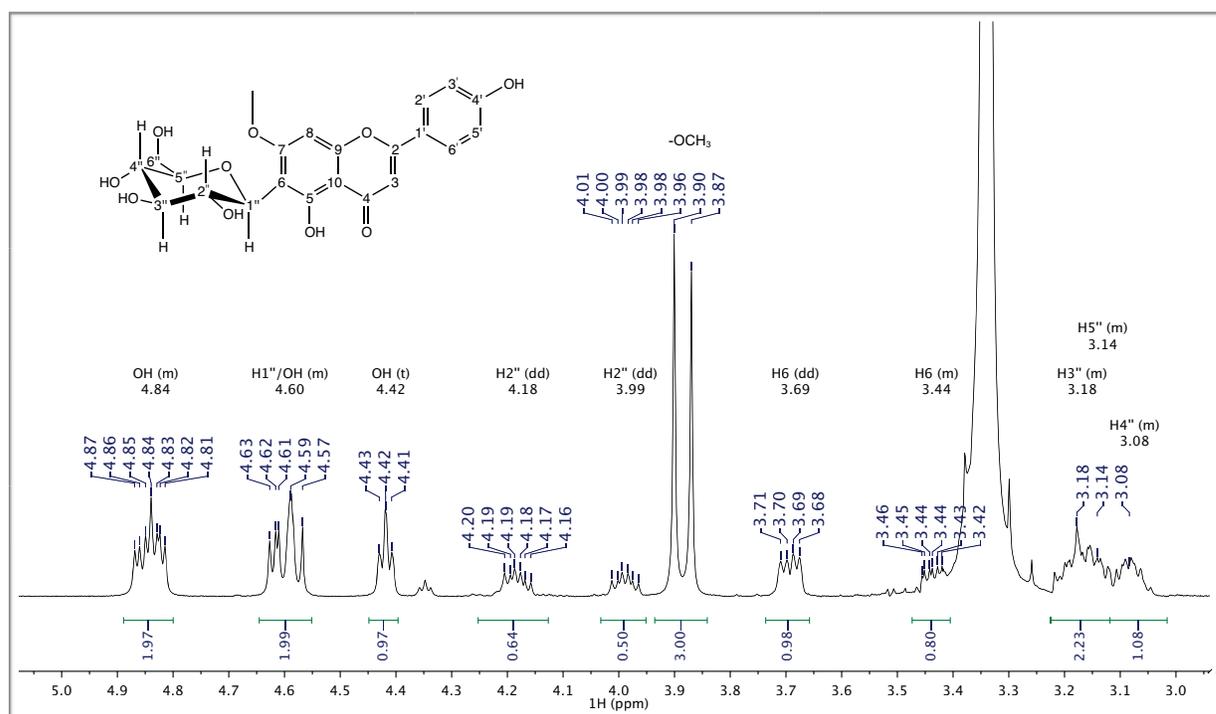
En 13.50 ppm se observan dos señales singuletes y que desaparecen en el espectro con agua deuterada, el desplazamiento a campo bajo sugiere que estos protones se encuentran muy desprotegidos, el protón que cumple dichas características es el del grupo hidroxilo unido al carbono 5 en una flavona/flavonol; este protón, además de estar enlazado a un oxígeno, tiene cercano un grupo carbonilo, favoreciendo que el protón forme un enlace de hidrógeno muy estable con el oxígeno del carbonilo, dando como resultado que el protón esté muy desprotegido desplazando su señal a campo bajo y que su intercambio con un protón del disolvente sea desfavorable. A esta señal se le asigna como referencia de integración de 1H. En 10.39 ppm se

encuentra una señal ancha que desaparece al agregarle D_2O , la señal corresponde a un hidroxilo de un fenol.

Posteriormente, se observan dos señales dobles en 7.98 y 6.93 ppm con una misma constante $J=8.9$ Hz y que integran a 2 protones cada una; el desplazamiento alrededor de 7 ppm nos indica que dichos protones son de tipo aromático y que están acoplados en un sistema $AA'XX'$; con base en las estructuras más comunes de los flavonoides, este sistema se presenta en el anillo B. Así también, se observan 4 singuletes entre 7-6.5 ppm y que en su totalidad integran a 2 protones, al ser señales simples, los protones no están acoplados con ningún otro protón, por lo tanto, una de estas señales pertenece al protón de la posición C3 que debe tener una doble ligadura con C2 (flavona) y la otra a un protón en el anillo A (el único protón del anillo).

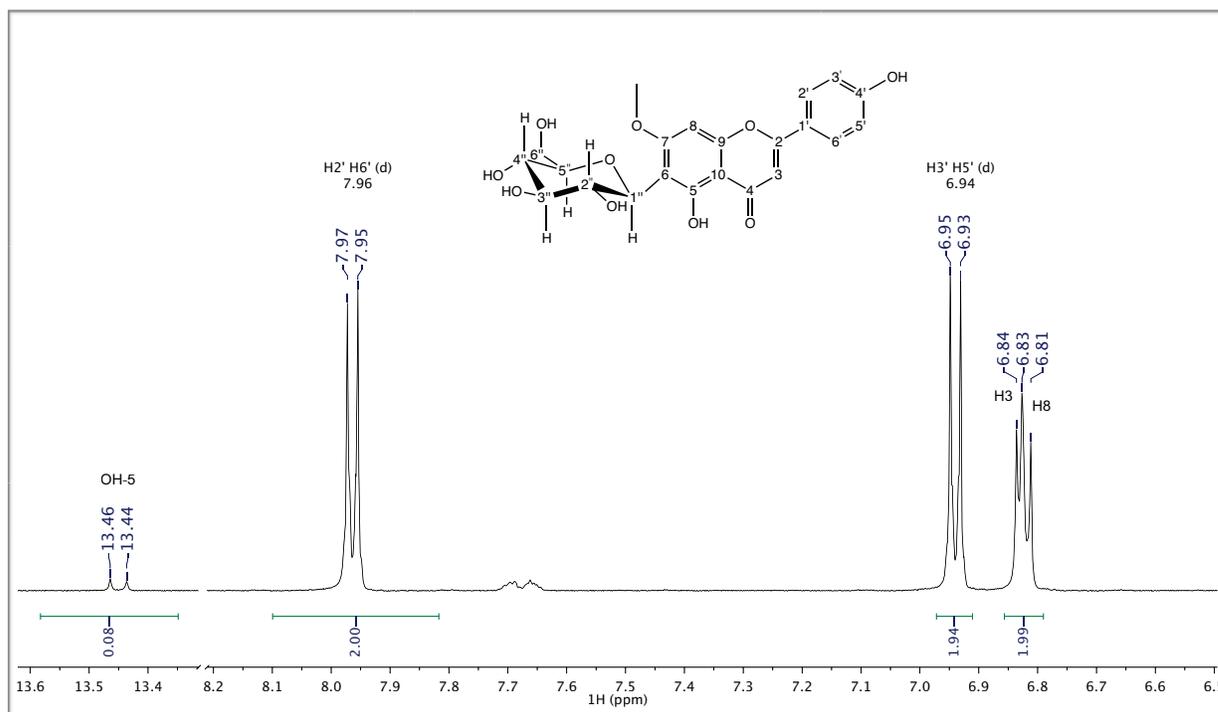
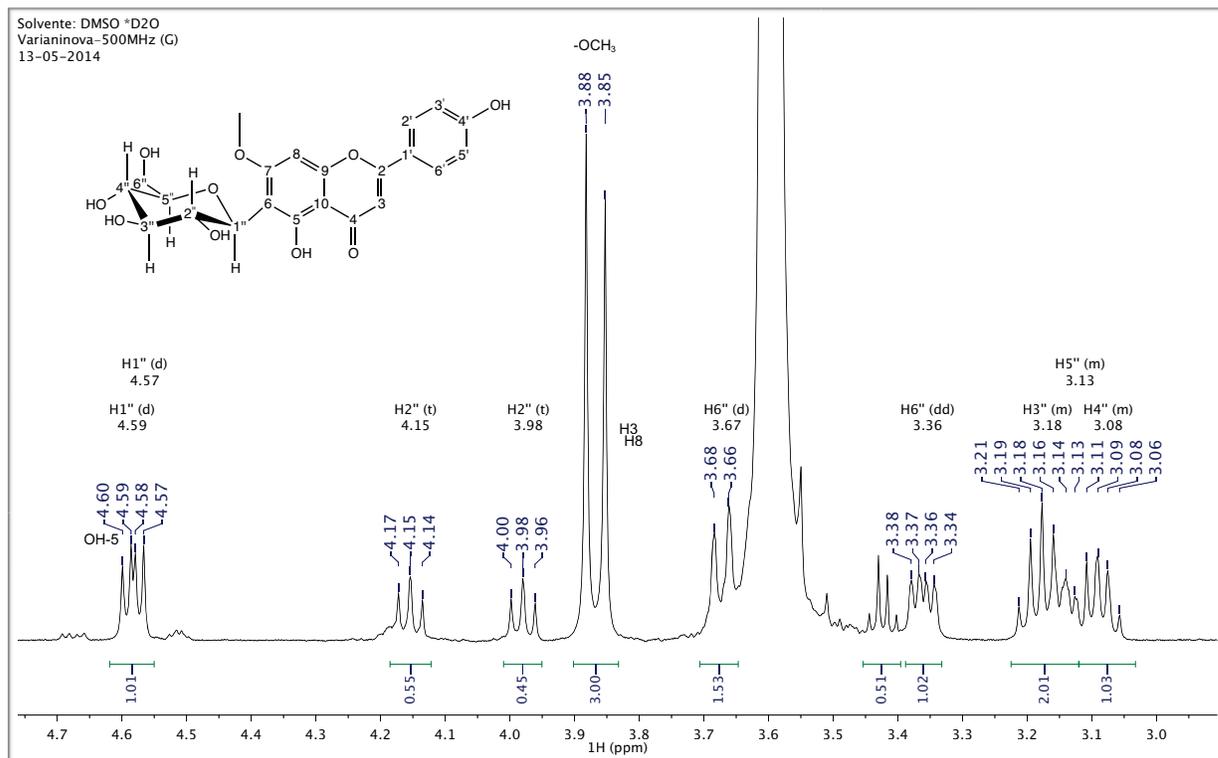
Espectro 37. RMN- 1H Compuesto V14 (400 MHz, $DMSO-d_6$)



Espectro 38. RMN-¹H Compuesto V14 (400 MHz, DMSO-*d*₆)

Las siguientes señales se observan entre 5-3 ppm, región en donde generalmente aparecen las señales de los protones alifáticos de los azúcares. Se aprecian señales múltiples en 4.84 ppm (2H), 4.58 ppm (1H) y 4.42 ppm (1H) que desaparecen con agua deuterada, las cuales pertenecen a los cuatro protones de los grupos hidroxilo del azúcar.

Finalmente, hay una señal simple en 3.90 (3.87) ppm que integra a tres protones, la cual corresponde a un grupo metilo, y por su desplazamiento a campo más bajo del habitual se encuentra unido a un grupo desprotector, por lo tanto, la señal corresponde a un metoxilo unido a un anillo aromático (Anillo A).

Espectro 39. RMN-¹H Compuesto V14 (400 MHz, DMSO-*d*₆ + D₂O).Espectro 40. RMN-¹H Compuesto V14 (400 MHz, DMSO-*d*₆ + D₂O)

A continuación, se presenta la Tabla 19 con la asignación de las señales de la molécula encontrada en la fracción V14.

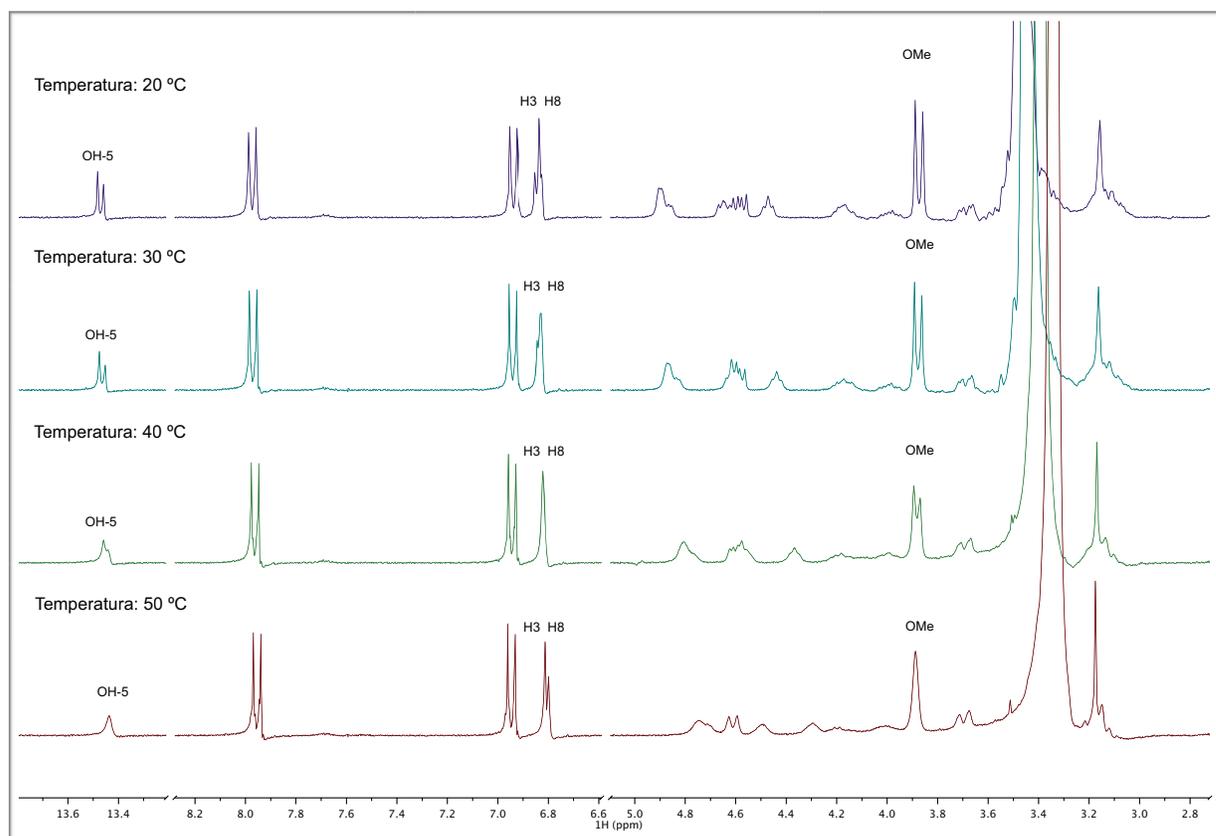
Tabla 19. Asignaciones de las señales del compuesto en la fracción V14 en ^1H -RMN (500 MHz).

Posición	(DMSO- d_6)				(DMSO- d_6 +D $_2$ O)			
	δ (ppm)	m	J (Hz)	I	δ	m	J	I
OH-5	13.49	s	-	1H	13.46	s	-	-
	13.47				13.25			
OH-4'	10.39	s	-	1H	-	-	-	-
H2' H6'	7.82	d	8.8	2H	7.95	d	8.8	2H
H3' H5'	6.93	d	8.8	2H	6.93	d	8.9	2H
H3	6.87	s	-	1H	6.83	s	-	2H
	6.84				6.82			
H8	6.85	s	-	1H	6.82	s	-	-
	6.83				6.80			
H1''	4.60	m	-	1H	4.58 4.57	d	9.9	1H
H2''	4.18	dt	9.2, 5.4 9.3, 5.4	1H	4.14	t	8.7	1H
	3.98				3.98			
H6''	3.69	dd	11.4, 5.7	1H	3.67	d	11.1	1H
	3.44	m	-	1H	3.36	dd	11.4, 6.1	1H
H3''	3.18	m	-	2H	3.17	m	-	2H
H5''	3.14	m	-		3.13	m	-	
H4''	3.08	m	-	1H	3.08	m	-	1H
OCH $_3$	3.90	s	-	3H	3.87	s	-	3H
	3.87				3.84			
OH	4.84	s	-	2H	-	-	-	2H
OH	4.59	s	-	1H	-	-	-	1H
OH	4.42	t	5.6	1H	-	-	-	1H

Debido al comportamiento de la molécula como rotámero, el protón anomérico H1'' presenta dos señales dobles, el protón H2'' presenta dos señales triples (dos tripletes), los protones del grupo metoxilo presentan dos señales simples en 3.89 y 3.86 ppm; los protones del carbono 6'' son diasterotópicos, es decir que no son equivalentes químicamente y por lo que son distinguibles en RMN y cada uno presenta una señal doble en 3.68 y 3.35 ppm, duplicadas nuevamente por la rotación de la molécula. Finalmente, en 3.17-3.14 ppm se encuentra una señal múltiple que integra a 3 protones, estos protones corresponden a H5'', H4'' y H3''.

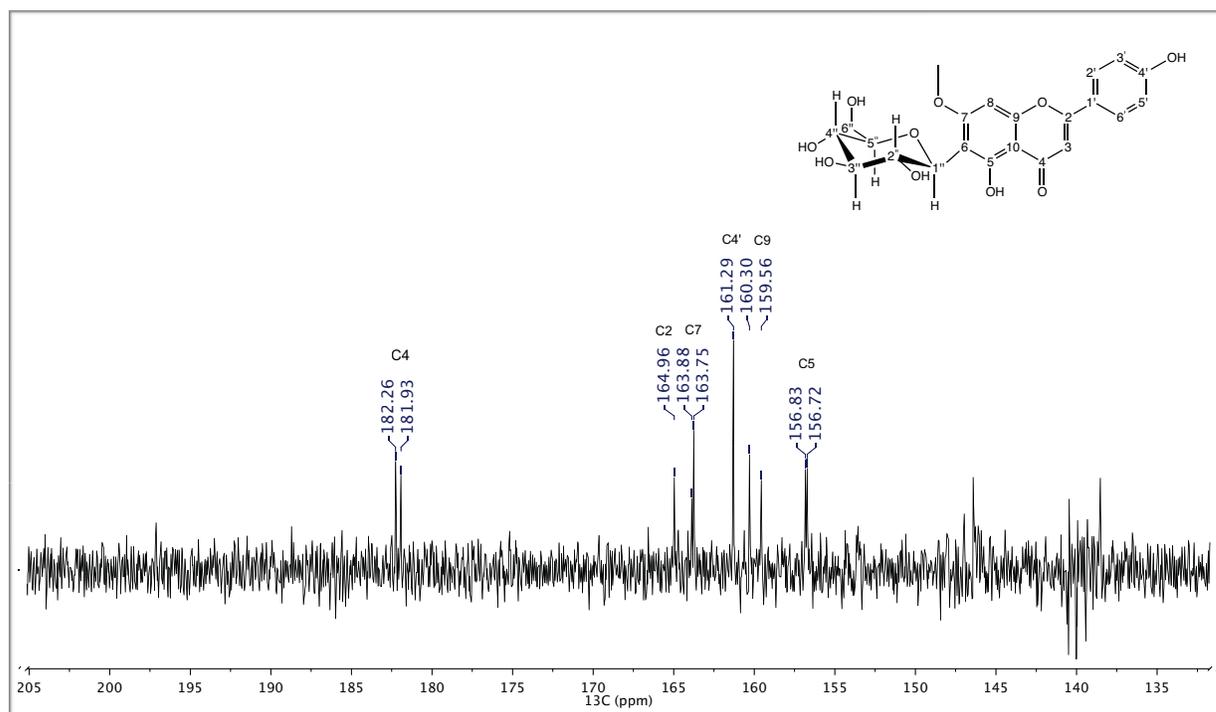
El isomerismo rotacional se define como un fenómeno de rotación en un enlace sencillo en una molécula. Los rotámeros resultan cuando la rotación es obstaculizada por una barrera de energía rotacional⁹¹. En el caso las flavonas C-glucósidas, el impedimento estérico es el efecto dominante. Tales compuestos presentan una duplicación de las señales en los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN a temperatura ambiente, la barrera de energía rotacional provoca que la molécula pueda encontrarse en una u otra conformación, en RMN esto puede ser perceptible ya que los protones de de cada conformación presentan un ambiente químico diferente produciendo así espectros diferentes⁹³.

Para confirmar que el Compuesto V14 (flavocommelitina) presenta el efecto de isomerismo rotacional, se obtuvieron espectros de ¹H-RMN a varias temperaturas: 20, 30, 40 y 50 °C (Espectro 41). En el espectro a 20°C, se observan dos señales simples y afinadas del OH en la posición 5 en 13.49 y 13.47 ppm, y conforme aumenta la temperatura, las señales se van acercando hasta colapsar como una simple y ancha en 13.44 ppm a 50 °C; lo mismo se observa para las señales del grupo metilo OCH₃ en 3.90 y 3.87 ppm, y para los protones de los azúcares (4.8 - 4.0 ppm). Así también, las señales duplicadas para H3 y H8 en 20°C tienen mismo comportamiento al aumentar la temperatura; sin embargo, a 40 °C las señales de H3 y H8 presentan casi el mismo desplazamiento químico, produciendo una aparente señal simple ancha en 6.82 ppm; a 50 °C las señales de H3 y H8 ya se encuentran resueltas en el espectro produciendo cada protón un singulete en 6.81 y 6.80 ppm. Por lo tanto, el aumento de temperatura provoca que la barrera de energía rotacional se supere favoreciendo el libre movimiento del enlace C-C en la molécula de flavocommelitina, y por ende, que la duplicación de las señales desaparezca al tenerse únicamente un ambiente químico para todas las moléculas.

Espectro 41. RMN-¹H Variación de la temperatura en el Compuesto V14 (300 MHz, DMSO-*d*₆)

El espectro de ¹³C contiene un total de 36 señales para una molécula con 22 carbonos, nuevamente el efecto de rotación del enlace C-glucósido provoca que algunas señales se dupliquen (espectro 42 y 43). Se observa esta duplicación de señales es más evidente en los carbonos más cercanos al enlace C-glucosídico (carbonos del anillo A y C)(Tabla 20).

En la región de 185-150 ppm tenemos a los carbonos más desprotegidos (6 carbonos), en donde la señal más desplazada a campo alto 182.2/181.9 ppm corresponde al carbono del carbonilo de la cetona, las siguientes señales corresponden a carbonos aromáticos que además tienen unido un grupo con una gran densidad electrónica como un hidroxilo, metoxilo; para el caso de C2, es un carbono vinílico que tiene unido un anillo aromático que provoca una desprotección y desplazamiento a campo bajo.

Espectro 42. RMN-13C Compuesto V14 (126 MHz, DMSO- d_6)

En la región 130-90 ppm se encuentran los carbonos aromáticos o de dobles enlaces. La simetría en el anillo B de la flavona permite que los carbonos 2', 6' y 3', 5' sean químicamente equivalentes, en el espectro se observan dos señales más intensas en comparación con el resto de las demás y cuya integración es para 2C. En la región de 80-50 ppm, característica de los carbonos que tienen unido un oxígeno mediante un enlace sencillo, se encuentran los carbonos del azúcar y el carbono del grupo metoxilo.

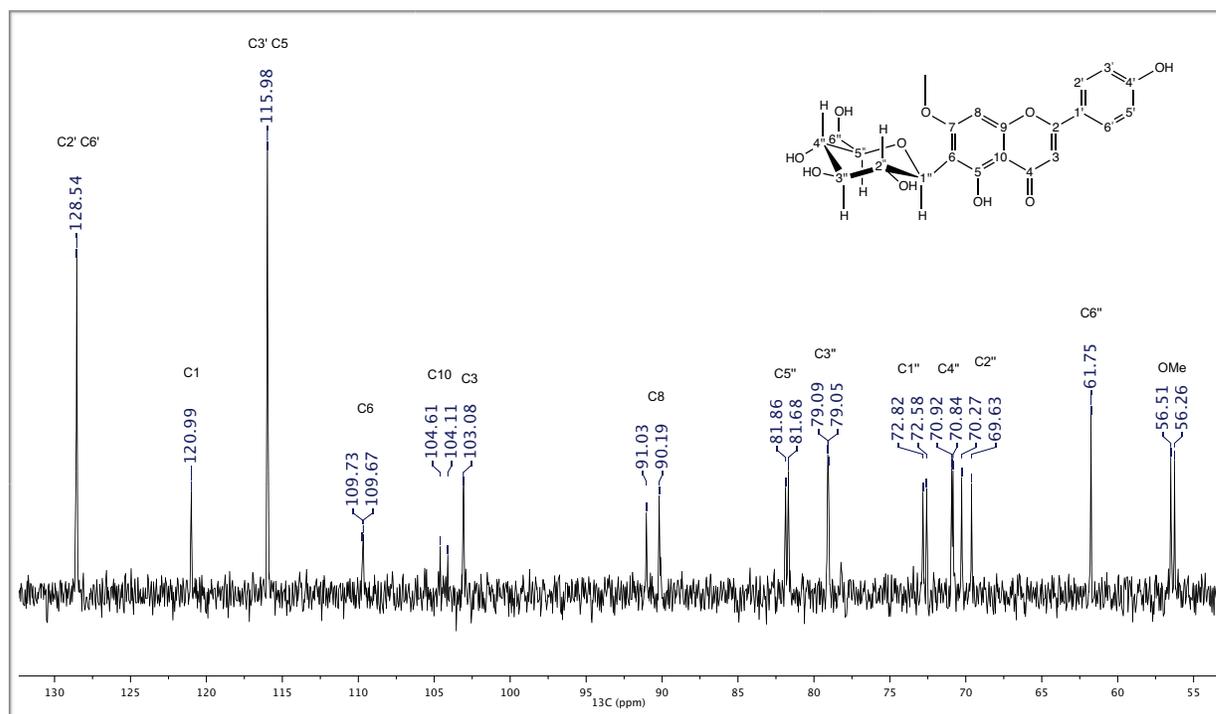
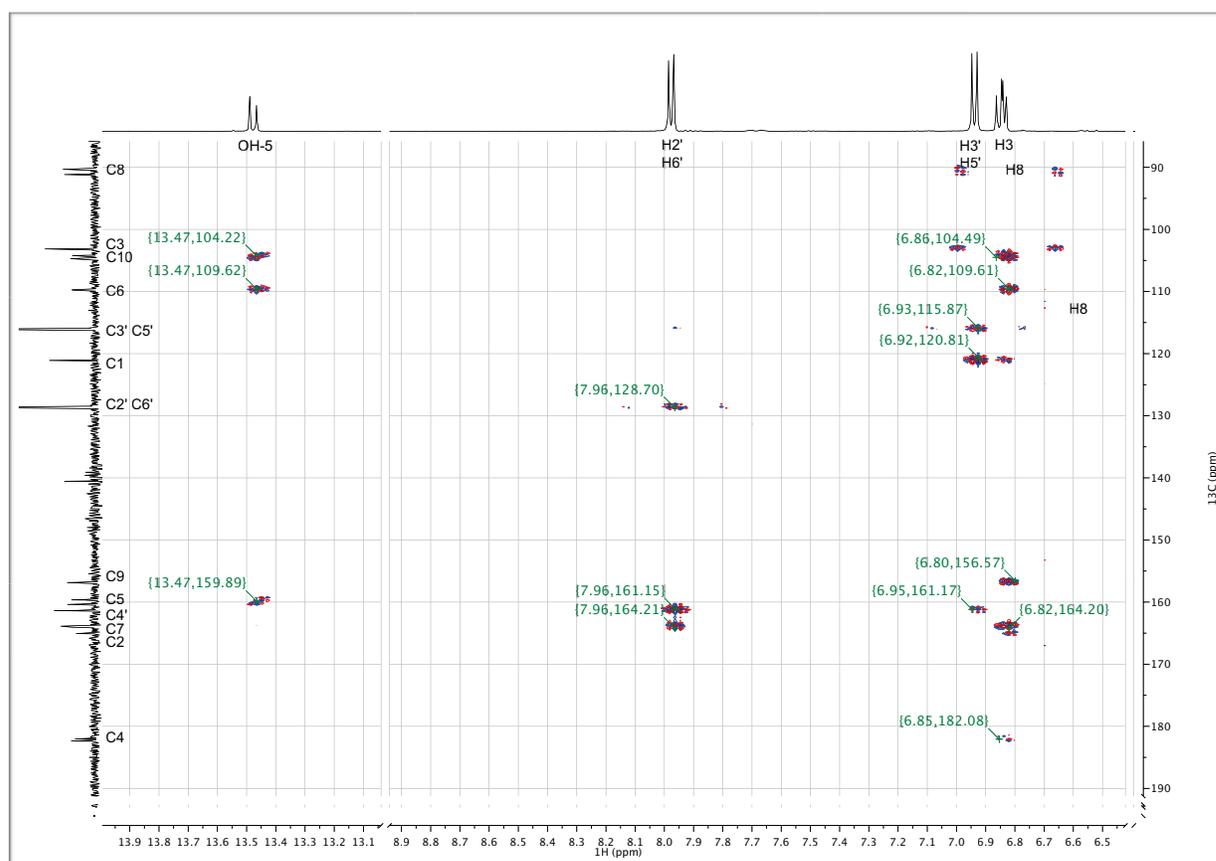
Espectro 43. RMN-13C Compuesto V14 (126 MHz, DMSO-*d*₆)

Tabla 20. Asignaciones de las señales del compuesto en la fracción V14

Posición	δ (ppm)		Posición	δ (ppm)	
2	164.9	-	3'	116.0	-
3	103.1	103.1	4'	161.3	-
4	182.2	181.9	5'	116.0	-
5	156.8	156.7	6'	128.5	-
6	109.7	109.7	1''	72.8	72.6
7	163.9	163.7	2''	70.3	69.6
8	91.0	90.1	3''	79.1	79.0
9	160.3	159.5	4''	70.9	70.8
10	104.6	104.1	5''	81.8	81.7
1'	121.0	-	6''	61.7	-
2'	128.5	-	7-OMe	56.5	56.2

La asignación de las señales en los espectros de protón y carbono se confirma con el experimento HMBC (Espectro 44-46). En este experimento bidimensional heteronuclear se correlacionan los acoplamientos carbono/hidrógeno a 2 y 3 enlaces de distancia. Con ayuda de este experimento se asigna el enlace C-glucosídico al C6 del esqueleto flavonoide, ya que el protón anomérico del azúcar (H1'') presenta acoplamiento a dos enlaces de distancia con C6 y a tres enlaces de distancia con C5 y C7, estos acoplamientos se muestran en las ampliaciones de los Espectros 45 y 46. En la Tabla 21 se resumen los acoplamientos observados en el experimento HMBC.

Espectro 44. RMN-HMBC Compuesto V14 Ampliación (DMSO- d_6)



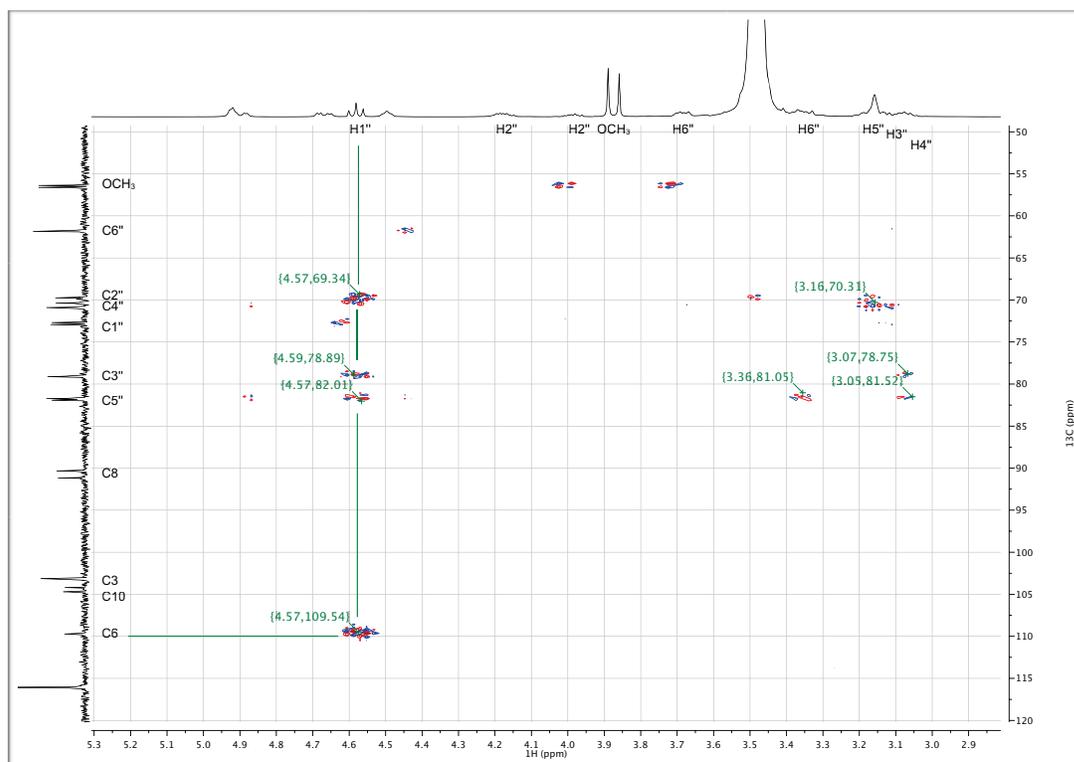
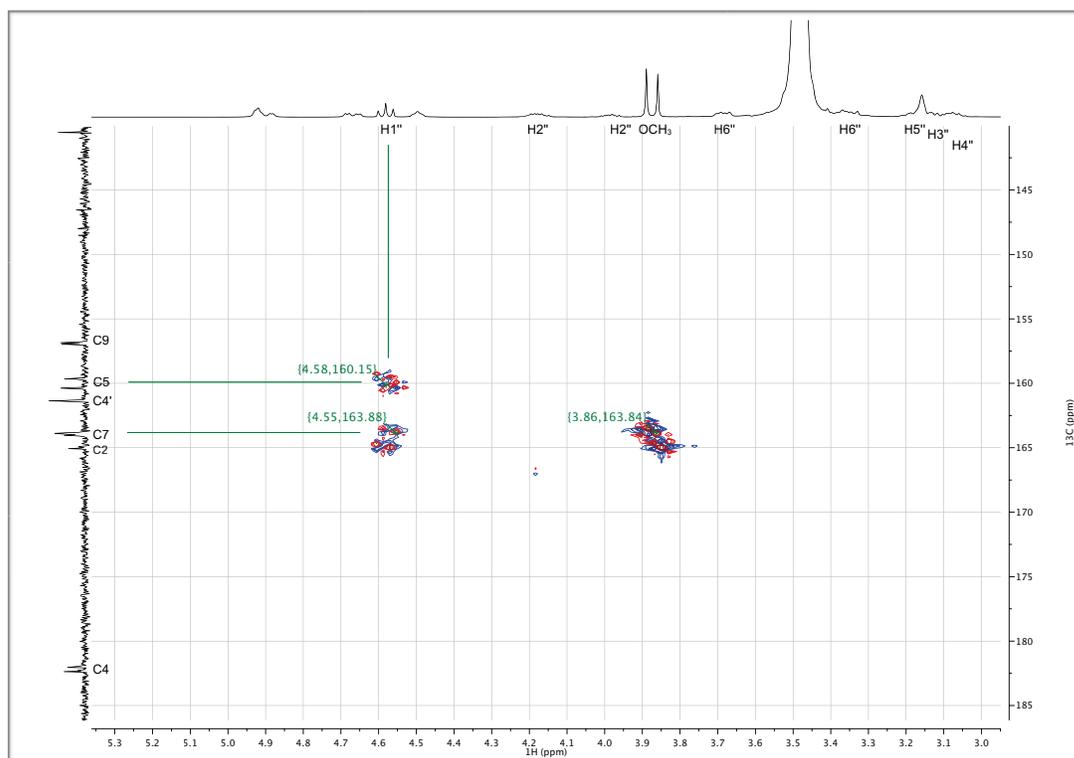
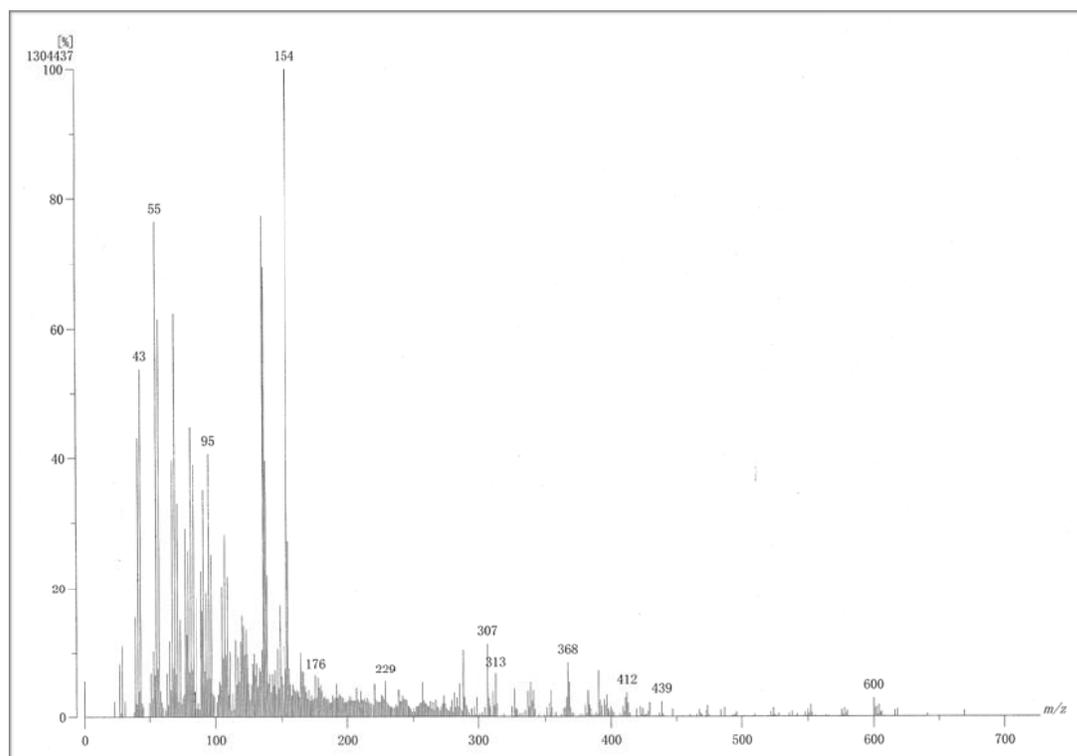
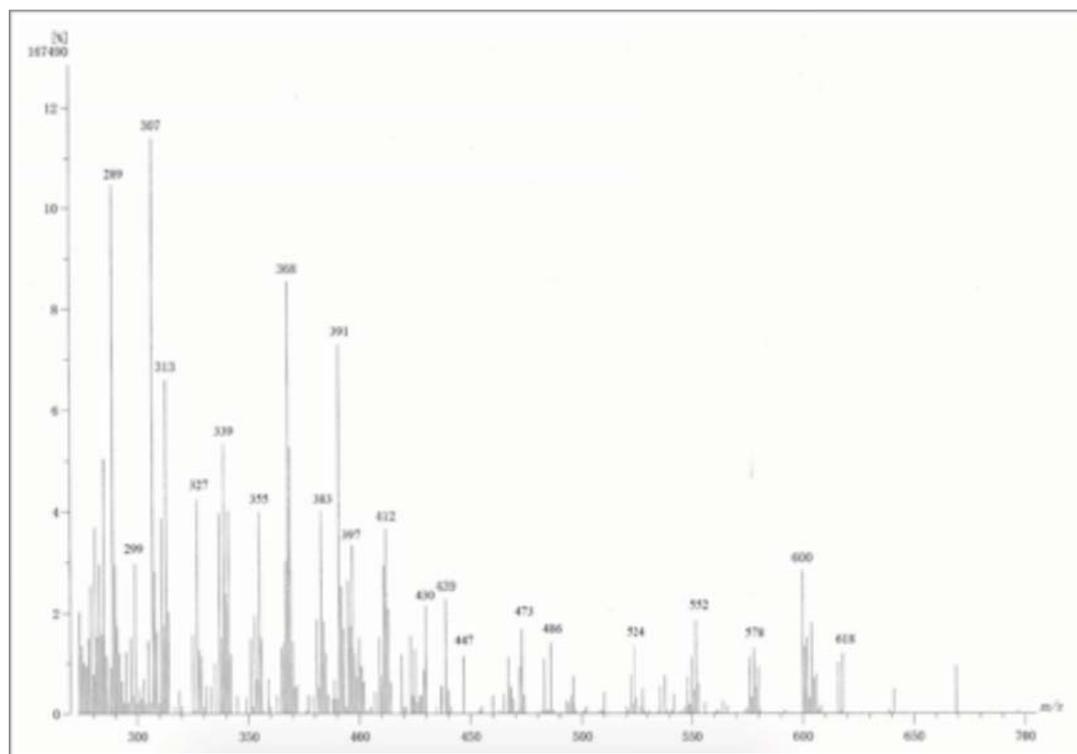
Espectro 45. RMN-HMBC Compuesto V14 Ampliación (DMSO- d_6)Espectro 46. RMN-HMBC Compuesto V14 Ampliación (DMSO- d_6)

Tabla 21. Acoplamientos heteronucleares en el experimento HMBC a 2 y 3 enlaces de distancia.

Posición H	Posición C ($^2J_{H-C}$)	Posición C ($^3J_{H-C}$)	Posición H	Posición C ($^2J_{H-C}$)	Posición C ($^3J_{H-C}$)
3	2, 4	10, 1'	3''	2'', 4''	1''
5	5	6, 10	4''	3'', 5''	-
8	7, 9	6, 10	5''	4'', 6''	-
2'	3'	2, 4', 6'	6''	5''	4''
3'	2', 4'	1', 5'	O-Me	-	7
5'	4', 6'	1', 3'	OH-2''	-	1''
6'	5'	2, 2', 4'	OH-6''	6''	-
1''	6, 2''	5, 7, 5'', 3''			

Con base en el análisis espectroscópico y las referencias consultadas la estructura química de la molécula propuesta como flavocommelitina es un 6-C-glucósido de la 7-O-metilapigenina, o también conocida como swertisina⁹².

En espectrometría de masas se empleó como técnica de análisis FAB en modo positivo (*Fast Atomic Bombard positive mode*). Es posible distinguir el pico en m/z 447 que corresponde al ión molecular protonado $[M+H]^+$, cabe mencionar que los espectros de masas de las flavonas raramente producen un ion molecular observable⁹⁵ (Espectro 47 y 48).

Espectro 47. FAB(+)-EM Compuesto V14 (Matriz: alcohol nitrobenfílico)**Espectro 48.** FAB(+)-EM Compuesto V14 (Ampliación; Matriz: alcohol nitrobenfílico)

En los C-glicósidos, la molécula de azúcar está fuertemente unida al núcleo flavonoide mediante un enlace C-C, dicho enlace produce una fragmentación particular en la unidad de azúcar⁹³ (Figura 31), en donde el enlace C-O del anillo es el más susceptible a romperse por la presencia de un heteroátomo⁹⁴. El pico base del espectro es usualmente el fragmento de la aglicona con un grupo CH₂⁺ remanente de la unidad de azúcar original (pérdida de 150 unidades), el átomo de hidrógeno adicional proviene de un grupo hidroxilo adyacente del azúcar⁴⁴. En el espectro de masas de la flavocommelitina se aprecia la pérdida de 150 unidades del ión [M+H]⁺ en *m/z* 297, el cual posteriormente se protona para dar el ión *m/z* 299.

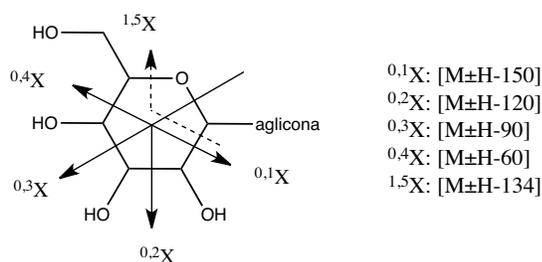


Figura 31. Fragmentación características del anillo de un C-glicósido^{94 y 95}.

La molécula flavocommelitina también se puede fragmentar mediante el mismo proceso observado para otras flavonas agliconas a través de la Ruta I y Ruta II (Figura 32). Sin embargo, los fragmentos generados por estas rupturas no se aprecian con claridad en el espectro de masas⁴⁴.

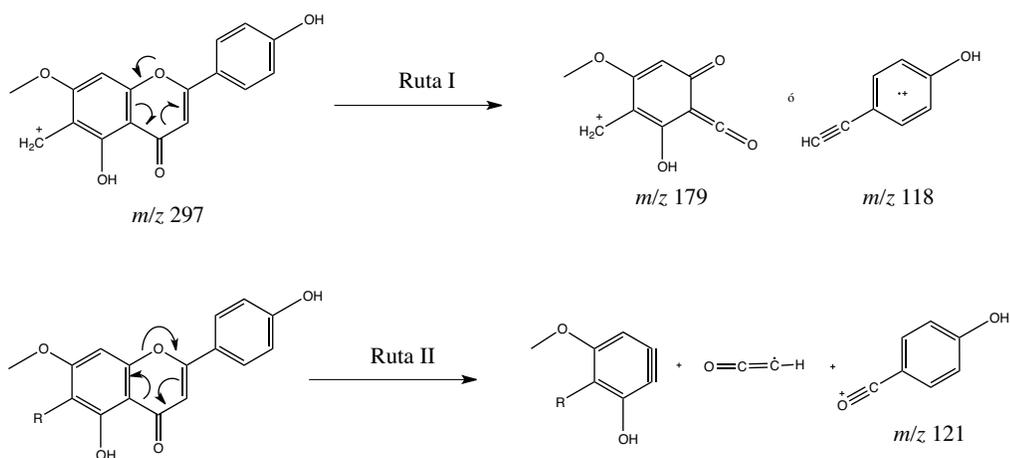


Figura 32 . Principales fragmentaciones de las flavonas agliconas⁴⁴.

Las pérdidas de una, dos y tres moléculas de agua es un proceso de fragmentación típico para sistemas alifáticos polihidroxilados, tal como el que ocurre en las unidades de los C-azúcares⁹⁵. Para la flavocommelitina la posición C7 del núcleo flavonoide tiene un grupo metoxilo, por lo que la pérdida de una molécula de agua sólo corresponderá al hidroxilo de la posición C5 (Figura 33). En la Tabla 22 se muestran los principales picos (m/z) del espectro, la magnitud del fragmento perdido y su procedencia.

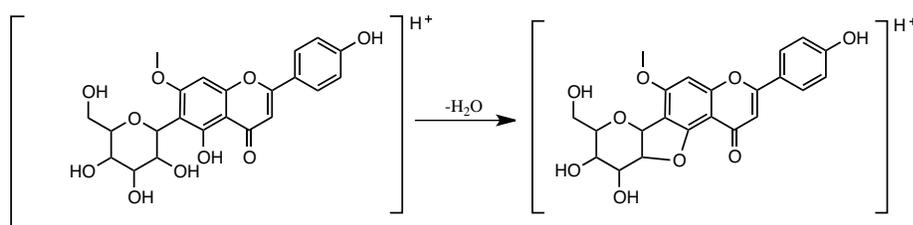


Figura 33. Pérdida de una molécula de agua que involucra al protón en la posición 2' y el hidroxilo en la posición 5 y 7 de una aglicona⁹⁶.

Tabla 22. Asignaciones a las principales fragmentaciones en FAB (+)- EM.

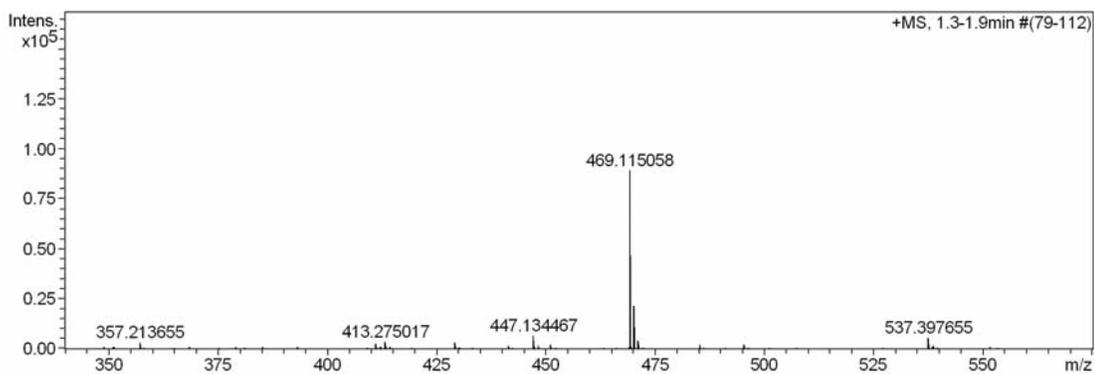
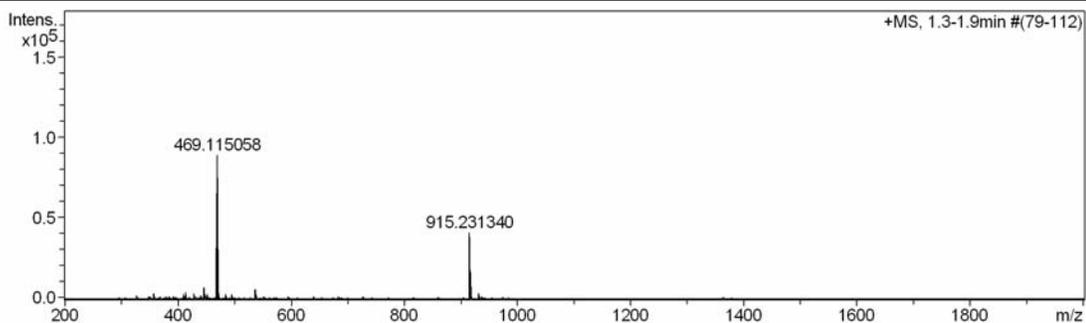
Pico (m/z)	Fragmento	Procedencia
120, 136, 154, 165, 289 y 307	Matriz	-
299	$[M+H]^+ - 148$	$^{0,1}X^+ + 2H$
297	$[M+H]^+ - 150$	$^{0,1}X^+ + H$
313	$[M+H]^+ - 134$	$^{1,5}X^+$
327	$[M+H]^+ - 120$	$^{0,2}X^+$
368	$[M]^+ - 60 - 18$	$^{0,4}X^+ - 2 H_2O$
369	$[M+H]^+ - 60 - 18$	$^{0,4}X^+ - H_2O$
381	$[M+H]^+ - 30 - 36$	$^{2,3}X^+ - 2 H_2O$
383	$[M+H]^+ - 30 - 36 + 2$	$^{2,3}X^+ - 2 H_2O +$
397	$[M]^+ - 31 - 18$	$(-OCH_3) - H_2O$
411	$[M+H]^+ - 18 - 18$	$- 2 H_2O$
412	$[M+H]^+ - 18 - 18 + 1$	$- 2 H_2O + H$
430	$[M+H]^+ - 18 + 1$	$- H_2O + H$
447	$[M+H]^+$	-

También se empleó la técnica ESI (+) para analizar la muestra V14 (Espectro 49). En él se encontró el pico en m/z 447.1, que corresponde a la flavocommelina protonada $[M+H]^+$; otro pico en m/z 469.1 (pico base), el cual corresponde a $[M+Na]^+$; y encontramos otro pico en m/z 915.2, el cual pudiera corresponder a dos moléculas de flavocommelina más un ión sodio $[2M+Na]^+$.

Espectro 48. ESI(+)-MS Compuesto V14 (Disolvente: MeOH)

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Active	Set Capillary	4200 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	3000 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Waste



6.6 Datos espectroscópicos y espectrométricos.

Finalmente, se resumen las propiedades espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos identificados en el estudio del colorante azul extraído de un ejemplar de *Commelina dianthifolia* Delile.

Compuesto CC-2 (Flavocommelina): Sólido amorfo color ámbar; $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 13.43 (s, 0.5H, OH-5), 13.40 (s, 0.5H, OH-5), 8.09 (d, $J=8.5$, 2H, H-2' y H-6'), 7.21 (d, $J=8.5$, 2H, H-3' y H-5'), 6.99 (s, 0.5H, H-3), 6.97 (s, 0.5H, H-3), 6.89 (s, 0.5H, H-8), 6.88 (s, 0.5H, H-8), 5.04 (d, $J=6.9$, 1H, H1''), 4.61 (d, $J=9.4$, 0.5H, H-1''), 4.58 (d, $J=9.4$, 0.5H, H-1''), 4.18 (t, $J=9.1$, 0.5H, H-2''), 3.99 (t, $J=9.2$, 0.5H, H-2''), 3.90 (s, 1.5H, OCH_3), 3.87 (s, 1.5H, OCH_3), 3.70 (dd, $J=10.8$, 2.8, 1H, H-6''), 3.5-3.3 (m, 5H), 3.3 (m, 1H, H6''), 3.2 (m, 1H, H3''), 3.1-3.0 (m, 2H, H5'' y H4'').

Compuesto CC-8.1 (Awobanina): Sólido amorfo color magenta; $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD} + \text{TFA}$): δ 8.89 (s, 1H, H-4), 7.77 (s, 2H, H-2' y H-6'), 7.35 (d, $J=15.9$ Hz, 1H, H- β), 7.28 (d, $J=8.6$ Hz, 2H, H-2'' y H-6''), 6.97 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, H-6), 6.89 (d, $J=1.2$ Hz, 1H, H-8), 6.76 (d, $J=8.6$ Hz, 2H, H-3'' y H-5''), 6.23 (d, $J=15.9$ Hz, 1H, H- α), 5.45 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, H-1B), 5.18 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, H-1A), 4.52 (dd, $J=11.8$, 2.9 Hz, 1H, H-6aA), 4.50 (dd, $J=13.1$, 7.8 Hz, 1H, H-6bB), 3.98 (dd, $J=13.1$, 7.4 Hz, 1H, H-6aA), 3.96 (ddd, $J=11.5$, 8, 3 Hz, 1H, H-5A), 3.79 (dd, $J=8$, 9.5 Hz, 1H, H-2A), 3.77 (dd, $J=8$, 9.5 Hz, 1H, H-2B), 3.73 (dd, $J=5.3$, 11.3 Hz, 1H, H-6bB), 3.64 (m, H-3A), 3.60 (t, $J=9.5$ Hz, 1H, H-5B), 3.59 (t, $J=9.5$ Hz, 1H, H-3B), 3.53 (m, H-4A), 3.45 (m, H-4B); $^{13}\text{C-RMN}$ (126 MHz, CD_3OD): δ 169.2 (C-7), 169.1 (C-9''), 163.9 (C-2), 161.3 (C-4''), 156.8 (C-9), 156.5 (C-5), 147.7 (C-3', C-5'), 146.9 (C-7''), 146.2 (C-3), 145.8 (C-4'), 133.9 (C-4), 131.4 (C-2'', C-6''), 126.8 (C-1''), 119.8 (C-1'), 116.7 (C-3'', C-5''), 114.8 (C-8''), 113.0 (C-10), 112.9 (C-2', C-6'), 106.0 (C-6), 102.9 (C-1B), 102.2 (C-1A), 97.2 (C-8), 78.11 (C-3A), 77.7 (C-3B), 76.0 (C-5B), 75.5 (C-5A), 74.8 (C-2A), 74.3 (C-2B), 72.3 (C-4A), 71.0 (C-4B), 65.1 (C-6B), 64.6 (C-6A); DEPT 135: δ 147.7, 133.9, 131.4, 116.7, 114.8, 112.9, 106.0, 102.9, 102.2, 97.2, 78.11, 77.7, 75.5, 74.8, 74.3, 72.3, 71.0; DEPT 90 δ 147.7, 133.9, 131.4, 116.7, 114.8, 112.9, 106.0, 102.9, 102.2, 97.2, 78.11, 77.7, 75.5, 74.8, 74.3, 72.3, 71.0, 65.1 (negativo), 64.6 (negativo); ESI(+)-EM m/z : 773.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Compuesto CC-8.2 (Malonil awobanina): Sólido amorfo color magenta; $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD} + \text{TFA}$): δ 8.86 (s, 1H, H-4), 7.76 (s, 2H, H-2' y H-6'), 7.37 (d, $J=15.9$ Hz, 1H, H- β), 7.22 (d, $J=8.5$ Hz, 2H, H-2'' y H-6''), 6.99 (d, $J=2.1$ Hz, 1H, H-6), 6.91 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, H-8), 6.71 (d, $J=8.7$ Hz, 2H, H-3'' y H-5''), 6.25 (d, $J=15.9$ Hz, 1H, H- α), 5.45 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, H-1B), 5.19 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, H-1A), 4.48 (dd, $J=11.3$, 4.6 Hz, 1H, H-6aA), 4.47 (dd, $J=11.5$, 7.5 Hz, 1H, H-6bA), 4.53 (dd, $J=11$, 2 Hz, 1H, H-6aB), 4.21 (dd, $J=5.7$, 11.2 Hz, 1H, H-6bB), 3.96 (ddd, $J=11$, 8, 3 Hz, 1H, H-5A), 3.79 (m, H-2A), 3.77 (m, H-2B), 3.62 (t, $J=9.0$ Hz, H-3A), 3.79 (m, H-5B), 3.56 (t, $J=9.1$ Hz, 1H, H-3B), 3.49 (t, $J=9.3$ Hz, H-4A), 3.45 (m, H-4B); ESI(+)-EM m/z : 859.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Compuesto CC-8.3 (Éster de malonil awobanina): Sólido amorfo color magenta; $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD} + \text{TFA}$): δ 8.85 (s, 1H, H-4), 7.76 (s, 2H, H-2' y H-6'), 7.37 (d, $J=15.9$ Hz, 1H, H- β), 7.22 (d, $J=8.6$ Hz, 2H, H-2'' y H-6''), 6.99 (d, $J=2.1$ Hz, 1H, H-6), 6.91 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, H-8), 6.71 (d, $J=8.7$ Hz, 2H, H-3'' y H-5''), 6.26 (d, $J=15.9$ Hz, 1H, H- α), 5.42 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, H-1A), 5.19 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, H-1B), 4.53 (dd, $J=12, 4$ Hz, 1H, H-6aA), 4.24 (dd, $J=11.4, 5.6$ Hz, 1H, H-6bA), 4.51 (dd, $J=11.3, 3$ Hz, 1H, H-6aB), 4.47 (dd, $J=12.8, 8.8$ Hz, 1H, H-6bB), 3.96 (m, 1H, H-5A), 3.82 (m, H-2A), 3.80 (m, H-2B), 3.64 (m, H-3A), 3.56 (t, $J=9.1$ Hz, 1H, H-3B), 3.53 (m, H-4A), 3.50 (m, H-4B); ESI(+)-EM m/z : 873.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

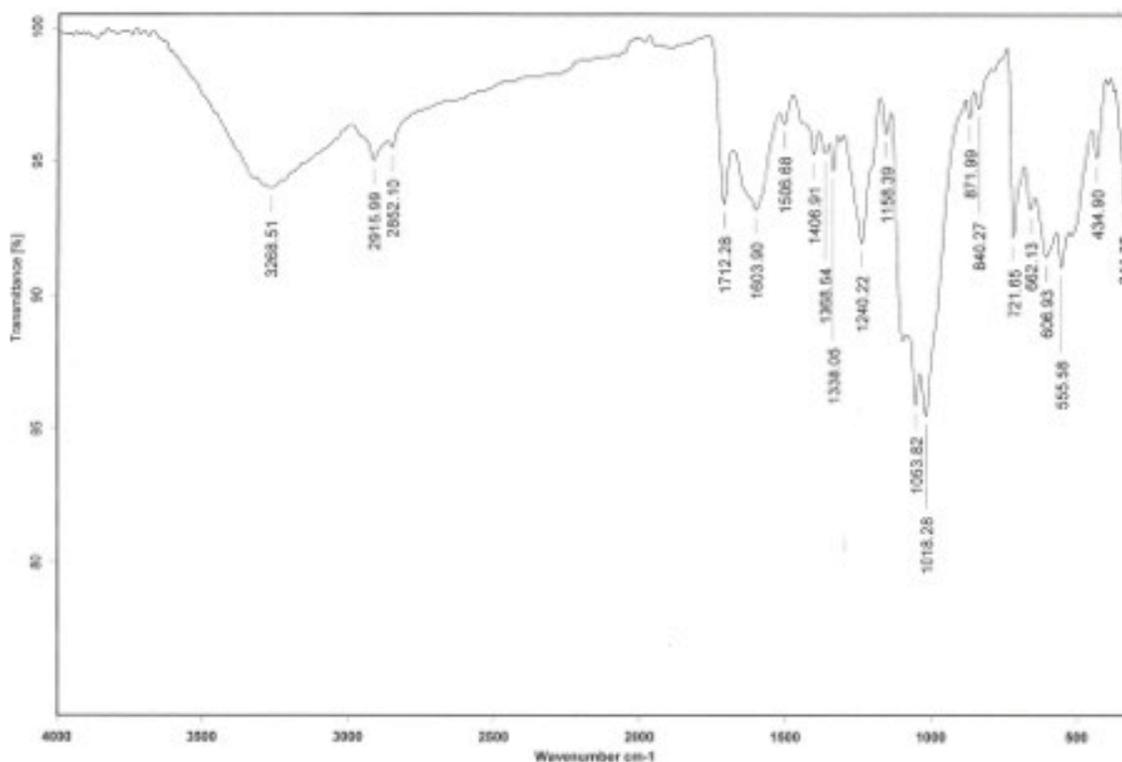
Compuesto CA-A1 (Awobanina): $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD} + \text{TFA}$) δ 8.90 (s, 1H, H-4), 7.77 (s, 2H, H-2' y H-6'), 7.38 (d, $J=15.9$ Hz, 1H, H- β), 7.30 (d, $J=8.5$ Hz, 2H, H-2' y H-6'), 6.90 (d, $J=1.7$ Hz, 1H, H-8), 6.76 (d, $J=8.5$ Hz, 2H, H-3'' y H-5''), 6.24 (d, $J=15.9$ Hz, 1H, H- α), 5.41 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, H-1B), 5.14 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, H-1A), 4.48 (m, 1H, H-6aA), 4.47 (m, 1H, H-6 β A), 3.98 (dd, $J=3, 1$ Hz, 1H, H-6 β B), 3.95 (ddd, $J=3.3, 3.0, 1.7$ Hz, 1H, H-5A), 3.78 (dd, $J=9.5, 8$ Hz, 1H, H-2A), 3.74 (dd, $J=9.5, 8$ Hz, 1H, H-2B), 3.71 (m, 1H, H-6bB), 3.62 (t, $J=7.1$ Hz, 1H, H-3A), 3.57 (ddd, $J=9.5, 7.0, 3.5$ Hz, 1H, H-5B), 3.55 (t, $J=6.4$ Hz, 1H, H-3B), 3.53 (t, $J=9.5$ Hz, 1H, H-4A), 3.42 (t, $J=9.5$ Hz, 1H, H-4B); ESI(+)-EM m/z 773.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Compuesto V14 (Flavocommelitina): Sólido amorfo color amarillo; $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 13.50 (s, 0.5H, OH-5), 13.49 (s, 0.5H, OH-5), 7.98 (d, $J=8.9$ Hz, 2H, H-2' y H-6'), 6.93 (d, $J=8.9$ Hz, 2H, H-3' y H-5'), 6.87 (s, 0.5H, H-3), 6.86 (s, 0.5H, H-3), 6.85 (s, 0.5H, H-8), 6.84 (s, 0.5H, H-8), 4.85 (s, 1H, OH), 4.60 (d, $J=9.4$ Hz, 0.5H, H-1''), 4.57 (d, $J=9.5$ Hz, 0.5H, H-1''), 4.43 (s, 1H, OH), 4.18 (t, $J=9.3$ Hz, 0.5H, H-2''), 3.99 (t, $J=8.6$ Hz, 0.5H, H-2''), 3.90 (s, 1.5H, OCH_3), 3.87 (s, 1.5H, OCH_3), 3.69 (d, $J=12.2$ Hz, 1H, H-6''); $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6 + \text{D}_2\text{O}$) δ 7.97 (d, $J=9.0$ Hz, 2H, H-2' y H-6'), 6.94 (d, $J=8.9$ Hz, 2H, H-3' y H-5'), 6.84 (s, 1H, H-3), 6.83 (s, 0.5H, H-8), 6.83 (s, 0.5H, H-8), 4.59 (d, $J=9.9$ Hz, 0.5H, H-1''), 4.57 (d, $J=9.8$ Hz, 0.5H, H-1''), 4.15 (t, $J=9.9$ Hz, 0.5H, H-2''), 3.98 (t, $J=9.6$ Hz, 0.5H, H-2''), 3.89 (s, 1.5H, OCH_3), 3.86 (s, 1.5H, OCH_3), 3.68 (d, $J=10.5$ Hz, 1H, H-6''), 3.35 (d, $J=11.9, 6.7$ Hz, 1H, H-6''), 3.17 (m, 3H, H-3'', H-4'' y H-5''); $^{13}\text{C-RMN}$ (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 182.2/181.9(C-4), 164.9 (C-2), 163.9/163.7 (C-7), 161.3 (C-4'), 160.3/159.5 (C-9), 156.8/156.7 (C-5), 128.7 (C-2', C-6'), 121.1 (C-1'), 116.1 (C-3', C-5'), 109.8/109.7 (C-6), 104.6/104.1 (C-10), 103.1 (C-3), 91.0/90.1 (C-8), 81.8/81.7 (C-5''), 79.1/79.0 (C-3''), 72.8/72.6 (C-1''), 70.9/70.8 (C-4''), 70.3/69.6 (C-2''), 61.7 (C-6''), 56.6/56.4 (OCH_3); HMBC : H-3 \rightarrow C-2, C-4, C-10 y C-1'; OH-5 \rightarrow C-5, C-6 y C-10; H-8 \rightarrow C-7, C-9, C-6 y C-10; H-2' \rightarrow C-3', C-2, C-4' y C-6'; H-3' \rightarrow C-2', C-4', C-1' y C-5'; H-5' \rightarrow C-4', C-6', C-1' y C-3'; H-6' \rightarrow C-5', C-2, C-2' y C-4'; H-1'' \rightarrow C-6, C-2'', C-5, C-7, C-5'' y C-3''; H-3'' \rightarrow C-2'', C-4'' y C-1''; H-4'' \rightarrow C-3'' y C-5''; H-5'' \rightarrow C-4'' y C-6''; H-6'' \rightarrow C-5'' y C-4''; $\text{OCH}_3 \rightarrow$ C-7; OH-2'' \rightarrow C-1''; OH-6'' \rightarrow C-6''; FAB(+) m/z : 447 $[\text{M}+\text{H}]^+$; ESI(+)-EM m/z : 447 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 469 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; UV-vis λ (nm) 214, 272 y 334.

6.7 Fibra teñida

Con el objetivo de observar el comportamiento del colorante sobre un sustrato celulósico, se realizó el teñido de ésta sobre fibras de algodón mordentado. Como resultado se observó que el color azul permaneció estable. El espectro de infrarrojo (Espectro 50) permitió ver las bandas características de la fibra de algodón: grupos hidroxilo e hidrocarburos saturados; la banda característica del alumbre, $KAl(SO_4)_2$, en 1713 cm^{-1} ; y las bandas del colorante (compuestos flavonoides): hidroxilo (3268 cm^{-1}), aromático (1603 , 1507 , 1369 , 1338 , 722 y 607 cm^{-1}), y éter unido a un grupo aromático (1240 cm^{-1}).

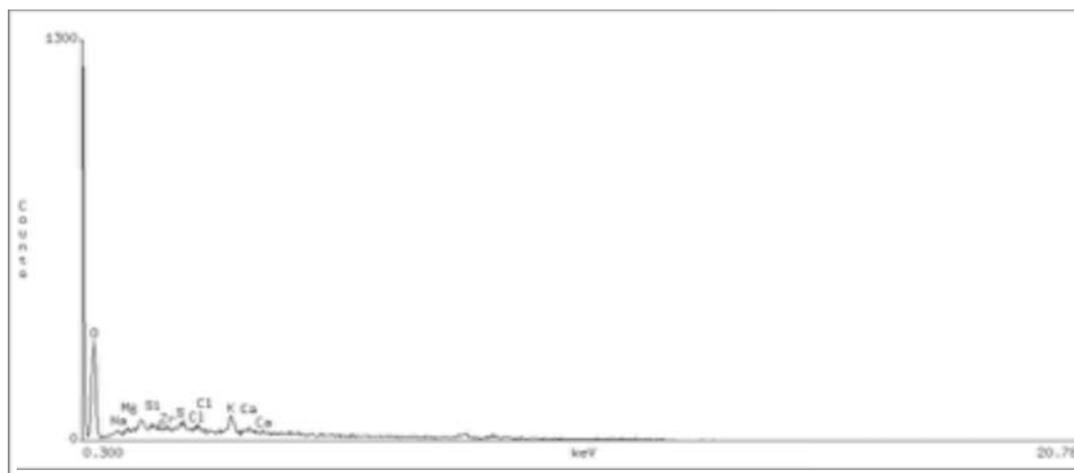
Espectro 50. FT-IR Fibra de algodón mordentada y teñida (Técnica: ATR)



El análisis por detección de rayos-X característicos, reveló la presencia de los elementos: potasio, magnesio, calcio, aluminio, azufre, cloro y sodio (Imágenes 50 y 51; Espectros 51 y 52). De estos elementos, el Al, K y S pertenecen al alumbre, mientras que el Na y Ca pueden estar formado sales con el cloro y finalmente se tiene la presencia del magnesio perteneciente al colorante.

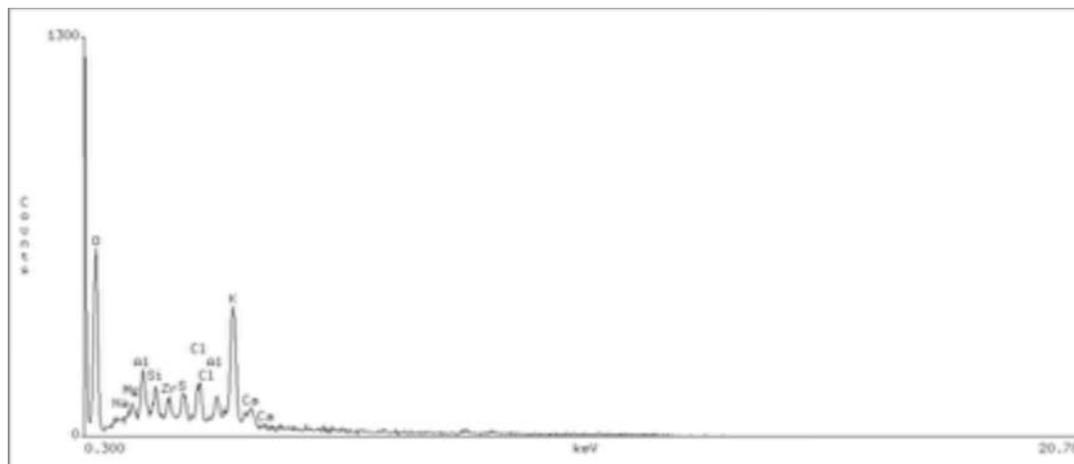
Espectro 51. SEM-EDS Fibra de algodón mordentada y teñida

Element	k-ratio (calc.)	ZPF	Atom X	Element	Wt X	Err. (1-Sigma)
O -K	0.3506	2.447	92.85	O	85.81	+/- 2.33
Ca-K	0.0221	1.186	1.13	Ca	2.62	+/- 0.26
P -K	0.0003	1.478	0.02	P	0.04	+/- 0.18
Na-K	0.0035	4.656	1.24	Na	1.65	+/- 0.48
Mg-K	0.0019	3.034	0.40	Mg	0.56	+/- 0.30
Si-K	0.0014	1.695	0.15	Si	0.24	+/- 0.22
K -K	0.0552	1.174	2.87	K	6.48	+/- 0.32
Zr-K	0.0000	1.534	0.00	Zr	0.00	+/- 0.00
S -K	0.0099	1.283	0.68	S	1.26	+/- 0.20
Cl-K	0.0106	1.263	0.65	Cl	1.33	+/- 0.22
Total			100.00		100.00	



Espectro 52. SEM-EDS Fibra de algodón mordentada y teñida (Zona puntual).

Element	k-ratio (calc.)	ZPF	Atom X	Element	Wt X	Err. (1-Sigma)
O -K	0.2325	3.441	90.30	O	80.01	+/- 1.61
Ca-K	0.0140	1.239	0.78	Ca	1.74	+/- 0.15
P -K	0.0000	1.381	0.00	P	0.00	+/- 0.00
Na-K	0.0000	4.250	0.00	Na	0.00	+/- 0.00
Mg-K	0.0031	2.905	0.68	Mg	0.91	+/- 0.27
Si-K	0.0000	1.582	0.00	Si	0.00	+/- 0.00
K -K	0.1276	1.157	6.82	K	14.77	+/- 0.26
Zr-K	0.0000	1.481	0.00	Zr	0.00	+/- 0.00
S -K	0.0010	1.254	0.07	S	0.13	+/- 0.12
Cl-K	0.0149	1.218	0.93	Cl	1.82	+/- 0.15
Al-K	0.0029	2.176	0.42	Al	0.62	+/- 0.20
Total			100.00		100.00	



6.8 Comentarios para el estudio del colorante en patrimonio cultural

Como se ha visto en este estudio, el colorante azul de *Commelina dianthifolia* Delile, está conformado por compuestos de tipo flavonoide y cationes metálicos, los cuales en conjunto forman un complejo de coordinación conocido como metalo-antocianina; las interacciones entre las moléculas de este complejo constituyen un mecanismo de estabilización que le confiere al colorante un azul brillante.

Sin embargo, el colorante resulta ser muy susceptible a la degradación, principalmente en contacto con la luz y la humedad. Una explicación a este fácil proceso de degradación del color puede ser justificado con base en su composición química. Al estar compuesto principalmente por antocianinas, la presencia de moléculas de agua favorece una reacción de hidratación, la cual producirá posteriormente la descomposición de las antocianinas para producir, en el caso más simple, aldehídos y ácidos fenólicos. Es por esta razón que, muchos textiles y bocetos que fueron teñidos o pintados con este colorante, el color azul original se ha degradado hasta un color verdusco o grisáceo. Por lo tanto, es recomendable que aquellos objetos que contengan a este colorante sean preservados en condiciones de poca o nula humedad y alejados de la luz. No hay que olvidar que el colorante está conformado por un componente colorido amarillo, el cual contiene esencialmente flavonas, las cuales son químicamente más estables a degradarse que las antocianinas, y por ello son más resistentes ante los daños ocasionados por el medio ambiente y el tiempo. No es de sorprenderse que, aquellos objetos en los cuales fue utilizado el colorante *matlalli* pudiesen mostrar una tonalidad amarillenta en donde originalmente se había aplicado un color azul.

Debido a la gran solubilidad del colorante en agua, es probable que su empleo haya sido principalmente en sustratos celulósicos (como fibras de algodón o papel), los cuales tienen una gran afinidad por compuestos muy polares; se ha observado que en láminas de papel y en condiciones de escasa humedad, el colorante logra una muy buena conservación. El uso del colorante para teñir prendas de vestir llega a verse limitado, ya que el color es fácilmente lavable y se decolora al estar expuesto a la luz; es por ello que, posiblemente las prendas teñidas con este colorante hayan sido elaboradas para ser exhibidas como ornato.

La identificación del colorante *matlalli* en objetos de patrimonio cultural se ve acotado a un análisis invasivo (toma de una muestra), a la elección de un método adecuado de extracción del colorante de su soporte y el empleo de técnicas analíticas que aporten resultados satisfactorios. Debido al carácter orgánico del colorante, la técnica analítica más factible para su análisis es la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia con detectores de UV-vis acoplado a un Espectrómetro de Masas por *Electrospray* (HPLC/UV-vis - EM/ESI); sin olvidar que es necesario contar con una cantidad suficiente de muestra para realizar los análisis.

Como perspectivas a futuro en el estudio del colorante azul *matlalli*, se recomienda complementar el trabajo con la identificación y caracterización de los compuestos restantes en el colorante, los cuales en su mayoría pudieran ser moléculas de azúcares y flavonoides (antocianinas y flavonas). También, se propone realizar este mismo estudio en otras especies de *commelina* para hacer una comparación entre los perfiles químicos de estas especies y concluir si hay o no diferencia entre los compuestos químicos de cada especie.

Además, se sugiere estudiar el colorante sobre diversos soportes (fibras vegetales, fibras animales, sales minerales) o con la incorporación de materiales aglutinantes (aceites, huevo, lacas, resinas, etc.) con el fin de registrar los cambios producidos en el colorante por la presencia de otros materiales frente a un proceso de envejecimiento controlado. Estos cambios pueden comprender: una modificación en el color, la degradación del colorante, y/o la estabilidad física de la muestra.

La información que se recabe en estos estudios propuestos conformará los patrones de referencia que permitan, en primer plano, identificar al colorante y su fuente natural; y en un segundo plano, sugerir las posibles condiciones ambientales o artificiales a las cuales fue sometida la muestra a través de la comparación de los compuestos presentes en la muestra con los compuestos patrón.

7 Conclusiones

En este proyecto se llevó a cabo el estudio del colorante azul extraído de las flores de un ejemplar de *Commelina dianthifolia* Delile. El colorante era conocido como *matlalli* en el México antiguo y era empleado para teñir fibras y dar color a diversos objetos.

En el extracto crudo se encontraron dos componentes colorantes principales: uno color azul ultramar (el colorante azul “purificado”) y otro color amarillo brillante. El colorante azul “purificado” presenta las mismas propiedades fisicoquímicas que el colorante azul encontrado en especies de *Commelina communis*, el cual es un complejo de coordinación entre moléculas orgánicas y cationes metálicos (metalo-antocianina), el cual fue nombrado como commelinina.

Se observó que el colorante azul tiene un comportamiento “inusual” en comparación con otros colorantes de naturaleza flavonoide. Se encontró que éste es muy susceptible a la degradación en presencia de humedad, luz y calor; y que es altamente soluble en agua pero insoluble en otros disolventes orgánicos. En disolución acuosa, el colorante cambia de coloración con respecto al pH: a rojo en disoluciones muy ácidas (el colorante permanece estable) y a verde en disoluciones básicas (el colorante se degrada hasta volverse color marrón).

Para identificar los constituyentes de esta metalo-antocianina fue necesario realizar la disociación del complejo de coordinación. El colorante azul está compuesto por antocianinas, flavonas, azúcares y cationes metálicos. La antocianina que forma a este complejo es la malonilawobanina; la flavona que participa como co-pigmento es la flavocommelitina; y el catión metálico es Mg^{2+} ; en conjunto, estas especies forman el complejo de commelinina.

Además de las moléculas que integran a la metalo-antocianina, fue posible la identificación de otros compuestos presentes en el extracto pero que no participan en el complejo de coordinación. Se encontraron dos antocianinas y una flavona: la awobanina, el éster metílico de la malonilawobanina y la flavocommelina. Así también, se observó que el extracto crudo del colorante tiene una importante proporción de azúcares.

Finalmente, los resultados obtenidos a través de los diversos análisis realizados en este estudio permitieron conocer que el colorante de *Commelina dianthifolia* Delile está conformado por compuestos de tipo flavonoide, y que sólo algunos de estos compuestos llegan a formar un complejo de coordinación de commelinina. La alta susceptibilidad del colorante azul a degradarse se atribuye principalmente a la hidratación de las antocianinas, las cuales posteriormente sufren una descomposición. Por tanto, para preservar los objetos culturales que contengan a este colorante, es recomendable mantenerlos en condiciones de baja humedad y no ponerlos en contacto con sustancias ácidas o básicas. Se propone que los compuestos identificados en el presente estudio (la flavocommelina, la flavocommelina, la awobanina, la malonilawobanina y el éster metílico de la malonilawobanina) sean empleados como una referencia para el reconocimiento de la especie *Commelina dianthifolia* Delile y del colorante azul *matlalli* en bienes del patrimonio cultural.

Referencias

- ¹ Bonfil, R., "La investigación previa a la elaboración del proyecto de restauración", *6º Coloquio del Seminario de Estudio del Patrimonio Artístico. Conservación, Restauración y Defensa: Investigación y Docencia*, Instituto de Investigaciones Estéticas, UNAM, Mexico, (1999), pp. 27-35.
- ² Gómez, M., "Técnicas auxiliares en la restauración", *6º Coloquio del Seminario de Estudio del Patrimonio Artístico. Conservación, Restauración y Defensa: Investigación y Docencia*, Instituto de Investigaciones Estéticas, UNAM, Mexico, (1999), pp. 61-70.
- ³ Petroviciu, I., Vanden, I., Cretu, I., *et. al.*, "Identification of natural dyes in historical textiles from Romanian collections by LC-DAD and LC-MS (single stage and tandem MS)", *Journal of cultural heritage*, (2012), v. 13, pp. 89-97.
- ⁴ García, H., García, L., *La química en el arte*, primera edición, ADN Editores: Consejo Nacional para la Cultura y las Artes, México, (2007), pp. 166.
- ⁵ Arnal, L., "Formación del profesional y el investigador de la restauración de monumentos", *6º Coloquio del Seminario de Estudio del Patrimonio Artístico. Conservación, Restauración y Defensa: Investigación y Docencia*. Instituto de Investigaciones Estéticas, UNAM, Mexico, (1999), pp. 95-105.
- ⁶ Pardo, J. M., Peralbo, J. A., Torres, S. D., "Los códices mesoamericanos prehispánicos", *Signo. Revista de Historia de la Cultura Escrita*, Universidad de Alcalá, (2002), v. 10, pp. 63-91.
- ⁷ Sahagún, F. B., Martínez, J. L. (Edición, prólogo y cronología), *El México antiguo: selección y reordenación de la Historia general de las cosas de Nueva España de Fray Bernardino de Sahagún y de los informantes indígenas*, Fundación Biblioteca de Ayacucho, México, (1981), pp. 429.
- ⁸ Imagen obtenida de la biblioteca digital *World Digital Library* www.wdl.org Consultada el 17 de febrero 2014 a las 23:04 hrs.
- ⁹ Altamirano, F., "Historia natural aplicada de los antiguos mexicanos", *An. Inst. Méd. Nac. Mex.*, (1896), v. 2, pp. 261-272.
- ¹⁰ Imagen obtenida de *Obras completas de Francisco Hernández*, editada por la UNAM, (1959), v. 2.
- ¹¹ Wallert, A., "On some natural organic yellow colorants in aztec codices: The Florentine codex", *Materials issues in art and Archeology IV: Materials Research Society Symposium Proceedings*, (1994), v. 352, pp. 653-662.
- ¹² Fernández, J., "El arte textil entre los nahuas", *Estudios de cultura Náhuatl*, Instituto de Investigaciones Históricas, UNAM, (1965), v. 5, pp. 143-152.
- ¹³ Imagen obtenida del sitio web de Palacio Nacional de México http://www.hacienda.gob.mx/cultura/museo_virtual_pal_nac/index.htm Consultada el 20 de febrero 2014 a las 20:06 hrs.
- ¹⁴ Sahagún, B., *Códice Florentino: Historia General de las cosas de Nueva España*. Libro XI, Capítulo 11.
- ¹⁵ Hernández, F., *Historia Natural de Nueva España*, Obras Completas, Volumen II, Libro duodécimo, UNAM, (1959).
- ¹⁶ Altamirano, F., "Historia natural aplicada de los antiguos mexicanos", *An. Inst. Méd. Nac. Mex.*, (1896), v. 2, pp. 261-272.
- ¹⁷ Cervantes, V., *Ensayo a la materia médica vegetal de Mexico*, Ofna. Tip. Sec. Fomento México, (1889), pp. 47.
- ¹⁸ Ramírez, J., "Sinonimia vulgar y científica de varias de las *Plantas de la Nueva España* de M. Sessé y José Mociño", *Estudio*, (1893), v. 4:7, pp. 220-227.
- ¹⁹ Toussaint, M., *Datos para la materia médica mexicana*, (1894), v. 1, pp. 361.

- ²⁰ Miranda, F. y Valdés J., "Comentarios botánicos" en: Cruz, M., *Libellus de medicinalibus indorum herbis*, IMSS, Mexico, (1964), pp. 243-284.
- ²¹ Mociño, J. M., Sessé, M., *La Real expedición botánica a Nueva España*, Siglo XXI:UNAM, Instituto de Biología, México, (2010).
- ²² Archivo del Boletín de la Universidad de Carnegie-Mellon, EUA, (1981), v. 3:1, Obtenido de la página web www.huntbotanical.org Consultado el 21 de diciembre 2014 a las 19:35 hrs.
- ²³ Sasaki, S., "Review of MA Paper Conservation: Japanese Prints", *V&A Conservation Journal*, (2001), v. 38, pp. 7-9.
- ²⁴ Mizushima, K., "Japanese print conservation – An overview" *The Conservation of Far Eastern Art, Kyoto Congress*, International Institute for Conservation, (1988), pp. 30-36.
- ²⁵ Kuroda, C., "The colouring matter of awobana", *Journal of Imperial proceedings of Japan*, (1931), v. 7:2, pp. 61-63.
- ²⁶ Imagen obtenida de <http://ukiyo-e.org> Consultada el 13 de noviembre a las 19:45 hrs.
- ²⁷ Imagen obtenida de www.wikipedia.org Consultada el 13 de noviembre a las 18:23 hrs.
- ²⁸ Coombs E. I., Keyes S. R., "All is not lost: 'The Language of Colour in Japanese Prints' in Preprints of The Art and Science of Conserving Coloured Media on Paper", *The Art Institute of Chicago*, (1999), pp. 91-93.
- ²⁹ Faden, R. B., Hunt, D. R., "The classification of Commelinaceae", *Taxon*, (1991), v. 40, pp. 19-31.
- ³⁰ Grabiele, M., Davina J. R., Honfi A. I., "Chromosomes of four species of *Commelina* (Commelinaceae)", *Botanical Journal of Linnean Society*, (2005), v. 148:2, pp. 207-218.
- ³¹ Dahlgren, R., Clifford, H., Yeo P., *The families of the Monocotyledons*, Springer-Verlag, Berlin, (1985), pp. 520.
- ³² Davidse, G., Sousa S., Mario, C., Arthur O., (editores generales), *Flora Mesoamericana*, volumen 6, Missouri Botanical Garden, The Natural History Museum (London), Instituto de Biología, UNAM, (1994), pp. 171-173.
- ³³ Hrycan W., Davis, A., "Comparative structure and pollen production of the stamens and pollinator-deceptive staminodes of *Commelina coelestis* and *C. dianthifolia* (Commelinaceae)", *Annals of Botany*, (2005), v. 95, pp. 1113-1130.
- ³⁴ *Commelina dianthifolia* Delile. Fotografía tomada por la autora, Ciudad Universitaria, agosto 2013.
- ³⁵ CONABIO <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/commelinaceae/commelina-diffusa/fichas/ficha.htm#2.%20Origen%20y%20distribuci%F3n%20geogr%E1fica> Consultado el 9 de octubre 2014 16:30 hrs.
- ³⁶ Matuda, E., "Las commelináceas mexicanas", *Anales Inst. Biol.*, UNAM, (1955), v. 26, pp. 303-432.
- ³⁷ Biblioteca digital de la Medicina tradicional mexicana, UNAM http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Commelina_erecta&id=7582. Consultado el 9 de octubre 2014 a las 16:07 hrs.
- ³⁸ Ibrahim, J., Chioma V., Egharevba, H., "Pharmacognostic and phytochemical analysis of *Commelina benghalensis* L.," *Ethnobotanical Leaflets*, (2010), v.14, pp. 610-615.
- ³⁹ Sharma, S.C., Tandon, J. S., "A dammarane triterpene from *Commelina undulata*", *Phytochemistry*, (1982), v. 21:9, pp. 2420-2421.
- ⁴⁰ Yang, Q., Ye, G., Zhao, W., "Chemical constituents of *Commelina communis* Linn.", *Biochemical systematics and ecology*, (2007), v. 35, pp. 621-623.
- ⁴¹ Harborne, J. B. (editor), *The flavonoids: Advances in research since 1986*, Chapman & Hall, London, (1993).
- ⁴² Stirton, J. Z., Harborne, J. B., "Two distinctive patterns in the *Commelinaceae*" *Biochemical systematics and ecology*, (1980), v. 8:3, pp. 285-287.
- ⁴³ Harborne, J. B., *The Flavonoids*, Chapman and Hall, London, (1976), pp. 539-559.
- ⁴⁴ Forkmann, G., "Flavonoids as flower pigments: the formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering", *Plant Breeding*, (1991), v. 106:1, pp. 1-26.
- ⁴⁵ Brouillard, R., "The *in vivo* expression of anthocyanin colour in plants", *Phytochemistry*, (1983), v. 22, pp. 1311-1323.

- ⁴⁶ Dewick, M. P., *Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach*, tercera edición, Wiley, Inglaterra, (2009), pp. 167-173.
- ⁴⁷ Leland, J. C., *et. al.*, *Natural Products from plants*, segunda edición, Taylor and Francis group, EUA, (2006), pp. 263-313.
- ⁴⁸ Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, Ma. de L., *et. al.*, “Chemical studies of anthocyanins: a review” *Food Chemistry*, (2009) v. 113, pp. 859-871.
- ⁴⁹ Park, H.B., Hah, Y. S., Yang, J. W., Nam, J. B., Cho, S. H., Jeong, S. T., “Antiapoptotic effects of anthocyanins on rotator cuff tenofibroblasts”, *J. Orthop. Res.*, (2010), v. 28, pp. 1162–1169.
- ⁵⁰ Lule, S. U., Xia, W., “Food phenolic pros and cons: a review”, *Foods Reviews International*, (2005), 21:4, pp. 367-388.
- ⁵¹ Fernandes, I., Faria, A., Azevedo, J., *et. al.*, “Influence of anthocyanins, derivative pigments and other catechol and pyrogallol-type phenolics on breast cancer cell proliferation”, *J. Agric. Food Chem.*, (2010), v. 58, pp. 3785–3792.
- ⁵² Stintzing, F. C., Carl, R., “Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food and in human nutrition”, *Trends in Food Science and Technology*, (2004), v. 15:1, pp. 19-38.
- ⁵³ Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., Brouillard, R. “Analysis and biological activities of anthocyanins”, *Phytochemistry*, (2003), v. 64:5, pp. 923-933.
- ⁵⁴ Rein M., “Co-pigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins”, Tesis para optar por grado, University of Helsinki, pp. 10-14.
- ⁵⁵ Goto, T., Kondo, T., “Structure and molecular staking of anthocyanins - Flower color variation”, *Angew Chem. Int Edn. Engl.*, (1991), v. 30, pp. 17-33.
- ⁵⁶ Asen S., Stewart, R. N., Norris K. H., “Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color”, *Phytochemistry*, (1972), v. 11, pp. 1139-1144.
- ⁵⁷ Goto, T., Tamura, H., Kawai, T., Harada, N., Kondo T., “Chemistry of metalloanthocyanins”, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, (1986), v. 471, pp. 155-173.
- ⁵⁸ Hoshino, T., Matsumoto, U., Goto, T., Harada N., “Self-association of some anthocyanins in neutral aqueous solution”, *Phytochemistry*, (1981), v. 20:8, pp. 1971-1976.
- ⁵⁹ Hoshino, T., Matsumoto, U., Goto, T., “Evidences of the self-association of anthocyanins I. Circular Dichroism of cyanin anhydrobase”, *Tetrahedron Lett.*, (1980), v. 21:18, pp. 1751-1754.
- ⁶⁰ Saito, N., Osawa, Y., Hayashi, K., “Platyconin, a new acylated anthocyanin in Chinese bell-flower, *Platycodon grandiflorum*”, *Phytochemistry*, (1971), v. 10:2, pp. 445.
- ⁶¹ Yoshitama, K., Hayashi, K., Abe, K., Kakisawa, H., “Further evidence for the glycoside structure of cinerarin”, *Bot. Mag. Tokyo*, (1975); v. 88:3, pp. 213-217.
- ⁶² Brouillard, R., “Origin of the exceptional color stability of the Zebrina anthocyanin”, *Phytochemistry*, (1981), v. 20:1, pp. 143-145.
- ⁶³ Robinson, G. M., Robinson, R., “A survey of Anthocyanins. I”, *Biochem. J.*, (1931), v. 25:5, pp. 1687-1704.
- ⁶⁴ Saito, N., Hirata, K., Hotta, R., Hayashi, K., “Isolation and crystallization of genuine red anthocyanins”, *Proc. Japan Acad.*, (1964), v. 40:7, pp. 516-521.
- ⁶⁵ Takeda, K., “Blue metal complex pigment involved in blue flower color”, *Proc. Japan Acad. Ser. B*, (2006), v. 82, pp. 142–154.
- ⁶⁶ Hayashi, K., Abe, Y., Mitsui, S., “Blue anthocyanin from the flowers of *Commelina*, the crystallization and some properties thereof. Studies on anthocyanins. XXX”, *Bot. Mag. Tokyo*, (1958), v. 86:6, pp. 373-378.
- ⁶⁷ Hayashi, K., Abe, Y., Mitsui, S., “Further studies on commelinin, a crystalline blue metallo-anthocyanin from the flowers of *Commelina*. Studies on anthocyanins. XXXI”, *Bot. Mag. Tokyo*, (1959), v. 38:4, pp.169-174.
- ⁶⁸ Goto, T. Hoshino, T., Takase, S., “A proposed structure of commelinin, a sky-blue anthocyanin complex obtained from the flower petals of *Commelina*”, *Tetrahedron Lett.* (1979), v. 20:31, pp. 2905-2908.
- ⁶⁹ Takeda, K., Hayashi, K., “Metallo-Anthocyanins I. Reconstruction of commelinin from its components, awobanin, flavocommelin and magnesium”, *Proc. Japan Acad. B*, (1977), v. 53:1, pp. 1-5.

- ⁷⁰ Takeda, K., Mitsui, S., Hayashi, K., "Structure of a new flavonoid in the blue complex molecule of commelinin. Studies on anthocyanins. LIV", *Bot. Mag. Tokyo*, (1966), v. 79, pp. 578-587.
- ⁷¹ Shiono, M., Matsugaki, N., Takeda, K., "Structure of commelinin, a blue complex pigment from the flowers of *Commelina communis*", *Proc. Japan Acad. B*, (2008), v. 84:10, pp. 452-456.
- ⁷² Osawa, Y., Koizumi, M., Saito, N., "Zone electrophoretic investigation of anthocyanins", *Phytochemistry*, (1971), v. 10:7, pp. 1591-1593.
- ⁷³ Hayashi, K., "Fortschritte der anthocyanforschung in Japan mit besonderer Berücksichtigung del papierchromatographischen methoden", *Pharmazie*, (1957), v. 12, pp. 245-249.
- ⁷⁴ Kondo, T., Ueda, M., Yoshida, K., Minoru, I., Goto, T., "Direct observation of a small- molecule associated supramolecular pigment, commelinin, by electrospray ionization mass spectrometry", *J. Am. Chem. Soc.*, (1994), v. 116, pp. 7457-7458.
- ⁷⁵ Nakagawa, A., "X-ray structure determination of commelinin from *Commelina communis* and its blue color development", *J. Cryst. Soc. Japan*, (1993), v. 35, pp. 327-333.
- ⁷⁶ Takeda, K., "Further experiments of synthesizing crystalline blue metallo-anthocyanins using various kinds of bivalent metals", *Proc. Japan Acad. Ser. B.*, (1977), v. 53:7, pp. 257-261.
- ⁷⁷ Baeyer, E., "Über den blauen Farbstoff der Kornblume, I. Natürliche und synthetische Anthocyan-Metallkomplexe", *Chem. Ber.*, (1958), v. 91:5, pp. 1115-1122.
- ⁷⁸ Hayashi, H., Saito, N., Mitsui, S., "On the metallic components in newly crystallized specimen of Bayers protocyanin, a blue metalloanthocyanin from the cornflower", *Proc. Japan. Acad.*, (1961), v. 37, pp. 393-397.
- ⁷⁹ Takeda, K., Osakabe, A., Saito, S., Furuyama, D., *et. al.*, "Components of protocyanin, a blue pigment from the blue flowers of *Centaurea cyanus*", *Phytochemistry*, (2005), v. 66, pp. 1607-1613.
- ⁸⁰ Takeda, K., Shiona, M., Matsugaki, N., "Structure of the blue cornflower pigment", *Nature*, (2005), v. 436, pp. 791.
- ⁸¹ Takeda, K., Yanagisawa, M., Kifune, T., Kinoshita, T., Timberlake, C. F., "A blue pigment complex in flowers of *Salvia patens*", *Phytochemistry*, (1994), v. 35, pp. 1167-1169.
- ⁸² Veitch, N. C., Grayer, R. J., Irwin, J. L., Takeda, K., "Flavonoid cellobiosides from *Salvia uliginosa*", *Phytochemistry*, (1998), v. 48, pp. 389-393.
- ⁸³ Kondo, T., Yoshida, K., Nakagawa, A., *et. al.*, "Structural basis of the blue-color development in flower petals from *Commelina communis*", *Nature*, (1992), v. 358, pp. 515-518.
- ⁸⁴ Kondo, T., Oyama, K., Yoshida, K., "Chiral molecular recognition on formation of metalocyanin: a supramolecular metal complex pigment from blue flowers of *Salvia Patens*", *Angew. Chem. In. Ed.*, (2001), v. 40:5, pp.894-897.
- ⁸⁵ Mori, M., Kondo, T., Yoshida, K., "Cyanosalvianin, a supramolecular blue metalloanthocyanin, from petals of *Salvia uliginosa*", *Phytochemistry*, (2008), v. 69, pp. 3151-3158.
- ⁸⁶ Lot, A., Cano-Santana, Z. (editores), *Biodiversidad del ecosistema del Pedregal de San Ángel*, Coordinación de la Investigación Científica, UNAM, primera edición, México, (2009), pp. 538.
- ⁸⁷ Hoshino, T., "Circular dichroic measurements on anthocyanins in intact flower petals", *Phytochemistry*, (1986), v. 24:4, pp. 829-832.
- ⁸⁸ Misawa, K., Gunji, Y., Sato, S., "Concise synthesis of flavocommelin, 7-O-methylapigenin 6-C,4'-O-bis-β-D-glucoside, a component of the blue supramolecular pigment from *Commelina communis*", *Carbohydrate Research*, (2013), v. 374, pp. 8-13.
- ⁸⁹ Kondo, T., Tamura, H., Takase, S., Goto, T., "Complete stereostructure determination of natural acylated anthocyanins, violanin, awobanin, and malonylawobanin by ¹H-NMR", *The Chemical Society of Japan*, (1986), v. 11, pp. 1571-1578.
- ⁹⁰ Hosokawa, K., Fukunaga, Y., Fukushi, E., Kawabata, J., "Seven acylated anthocyanins in the blue flowers of *Hyacinthus orientalis*", *Phytochemistry*, (1995), v. 38:5, pp. 1293-1298.
- ⁹¹ Potapov, V. M., *Stereochemistry*; Mir Publishers, Russia, (1978), pp. 27-28.
- ⁹² Frank, J., Powder-George, Y., Ramsewak, R., Reynolds, W., "Variable-Temperature ¹H-NMR studies on two C-glycosylflavones", *Molecules*, (2012), v. 17, pp. 7914-7926.

-
- ⁹³ Domon, B., Costello, C. E., “ A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentation in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates”, *Glycoconjugate J.*, (1988), v. 5, pp. 397-409.
- ⁹⁴ Sun, Y., *et.al.*, “Rapid Identification of polyphenol C-Glycosides from *Swertia franchetiana* by HPLC-ESI-MS-MS”, *Journal of Chromatographic Science*, (2009), v. 47, pp. 190-196.
- ⁹⁵ Cuyckens, F., Claeys, M., “Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids”, *Journal of Mass Spectrometry*, (2004), v. 39, pp. 1-15.