

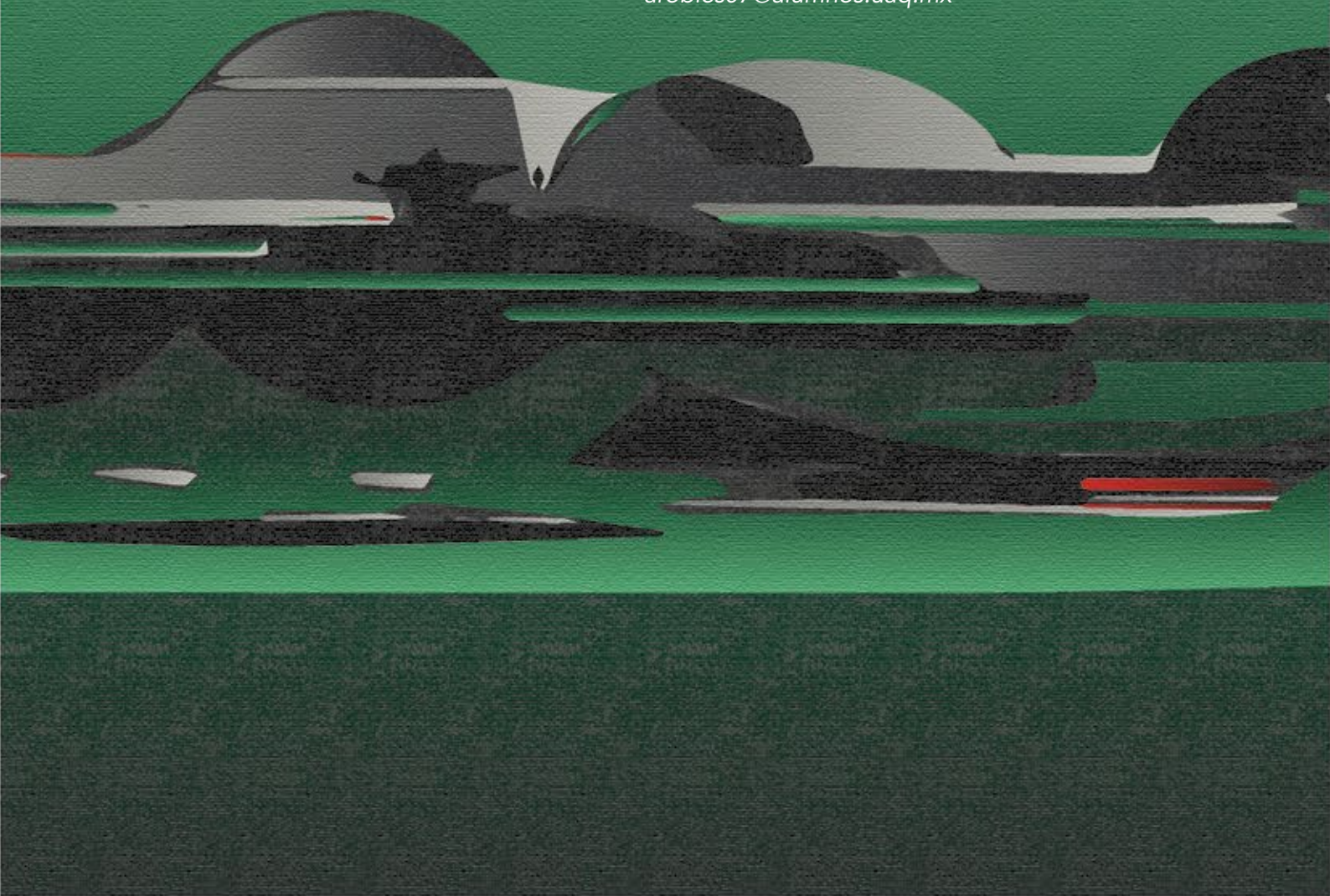
EFEECTO DEL SOLVENTE Y EL PH SOBRE LA ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD QUÍMICA DE LA MOLÉCULA DE DELFINIDINA

EFFECT OF SOLVENT AND PH ON THE STABILITY AND CHEMICAL REACTIVITY OF THE DELPHINIDIN MOLECULE

Ana Paola Robles Sánchez^{1*}
Oscar Eduardo Ortiz Contreras¹
Ángeles Cuan Hernández¹

¹Facultad de Ingeniería,
Universidad Autónoma de Querétaro

*arobles07@alumnos.uaq.mx



RESUMEN

Se presenta un comparativo de la estabilidad y la reactividad química de la molécula de delphinidina en cuatro disolventes (agua, metanol, etanol y acetona) a través del modelado molecular. La molécula de estudio se modeló en las distintas condiciones experimentales con base en sus estructuras predominantes correspondientes a los pH 1, 4.5, 5.5 y 7. Asimismo, los estudios mecánico-cuánticos se efectuaron según la teoría funcional de la densidad (DFT en inglés) a nivel B3LYP y con un conjunto de bases 6-11+g (d,p). Las energías de solvatación de la molécula de delphinidina revelaron que en metanol es donde mejor se disuelve. Además, los índices de reactividad química por efecto de disolvente indicaron que la delphinidina pierde dureza cuando se disuelve en agua, volviéndose más reactiva. Los resultados también mostraron que, a pH menor que 2 y en metanol como disolvente, el grupo hidroxilo unido al carbono 4' es el más propenso a donar hidrógenos.

Palabras clave: antocianinas, delphinidina, DFT, efecto del solvente, pH.

A través del modelado molecular se comprende que la molécula delphinidina muestra un variado tema de estudio. A continuación, se presentará la comparativa respecto a su estabilidad y reactividad química en cuatro disolventes: agua, metanol, etanol y acetona, a través de distintas condiciones experimentales y estudios mecánico-cuánticos.

ABSTRACT

A comparison of the stability and chemical reactivity of the delphinidin molecule in four solvents (water, methanol, ethanol and acetone) is presented through molecular modeling. The study molecule was modeled in the different experimental conditions based on its predominant structures corresponding to pH

1, 4.5, 5.5 and 7. Furthermore, the quantum-mechanical studies were performed according to density functional theory (DFT) at the B3LYP level and with a 6-11+g (d,p) basis set. The solvation energies of the delphinidin molecule revealed that it dissolves best in methanol. In addition, the chemical reactivity indices by solvent effect indicated that delphinidin loses hardness when dissolved in water, becoming more reactive. The results also showed that, at pH less than 2 and in methanol as solvent, the hydroxyl group attached to carbon 4' is the most likely to donate hydrogens.

Keywords: anthocyanins, delphinidin, DFT, solvent effect, pH.

INTRODUCCIÓN

Las antocianinas forman parte del grupo de los flavonoides, metabolitos generados por biosíntesis en plantas [1] que confieren la pigmentación azul, rojo o púrpura a diversas flores, frutas y vegetales [2]. Se presentan en bayas como la mora, saúco, uva, frambuesa, y otros alimentos como la cereza, fresa, maíz morado, camote amarillo, granadas y cebolla roja [3, 4]. Las antocianinas se han vuelto atractivas los investigadores gracias a sus propiedades farmacológicas como los antioxidantes, precursores de enfermedades neurodegenerativas y cardioprotectoras [3, 5]. En particular, las antocianidinas, la forma aglicona de las antocianinas, poseen uno o más azúcares enlazados a los oxígenos de C3 o C3 y C5 principalmente (Figura 2 para la numeración); de las más de 600 antocianinas identificadas hasta la fecha, solo 5 se clasifican de acuerdo a los grupos hidroxilo del esqueleto *flavylium* que caracteriza a las antocianidinas [4, 6].

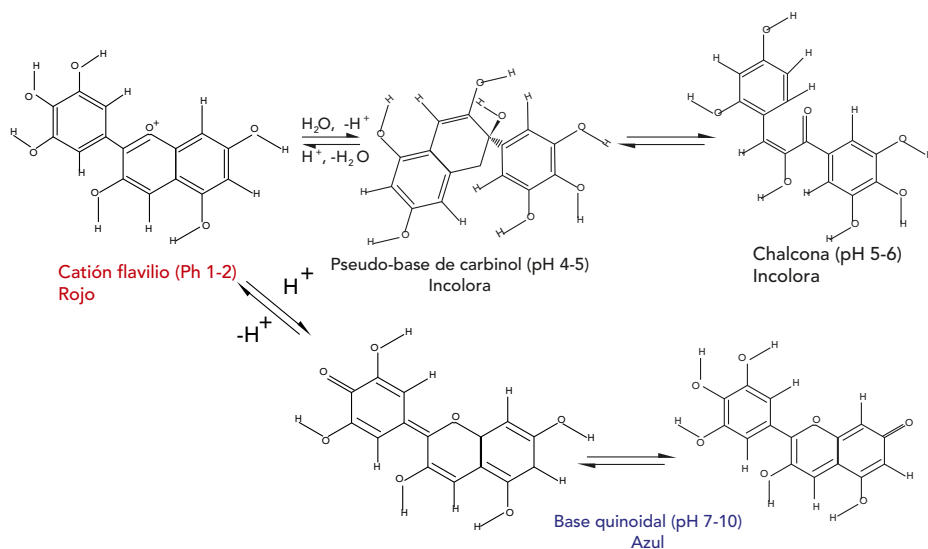


Figura 1. Estructuras de la delfinidina a diferentes pH. Cation flavilio (pH 1-2): predomina el ion oxonio en el anillo B. Pseudo-base de carbinol (pH 4-5): producto de la hidratación del cation flavilio. Base quinoidal (pH 7-10): producto de la reacción ácida del cation flavilio, los enlaces pi conjugados de la estructura le proporcionan la absorción en el espectro visible. Chalcona (pH 5-6): tautómero de la molécula pseudobase de carbinol, resultado de la apertura del anillo de pirilio, con H_2O como catalizador. Estructuras reportadas en [6].

Por otra parte, el potencial de hidrógeno (pH) desempeña un papel fundamental en la estructura de las antocianinas al propiciar reacciones ácido-básicas, de isomerización o de adición de una molécula de agua. Para un pH menor a, 3 la estructura mayoritaria es el cation flavilio (HA^+), con un pKa de 4-5 para la formación de la base conjugada A (base quinoidal). Una adición nucleofílica de H_2O en el carbono 2 resulta en la formación de la forma hemiacetal incolora, que tras un aumento en el pH produce su tautómero incoloro, la chalcona (Figura 1) [7, 8]. Al variar el pH, la chalcona adopta un pigmento que se emplea como colorante natural en aditivos de alimentos, en la enología [9] e incluso como indicador inteligente de frescura en el empaquetado de productos alimentarios [10]. También, los diferentes niveles de pH durante la digestión propician el estado mayoritario de una estructura u otra en el cuerpo.

Aunque la delfinidina es la segunda antocianina predominante en

mora azul, granada, uva roja, entre otras [8], solo después de la cianidina, su presencia alcanza apenas un 12 %. El porcentaje tan bajo conlleva para extraerlo un arduo trabajo de purificación, donde el disolvente posee un rol fundamental [11]. En este trabajo se analizó la estabilidad, así como la reactividad química, de la molécula de delfinidina en varios disolventes empleando las estructuras predominantes de acuerdo al pH [7], mediante el modelo de polarización continua (SMD), con la finalidad de elucidar el mecanismo por el cual alcanza su configuración más estable.

METODOLOGÍA

CÁLCULO DE OPTIMIZACIÓN Y FRECUENCIA

Se utilizó el método *ab initio* de la DFT para la generación de cuatro geometrías óptimas (de mínima energía) de delfinidina en su estado fundamental (EF) correspondientes a los rangos de pH 1-2, 4-5, 5-6, y 7-10. Se consideró el

ion flavilio con carga +1; además, con base en la teoría de funcional de la densidad (DFT), se adoptó el funcional de correlación de intercambio B3LYP (Becke, 3 parámetros, Lee–Yang–Parr) [12], un conjunto de bases con función difusa “+” y de polarización 6-311+g (d,p). Mediante el paquete informático Gaussian 09, se ejecutaron los cálculos de frecuencia para obtener los parámetros termodinámicos; dichos cómputos se cotejaron con los reportes. También se realizaron cálculos TD-DFT, una ampliación de la teoría del funcional de la densidad asignada a sistemas excitados, para determinar los espectros UV y los estados electrónicos excitados alcanzados en las estructuras geométricas propuestas [13].

EFFECTOS DEL SOLVENTE

Se evaluaron 4 solventes orgánicos puros a fin de calcular la estabilización o energía de solvatación de la delfinidina en el medio, a saber, acetona, agua, metanol y etanol. Se examinó cada estructura en

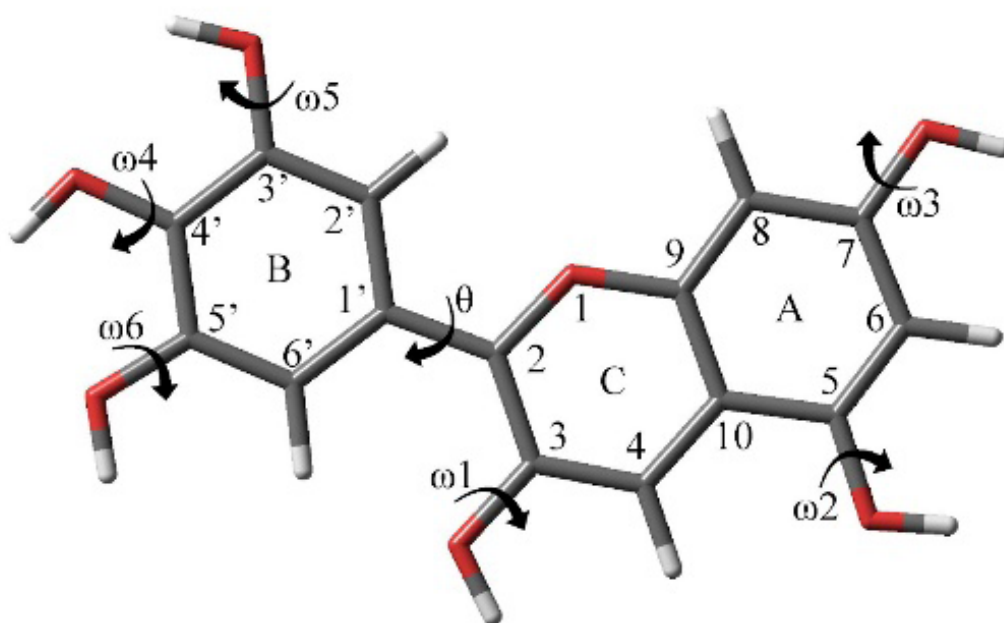


Figura 2. Estructura optimizada de delphinidina en estado gaseoso [14].

estado fundamental, primero sin efecto de disolvente, y posteriormente se calculó el efecto de solvatación al utilizar el modelo universal de solvatación basado en densidad (SMD). El solvente se representó implícitamente como un medio dieléctrico y la tensión superficial se calculó en el límite entre soluto y solvente [14]. Cada energía de solvatación se computó como la diferencia de la energía libre de Gibbs en estado solvatado menos la misma en el vacío. Adicionalmente, se obtuvieron los descriptores químicos de dureza (η), potencial (μ), blandura (σ), electronegatividad (χ) e índice de electrofilicidad (ω) al usar los valores de los orbitales frontera HOMO y LUMO. Donde $I = -\text{HOMO}$ y $A = -\text{LUMO}$, para las diferentes geometrías formadas dependiendo del valor pH. Las Ecuaciones (1-5) ilustran estos planteamientos:

$$\mu = -(I + A)/2 \quad (1)$$

$$\eta = (I - A)/2 \quad (2)$$

$$\sigma = 1/(2\eta) \quad (3)$$

$$\chi = (I + A)/2 \quad (4)$$

$$\omega = \mu^2/2\eta \quad (5)$$

A su vez, las cargas fueron evaluadas como puntuales, centradas en los átomos y derivadas del potencial electrostático en específico CHELPG.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ESTRUCTURA DE LA DELFINIDINA

La estructura optimizada en la fase gaseosa para el isómero catiónico (catión flavilio) es completamente plana (Figura 2). Los ángulos diedros $\omega 1$ (C2-C3-O-H), $\omega 4$ (C3'-C4'-

O-H), $\omega 5$ (C2'-C3'-O-H), y $\omega 6$ (C4'-C5'-O-H) son anti-periplanares, de modo que se maximiza la distancia entre los hidrógenos con carga parcial positiva del grupo hidroxilo. En contraste, $\omega 2$ (C5-C6-O-H) y $\omega 3$ (C6-C7-O-H) son sin-periplanares, y mientras $\omega 2$ concuerda con la literatura en este sentido [15, 16], el ángulo $\omega 3$ no, lo que podría sugerir que la siguiente estructura es un mínimo local, no global.

La estructura de menor energía de solvatación obtenida conforme a la Ecuación (6), corresponde a la geometría catiónica (pH < 2).

$$\Delta G_{(solv)} = G_{(e.s)} - G_{(e.g)} \quad (6)$$

Donde:

$\Delta G_{(solv)}$: energía de solvatación;

$G_{(e.s)}$: energía libre de Gibbs en estado solvatado;

$G_{(e.g)}$: energía libre de Gibbs en fase gaseosa.

Los resultados, resumidos en la Figura 3, muestran la estabilización de las diferentes estructuras propuestas experimentalmente en [7] y calculadas en este trabajo. El ion oxonio de la estructura flavilio (especie formada a pH = 1) es el que se estabiliza más en cualquier disolvente, con respecto a las estructuras moleculares. Esto se encuentra en congruencia con la parte experimental, donde el pH seleccionado para purificar el compuesto es, de igual forma, 1. Existen pequeñas diferencias en la estabilidad molecular de la estructura tipo flavilio, de mayor a menor: metanol, etanol, agua y acetona. Las constantes dieléctricas de cada solvente son 0.791, 0.789, 0.998 y 0.788, respectivamente. Por tanto, es evidente que, cuando la constante dieléctrica se encuentra en el rango de 0.8-0.78, la solubilidad aumenta con la polaridad de la molécula. Las diferencias más significativas ocurren a pH = 4-5 y 5-6. Además, contrariamente a los demás disolventes, la acetona no forma puentes de hidrógeno, por lo que se ve una marcada disminución en la energía de solvatación. Por otro lado, en los rangos de pH de 4-5 y pH > 7 no parece haber una diferencia significativa, quizás debido a que tanto la base carbinol como la pseudobase quinoidal son moléculas neutras. Lo anterior concuerda con resultados experimentales [17].

REACTIVIDAD QUÍMICA

Los orbitales de frontera HOMO y LUMO son los principales involucrados en la reactividad química. HOMO proporciona información acerca de la habilidad de donar un electrón, mientras LUMO indica la capacidad de aceptar un electrón.

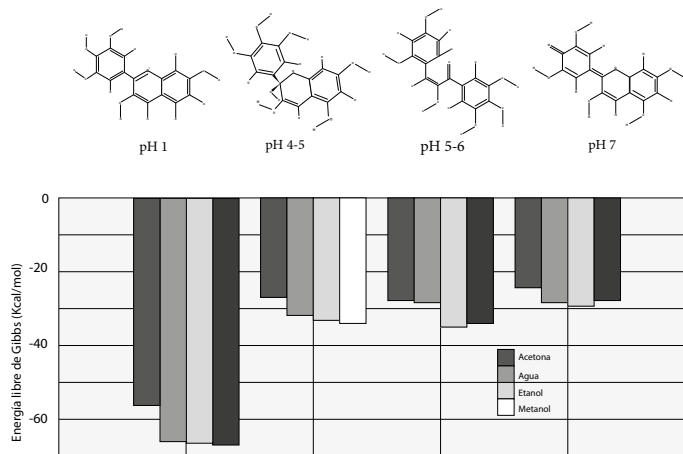


Figura 3. Gráfica de la energía de solvatación de las diferentes estructuras evaluada en diferentes solventes orgánicos. pH < 2: catión flavilio. pH 4-5: pseudobase de carbinol. pH 5-6: chalcona. pH > 7: base quinoidal.

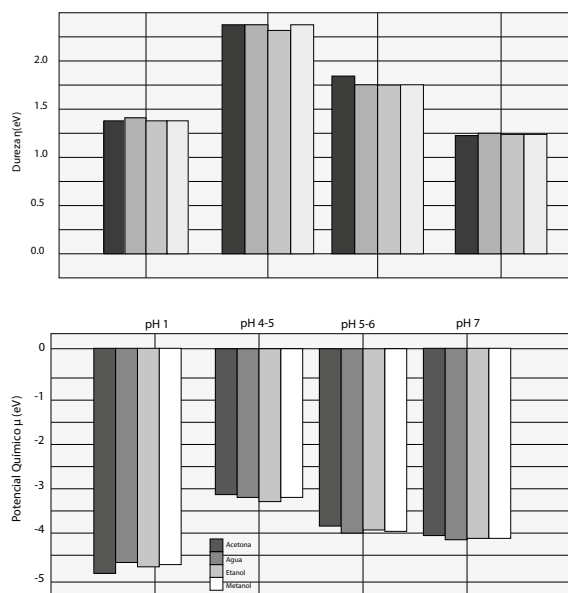


Figura 4. Dureza (η) y potencial químico (μ) de las estructuras evaluadas en diferentes solventes orgánicos. pH 1: catión flavilio. pH 4-5: pseudobase de carbinol. pH 5-6: chalcona. pH > 7: base quinoidal.

Las energías de dichos orbitales sirven para calcular los descriptores de reactividad química. El primero corresponde a la dureza (η), es decir, la resistencia a la deformación o polarización de la nube de electrones. De acuerdo a la Figura 4 (parte superior), la pseudobase de carbinol presenta la mayor estabilidad, seguida de la chalcona, es decir, los dos compuestos incoloros. En contraste, de acuerdo a la blandura, los cromóforos a pH 7 y 1 poseen la mayor reactividad (Figura 4; Tablas 1-4).

CARGA DE LA MOLÉCULA

En la Figura 5, se muestran las cargas parciales atómicas calculadas con CHELPG para el estado gaseoso puro del soluto y con los solventes agua y metanol. En la estructura de pH < 2, el ion oxonio de la estructura flavilio presenta una menor carga negativa que los demás oxígenos. En forma gaseosa (-0.291), no alcanza una carga +1 en este átomo, debido a que las cargas se distribuyen en todos los átomos de la molécula.

Tabla 1. Energías de solvatación (Kcal/mol), potencial químico, dureza, blandura, electronegatividad e índice de electrofilicidad de la molécula de delphinidina a pH 1.

	$\Delta G_{(SOLV)}$	μ	H	Σ	X	Ω
ACETONA	-55.913	-4.969	1.402	0.357	4.969	8.804
AGUA	-62.923	-4.741	1.422	0.352	4.741	7.904
ETANOL	-63.243	-4.803	1.411	0.354	4.803	8.177
METANOL	-63.974	-4.771	1.414	0.354	4.771	8.050

Tabla 2. Energías de solvatación (Kcal/mol), potencial químico, dureza, blandura, electronegatividad e índice de electrofilicidad de la molécula de delphinidina a pH 4-5.

	$\Delta G_{(SOLV)}$	μ	H	Σ	X	Ω
ACETONA	-26.004	-3.158	2.373	0.211	3.158	2.101
AGUA	-31.233	-3.197	2.377	0.210	3.197	2.150
ETANOL	-32.447	-3.270	2.334	0.214	3.270	2.291
METANOL	-33.009	-3.166	2.374	0.211	3.166	2.111

Tabla 3. Energías de solvatación (Kcal/mol), potencial químico, dureza, blandura, electronegatividad e índice de electrofilicidad de la molécula de delphinidina a pH 5-6.

	$\Delta G_{(SOLV)}$	μ	H	Σ	X	Ω
ACETONA	-24.559	-3.849	1.805	0.277	3.849	4.103
AGUA	-29.594	-4.002	1.755	0.285	4.002	4.563
ETANOL	-30.414	-3.932	1.752	0.285	3.932	4.411
METANOL	-30.247	-3.967	1.746	0.286	3.967	4.505

Tabla 4. Energías de solvatación (Kcal/mol), potencial químico, dureza, blandura, electronegatividad e índice de electrofilicidad de la molécula de delphinidina a pH 7.

	$\Delta G_{(SOLV)}$	μ	H	Σ	X	Ω
ACETONA	-25.031	-4.057	1.232	0.406	4.057	6.680
AGUA	-28.352	-4.146	1.251	0.400	4.146	6.868
ETANOL	-28.993	-4.088	1.242	0.403	4.088	6.728
METANOL	-28.162	-4.115	1.246	0.401	4.115	6.796

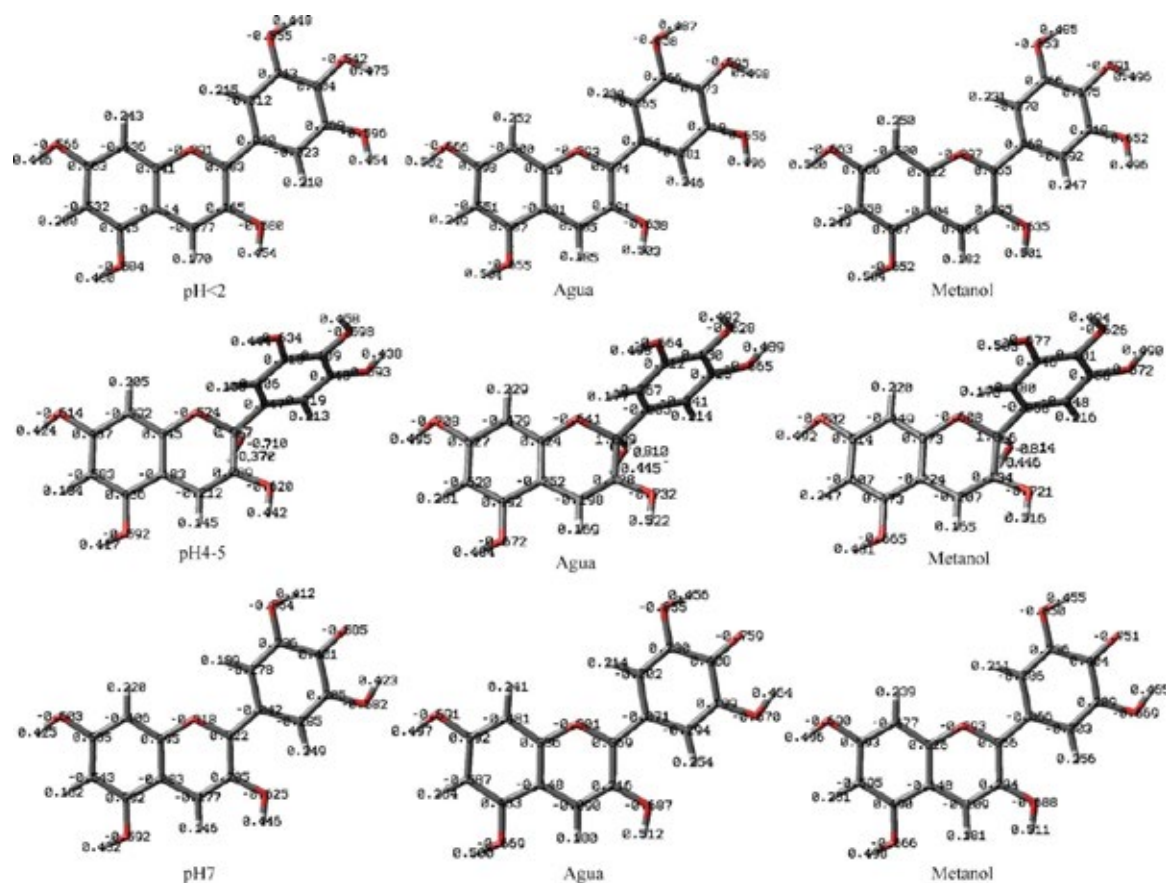
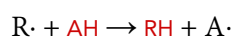


Figura 5. Carga parcial atómica calculada con CHELPG, para el estado gaseoso puro del soluto y con los solventes agua y metanol.

Sin embargo, a comparación de los átomos de oxígeno restantes en la molécula, el O1 es ligeramente más positivo. El segundo oxígeno con mayor carga parcial positiva es el contenido en el hidroxilo 4'C-OH; por lo tanto, actúa como un ácido débil (AH), este grupo podría ser un lugar de eliminación de radicales por el mecanismo de transferencia de hidrógenos a la especie reactiva (R·) (HAT, por sus siglas en inglés), como se muestra en la siguiente reacción:



La base conjugada producto de esta reacción (base quinoidal)

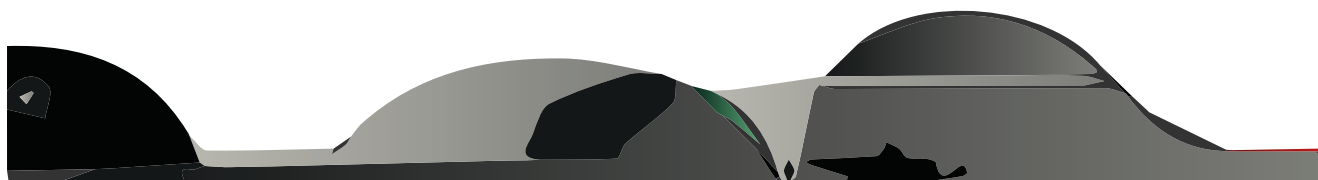
se estabiliza por los puentes de hidrógeno de los hidroxilos 3'C-OH y 5'C-OH [15]; posterior a este, el O de 5C-OH es el más positivo, por lo que a pH 7 podría ser un grupo ácido. Esta estructura es importante en la cavidad oral y en el intestino humano, donde el pH varía en rangos de 5.6-7.9 y 6.7-7.4 respectivamente [17].

CÁLCULO DE LOS ESTADOS EXCITADOS TD-DFT

En la Figura 6, se muestran los estados excitados obtenidos con el cálculo TD-DFT. Las excitaciones electrónicas van de los HOMO,

HOMO-1, HOMO-2 a los LUMO, LUMO+1, LUMO+2, LUMO+3, principalmente, y corresponden a las transiciones de los orbitales $n \pi \pi^*$, $\pi \pi \pi^*$ y $\pi \pi \pi^*$.

Las excitaciones con longitudes de onda entre los 400 nm y los 600 nm confieren color a los sistemas moleculares. La brecha energética, $\Delta E = |E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}|$, se dio notablemente en un rango menor para el ion oxonio de la estructura flavilio formada a pH 1 en comparación a otros compuestos. De tal forma, queda confirmado que este compuesto resulta ser el más sensible a los efectos del medio.



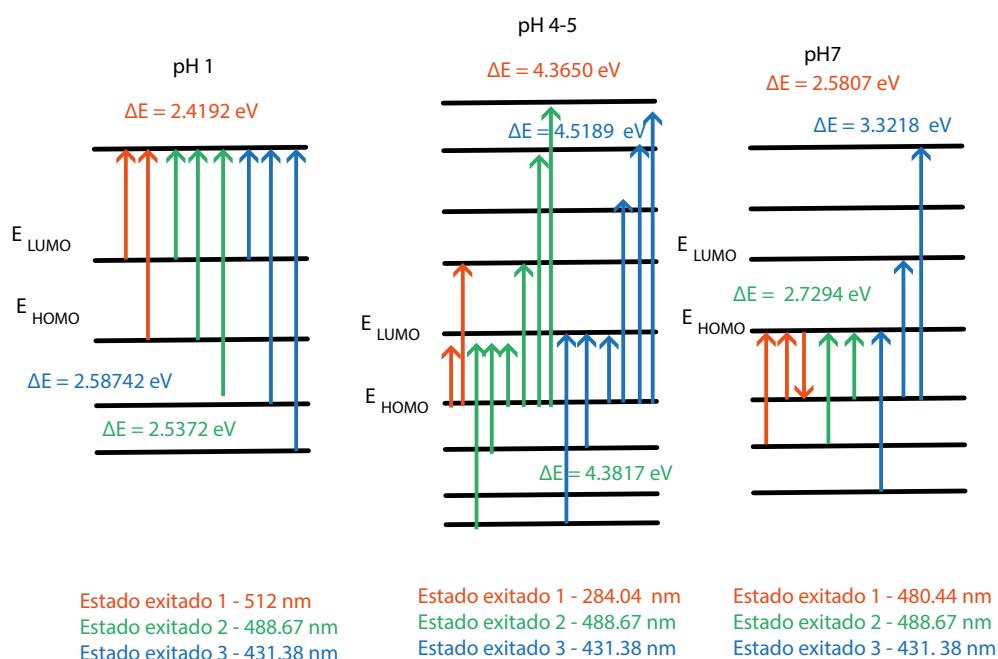


Figura 6. Estados excitados y transiciones electrónicas de la molécula de delphinidina predominante en 3 diferentes niveles de pH.

CONCLUSIONES

Gracias a la teoría del funcional de densidad en la descripción de propiedades estructurales y electrónicas de las moléculas, se logró conocer la energía de solvatación y estabilización de la molécula delphinidina en los cuatro solventes propuestos. Se encontró que posee una mayor estabilidad cuando adquiere una estructura de ion flavilio, el cual se forma a un pH de 1.0. Además, las cargas parciales atómicas de la molécula revelaron que el grupo con mayor potencial antioxidante, entre los solventes utilizados, es el 4'C-OH. Su efecto antioxidante y sus cualidades terapéuticas se adjudican a sus metabolitos predominantes: el ácido protocatecuico y cafeico [17]. Sin embargo, en las fuentes de consumo se encuentra en la forma glicosilada, que ha reportado una disminución de la actividad antioxidante, además de que se descompone durante la digestión. Finalmente, los resultados obtenidos mediante este tipo de estudios permiten una cabal comprensión

de la naturaleza química que un sistema molecular puede obtener y a su vez el potencial efecto del medio (disolvente) desde el punto de vista electrónico.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de Querétaro, a la Universidad Autónoma de México plantel Iztapalapa: Laboratorio de Supercómputo y a Visualización en Paralelo (LSVP) de la UAM–Unidad Iztapalapa por los recursos computacionales aquí empleados. Extiendo mi gratitud al alumno de posgrado Oscar Ortiz y la doctora Ángeles Cuan Hernández por su apoyo; sin ellos, la realización del presente artículo habría sido imposible.

REFERENCIAS

[1] S. K. Panchal, O. D. John, M. L. Mathai y L. Brown, "Anthocy-

anins in chronic diseases: The power of purple", *Nutrients*, vol. 14, no. 10, p. 2161, 2022.

[2] H. E. Khoo, A. Azlan, S. T. Tang y S. M. Lim, "Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits", *Food & Nutrition Research*, vol. 61, no. 1, p. 1361779, 2017.

[3] V. Bendokas, V. Stanys, I. Mažeikienė, S. Trumbeckaite, R. Baniene y J. Liobikas, "Anthocyanins: From the field to the antioxidants in the body", *Antioxidants*, vol. 9 no. 9, p. 819, 2020. <https://doi.org/10.3390/antiox9090819>

[4] C. Chaiyasut, B. S. Sivamaruthi, N. Pengkumsri, S. Sirilun, S. Peerajan, K. Chaiyasut y P. Kesika, "Anthocyanin profile and its antioxidant activity of widely used fruits, vegetables, and flowers in Thailand", *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, vol. 9, no. 6, p. 218, 2016.



- [5] J. Liu, H. Zhou, L. Song, Z. Yang, M. Qiu, J. Wang y S. Shi, "Anthocyanins: Promising natural products with diverse pharmacological activities", *Molecules*, vol. 26, no. 13, p. 3807, 2021.
- [6] R. Matera, S. Gabbanini, S. Berretti, R. Amorati, G. R. De Nicola, R. Iori y L. Valgimigli, "Acylated anthocyanins from sprouts of *Raphanus sativus* cv. sango: Isolation, structure elucidation and antioxidant activity", *Food Chemistry*, vol. 166, pp. 397-406, 2015.
- [7] O. Dangles y J. A. Fenger, "The chemical reactivity of anthocyanins and its consequences in food science and Nutrition", *Molecules*, vol. 23, no. 8, p. 1970, 2018.
- [8] H. E. Khoo, A. Azlan, S. T. Tang y S. M. Lim, "Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits", *Food & Nutrition Research*, vol. 61, no. 1, p. 1361779, 2017.
- [9] K. Zhang, L. Yuan, Q. Li, R. Wang y Z. Z. Zhang, "Comparison of the anthocyanins composition of five wine-making grape cultivars cultivated in the wujiaqu area of Xinjiang, China", *OENO One*, vol. 53, no. 3, 2019.
- [10] S. Roy y J. W. Rhim, "Anthocyanin food colorant and its application in pH-responsive color change indicator films", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 61, no. 14, pp. 2297-2325, 2020.
- [11] A. Houghton, I. Appelhagen y C. Martin, "Natural blues: Structure meets function in anthocyanins", *Plants*, vol. 10, no. 4, p. 726, 2021.
- [12] K. Sakata, N. Saito y T. Honda, "Ab initio study of molecular structures and excited states in anthocyanidins", *Tetrahedron*, vol. 62, no. 15, pp. 3721-3731, 2006.
- [13] Y. K. Choong, "Fourier transform infrared and two-dimensional correlation spectroscopy for substance analysis", *Fourier Transforms - High-tech Application and Current Trends*, 2017.
- [14] A. V. Marenich, C. J. Cramer y D. G. Truhlar, "Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions", *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 113, no. 18, pp. 6378-6396, 2009.
- [15] L. Estévez y R. A. Mosquera, "Molecular structure and antioxidant properties of Delphinidin", *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 112, no. 42, pp. 10614-10623, 2008.
- [16] R. Guzmán, C. Santiago y M. Sánchez, "A density functional study of antioxidant properties on anthocyanidins", *Journal of Molecular Structure*, vol. 935, no. 1-3, pp. 110-114, 2009.
- [17] A. C. Kumoro, D. S. Retnowati y C. S. Budiyati, "Solubility of delphinidin in water and various organic solvents between (298.15 and 343.15) K", *Journal of Chemical & Engineering Data*, vol. 55, no. 7, pp. 2603-2606, 2010.
- [18] N. Tena, J. Martín y A. G. Asuero, "State of the art of anthocyanins: Antioxidant activity, sources, bioavailability, and therapeutic effect in human health", *Antioxidants*, vol. 9, no. 5, p. 451, 2020.

