

PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

**Evaluación de la bixina como matriz MALDI para el análisis de pigmentos naturales**

**Juan Esteban León Jaimes**

**Trabajo de Grado para Optar al Título de Químico**

**Directora**

**Marianny Yajaira Combariza Montañez**

**Química, Ph.D.**

**Codirector**

**Luis Miguel Díaz Sánchez**

**Químico, M.Sc.**

**Universidad Industrial de Santander**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela de Química**

**Bucaramanga**

**2022**

**Dedicatoria**

*A mis padres porque cada día me aconsejaron y apoyaron durante el transcurso de la  
carrera.*

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

### **Agradecimientos**

Agradezco a la Universidad Industrial de Santander por brindarme la oportunidad de estudiar y prestar sus establecimientos para enriquecer mi conocimiento científico. Asimismo, agradezco al grupo de investigación GIFTEX, especialmente a la profesora Marianny Combariza y Luis Miguel Díaz, por su entrega, paciencia, tiempo dedicado, orientación y conocimientos compartidos con el fin de que este proyecto de investigación se llevara a cabo satisfactoriamente.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio, por sus conocimientos compartidos y experiencias vividas para la resolución de problemas que a diario se presentaban.

Agradezco a mis padres, Martha y John, por su apoyo incondicional mientras cursé la carrera. A mi primo, Jefersson, por sus constantes consejos y “empuje” para aspirar a mayores estudios, ponencias y participaciones en diversos congresos. A Danna, por sus recomendaciones cada que podía para mejorar en el ámbito tanto profesional, como ético y personal. Y a mis mascotas Zeus y Bailey, por brindarme su constante amor y lealtad.

**Tabla de Contenido**

	<b>Pág.</b>
Introducción .....	17
2. Objetivos .....	19
2.1 Objetivo General .....	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
3. Marco referencial .....	20
3.1 Espectrometría de masas .....	20
3.2 Ionización/Desorción Láser .....	21
3.3 Ionización/Desorción Láser Asistida por una Matriz .....	22
3.3.1 Formación de iones primarios. Ionización multifotónica directa (MPI).....	23
3.3.2 Formación de iones primarios. Modelos multicéntricos y agrupación de energía .....	24
3.3.3 Formación de iones secundarios. Transferencia electrónica (ET) .....	25
3.3.4 Formación de iones secundarios. Transferencia protónica (PT).....	26
3.3.5 Formación de iones secundarios. Transferencia catiónica (CT).....	27
3.4 Matrices MALDI .....	27
3.5 <i>Bixa orellana</i> L. ....	31
3.6 Pigmento natural: bixina .....	34
3.7 Triacilglicéridos, clorofilas y carotenoides.....	44
3.8 Antecedentes .....	48
4. Metodología .....	55
4.1 Aislamiento y caracterización de <i>cis</i> -bixina presente en las semillas de <i>Bixa orellana</i> .....	55
4.1.1 Extracción de <i>cis</i> -bixina a partir de las semillas de la planta <i>B. orellana</i> .....	55

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

4.1.2 Caracterización del pigmento bixina .....	57
4.2 Preparación de la muestra en la evaluación de <i>cis</i> -bixina como matriz MALDI para el análisis de triacilglicéridos, xantofilas y clorofilas.....	60
5. Discusión de resultados.....	64
5.1 Aislamiento de <i>cis</i> -bixina presente en las semillas de <i>Bixa orellana</i> . ....	64
5.2 Caracterización espectroscópica de la bixina presente en las semillas de <i>Bixa orellana</i> .....	71
5.2.1 Espectroscopía UV-Vis.....	71
5.2.2 Espectroscopía de reflectancia difusa .....	77
5.2.3 Rendimiento cuántico de fluorescencia (FQY).....	79
5.2.4 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR) .....	84
5.2.5 Espectrometría de masas LDI .....	86
5.3 Evaluación de <i>cis</i> -bixina como matriz MALDI para el análisis de triacilglicéridos, xantofilas y clorofilas. ....	96
5.3.1 Identificación de triacilglicéridos usando DHB como matriz MALDI. ....	96
5.3.2 Identificación de triacilglicéridos usando <i>cis</i> -bixina como matriz MALDI. ....	101
5.3.3 Desorción de <i>cis</i> -bixina con ayuda de matrices MALDI ET.....	104
5.3.4 Comportamiento de los APD en la identificación de triacilglicéridos. ....	108
5.3.5 Identificación de triacilglicéridos, xantofilas y clorofilas usando <i>cis</i> -bixina:APD como matriz MALDI. ....	111
6. Conclusiones.....	123
7. Recomendaciones .....	124
Referencias Bibliográficas .....	125
Anexos .....	139

### Lista de Tablas

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Condiciones de la preparación de la muestra para la identificación de TAG's, xantofilas y clorofila a. Donde M: <i>cis</i> -bixina, APD: Agente promotor de la desorción y A: analito .....	62
Tabla 2. Señales observadas en el espectro de masas LDI de <i>cis</i> -bixina en modo de ionización positiva, con su respectiva masa experimental, masa calculada, exactitud relativa en la masa, S/N y patrón isotópico.....	89
Tabla 3. Señales observadas en el espectro de masas LDI de <i>cis</i> -bixina en modo de ionización negativa, con su respectiva masa experimental, masa calculada, exactitud relativa en la masa, S/N y patrón isotópico.....	93
Tabla 4. Señales observadas en el espectro de masas LDI de <i>cis</i> -bixina como aducto de sodio por la adición de una solución de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> en metanol, con su respectiva masa experimental, masa calculada, exactitud relativa en la masa y S/N.....	96
Tabla 5. Identificación de triacilglicéridos como aductos de sodio en aceites de sachá inchi, girasol y oliva, usando DHB como matriz, con su respectiva masa experimental, masa calculada, exactitud relativa en la masa y S/N. Donde P: C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> , Ln: C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub> , L: C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> , Po: C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub> , O: C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> , S: C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> , A: C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> .....	99
Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas de los APD's comparadas con <i>cis</i> -bixina, cuyos valores fueron tomados de Goldfarb & Suuberg, 2010; Lu, 2018; PubChem, 2021b; Society, 2021 y Tokyo Chemical Industry, 2021 .....	105

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

Tabla 7. Evaluación del comportamiento de <i>cis</i> -bixina en el proceso de desorción bajo condiciones MALDI usando DCTB y antraceno como APD's. Los valores obtenidos corresponden a la señal de interés, C <sub>25</sub> H <sub>29</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>4</sub> , los cuales se reportan junto a la masa calculada, exactitud relativa en la masa, S/N y patrón isotópico .....	107
Tabla 8. Identificación de triacilglicéridos como aductos de sodio en aceites de girasol y oliva, usando DCTB como matriz, con su respectiva masa experimental, masa calculada, exactitud relativa en la masa y S/N .....	111
Tabla 9. Identificación de triacilglicéridos como aductos de sodio en aceites de girasol, usando <i>cis</i> -bixina:APD como matriz, con su respectiva masa experimental, masa calculada, exactitud relativa en la masa y S/N .....	113

## Lista de Figuras

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Mecanismo de formación de iones primarios bajo el modelo de Dinámica Física y Química Acoplada (CPCD), en el marco de Modelos multicéntricos y agrupación de energía...	25
Figura 2. Estructura química de matrices MALDI comerciales (UV e IR) comúnmente usadas para el análisis de compuestos de alto y mediano peso molecular, lábiles y termoinestables.....	29
Figura 3. Variedades de la planta <i>Bixa orellana</i> L. Tomado y modificado de (Dressler & Schmidt, 2014) .....	33
Figura 4. Planta <i>Bixa orellana</i> con especificación de la composición de las semillas. Tomado y modificado de Akula & Rao Pamidighantam, 2003 y Vilar et al., 2014 .....	35
Figura 5. Estructura química de los isómeros <i>trans</i> - (A) y <i>cis</i> - (C) bixina (C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub> ) e isómeros <i>trans</i> - (B) y <i>cis</i> - (D) norbixina (C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub> ) .....	36
Figura 6. Compuestos presentes en las semillas de <i>B. orellana</i> L.....	38
Figura 7. Estructura química del isopreno, C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> .....	39
Figura 8. Pasos involucrados en la biosíntesis de bixina, C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub> .....	41
Figura 9. Estructura química del glicerol y ácidos grasos presentes en aceite de oliva, girasol y sachá inchi.....	45
Figura 10. Estructura química de clorofilas y xantofilas representativas .....	46
Figura 11. Publicaciones científicas de bixina en espectrometría de masas .....	49
Figura 12. Estructura química de la curcumina, C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub> .....	53
Figura 13. Portamuestra con 5 mg de <i>cis</i> -bixina depositada en un fondo de BaSO <sub>4</sub> para análisis por reflectancia difusa.....	58

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

Figura 14. Resultados del proceso SFE con obtención de dos productos, aceite de semilla y semillas desengrasadas.....	65
Figura 15. Resultados del proceso UAE con obtención de dos productos, semillas decoloradas y un extracto rico en <i>cis</i> -bixina, en donde <i>n</i> , corresponde al ciclo de extracción y <i>m</i> , al número de experimentos. Asimismo, se muestra una TLC evidenciando algunos de los compuestos extraídos .....	66
Figura 16. Masa extraída de las semillas <i>B. orellana</i> usando EtOAc como solvente, con un total de 10 extractos y obteniendo un rendimiento de extracción igual a $11.41 \pm 0.02\%$ .....	68
Figura 17. Resultados del proceso SPE, en el que las impurezas primero fueron eluidas y seguidamente el compuesto de interés, el cual se confirmó su purificación por análisis HPLC..	69
Figura 18. Resultados del análisis por HPLC para la elución de <i>cis</i> -bixina del cartucho SAX. El análisis se hizo en fase reversa, usado C <sub>18</sub> (4,6 × 250 mm, 5 μm) como fase estacionaria, ACN como fase móvil y detector UV con $\lambda = 457 \text{ nm}$ .....	71
Figura 19. Espectro UV-Vis de <i>cis</i> -bixina en CHCl <sub>3</sub> en un rango de 300 a 600 nm. Dos bandas principales son observadas, una correspondiente a la transición fuertemente permitida S <sub>0</sub> → S <sub>2</sub> y la otra, correspondiente al pico ' <i>cis</i> ' S <sub>0</sub> → S <sub>1</sub> .....	72
Figura 20. Transiciones electrónicas en <i>cis</i> -bixina. Se muestra un resumen de los procesos involucrados en las transiciones S <sub>0</sub> → S <sub>1</sub> y S <sub>0</sub> → S <sub>2</sub> . Tomado y modificado de Fiedor et al., 2016, 2019.....	74
Figura 21. Cálculo del coeficiente de absortividad molar para <i>cis</i> -bixina a $\lambda = 355 \text{ nm}$ , obteniendo un valor igual a $32818 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .....	76
Figura 22. Espectro UV-Vis de reflectancia difusa para <i>cis</i> -bixina en un rango de 300 a 800 nm .....	78

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

- Figura 23. Espectros de fluorescencia para las soluciones (0,6 a 3  $\mu\text{M}$ ) de antraceno en etanol y *cis*-bixina en diclorometano ..... 80
- Figura 24. Posibles mecanismos de relajación, principalmente por conversión interna, para el compuesto de interés, *cis*-bixina. Tomado y modificado de Tomáš Polívka & Sundström, 2009. .... 82
- Figura 25. Espectro FT-IR para *cis*-bixina en un rango de 4000 a 700  $\text{cm}^{-1}$ . En donde  $\nu$ : estiramiento;  $\delta$ : tensión en el plano;  $\gamma$ : flexión fuera del plano; vs: Intensidad muy fuerte (81-100%); s: intensidad fuerte (61-80%); m: intensidad media (41-60%); w: intensidad baja (21-40%) y vw: intensidad muy baja (0-20%) ..... 85
- Figura 26. Espectro de masas LDI en modo de iones positivo para *cis*-bixina 2,5mM en un rango  $m/z$  de 0 a 1200, una incidencia del láser igual a 50  $\mu\text{J}$  y un volumen igual a 1 $\mu\text{L}$  depositado sobre el target MALDI. Los acercamientos corresponden a los patrones isotópicos de la señal más abundante y el aducto de sodio (a). Asimismo, patrón de fragmentación para *cis*-bixina en modo de ionización positiva (b) ..... 87
- Figura 27. Espectro de masas LDI en modo de iones negativo para *cis*-bixina 2,5mM en un rango  $m/z$  de 0 a 1200, una incidencia del láser igual a 50  $\mu\text{J}$  y un volumen igual a 1 $\mu\text{L}$  depositado sobre el target MALDI. Los acercamientos corresponden a los patrones isotópicos de las señales más abundantes (a). Asimismo, patrón de fragmentación para *cis*-bixina en modo de ionización negativa (b) ..... 91
- Figura 28. Espectro de masas LDI en modo de iones positivo para *cis*-bixina 2,5mM mezclada en igual proporción con una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2,5 mM en MeOH, en un rango  $m/z$  de 0 a 1200, una incidencia del láser igual a 50  $\mu\text{J}$  y un volumen igual a 1 $\mu\text{L}$  depositado sobre el target MALDI.

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

Los acercamientos corresponden a la presencia de iones metaestables y patrones isotópicos de las señales discutidas en el texto .....	94
Figura 29. Espectros de masas obtenidos en modo de iones positivo para la identificación de triacilglicéridos en aceites de sachá inchi (recuadro azul), girasol (recuadro naranja) y oliva (recuadro verde), con su respectiva abundancia calculada y usando DHB 0.13M como matriz MALDI en una relación molar estándar (A:M 1:3000) .....	97
Figura 30. Espectros de masas obtenidos en modo de iones positivo, usando <i>cis</i> -bixina 2.5mM como matriz MALDI para la identificación de triacilglicéridos en aceites de sachá inchi (verde), girasol (naranja) y oliva (azul) .....	102
Figura 31. Espectros de masas obtenidos en modo de iones positivo, usando <i>cis</i> -bixina 2.5mM con APD's 2,5mM en relaciones molares M:APD 1:1, 1:100 y 1:100, con el fin de evaluar el comportamiento de <i>cis</i> -bixina en el proceso de desorción bajo condiciones MALDI. Las tablas de abundancias corresponden a <i>cis</i> -bixina cationizada, $C_{25}H_{29}Na_2O_4$ .....	106
Figura 32. Espectros de masas obtenidos en modo de iones positivo, usando cada uno de los analitos con APD's 2,5mM en relaciones molares A:APD 1:1 y 1:100 para antraceno y DCTB, respectivamente.....	109
Figura 33. Espectros de masas obtenidos en modo de iones positivo para la identificación de triacilglicéridos como aductos de sodio en el aceite de girasol, usando <i>cis</i> -bixina:APD como matriz MALDI en una relación molar con el analito A:APD:M 1:10000:100, 1:100000:1000 y 1:100000:10000 para DCTB y 1:100:100, 1:1000:1000 y 1:10000:10000 para antraceno.....	112
Figura 34. Resumen de los TAG's presentes en el aceite de girasol detectados como aductos de sodio $[M+Na]^+$ utilizando <i>cis</i> -bixina:APD bajo la mejor proporción (A:M 1:10000 y 1:1000 para DCTB y antraceno respectivamente) y DHB, como matrices MALDI .....	117

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

**Abreviaturas y Acrónimos**

ANT	<i>Anthracene</i> (matriz MALDI antraceno)
APD	Agente Promotor de la Desorción
CHCA	<i>α-Cyano-4-hydroxy-cinnamic acid</i> (matriz MALDI ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico)
CI	<i>Chemical Ionization</i> (Ionización Química)
CNPV	<i>Cyanophenylene vinylenes</i> (matriz MALDI cianofenilenvinilenos)
DAN	<i>1,5-Diaminonaphthalene</i> (matriz MALDI 1,5-Diaminonaftaleno)
DCTB	<i>trans-2-[3-(4-tert-butylphenyl)-2-methyl-2-propenylidene] malononitrile</i> (matriz MALDI 2-[(2E)-3-(4-terc-butilfenil)-2-metilprop-2-eniliden] malonitrilo)
DHB	<i>2,5-Dihydroxybenzoic acid</i> (matriz MALDI ácido 2,5-dihidroxibenzoico)
DMAPP	Difosfato de dimetilalilo
DP-ANT	<i>9,10-Diphenylanthracene</i> (matriz MALDI 9,10-difenilantraceno)
EI	<i>Electron Ionization</i> (Ionización electrónica)
E <sub>i</sub>	Energía de ionización
Er: YAG	<i>Erbium- Doped Yttrium Aluminum Garnet Laser</i>
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionización por electronebulización)
FAB	<i>Fast Atom Bombardment</i> (Bombardeo con átomos acelerados)
FD	<i>Field Desorption</i> (Desorción por campo)
FI	<i>Field Ionization</i> (Ionización por campo)

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

FPP	Difosfato de farnesilo
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> (Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier)
GGPP	Difosfato de geranil geranilo
GIFTEX	Grupo de Investigación en Fisicoquímica Teórica y Experimental
GPP	Difosfato de geranilo
HPA	<i>3-Hydroxypicolinic acid</i> (matriz MALDI ácido 3-hidroxipicolínico)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficacia)
IPP	Difosfato de isopentilo
LDI	<i>Laser Desorption/Ionization</i> (Ionización/desorción con láser)
MEP	Fosfato de metileritrilo
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i> (Ionización/desorción con láser asistida por matriz)
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas)
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas tándem)
MSPD	<i>Matrix Solid Phase Dispersion</i> (Matriz de dispersión en fase sólida)
$m/z$	Relación masa/carga
NA	<i>Nicotinic acid</i> (matriz MALDI ácido nicotínico)
Nd: YAG	<i>Neodymium-Doped Yttrium Aluminum Garnet Laser</i>
PDMS	<i>Plasma Desorption</i> (Desorción plásmica)
PI	<i>Photoionization</i> (Fotoionización)

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

SA	<i>3,5-Dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid</i> (matriz MALDI ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico)
SEP	Superficie de Energía Potencial
SFE	<i>Supercritic-Fluid Extraction</i> (Extracción con fluido supercrítico)
SPE	<i>Solid-Phase Extraction</i> (Extracción en fase sólida)
TAG	Triacilglicéridos
TER	<i>2,2':5',2''-tertiophene</i> (matriz MALDI 2,2':5',2''-tertiofeno)
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i> (Cromatografía en capa fina)
UAE	<i>Ultrasound-Assisted Extraction</i> (Extracción con solvente asistida por ultrasonido)
UV-Vis	<i>Ultraviolet Visible Spectroscopy</i> (Espectroscopía Ultravioleta-Visible)

## Resumen

**Título:** Evaluación de la bixina como matriz MALDI para el análisis de pigmentos naturales\*

**Autor:** Juan Esteban León Jaimes\*\*

**Palabras Clave:** *cis*-bixina, matriz, Espectrometría de masas, MALDI.

### Descripción:

La *cis*-Bixina (hidrógeno-(9'Z)-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato de metilo) es un apocarotenoide presente en la cubierta externa de las semillas de *Bixa orellana*. Siendo un pigmento altamente conjugado, presenta una absorptividad molar alta ( $32818 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) y bandas de absorción a 430, 457, 487 y 355 nm (característica de la conformación *cis*-). Su extracción implicó el uso de tres técnicas: Extracción con Fluido Supercrítico (SFE), Extracción con solvente asistida por Ultrasonido (UAE) y Extracción en Fase Sólida (SPE). La extracción SFE se hizo con el fin de desgrasar y/o eliminar compuestos adheridos fuertemente a la capa lipídica de la semilla, como carotenoides y terpenoides (incluyendo *trans*-bixina). Por otra parte, UAE y SPE se utilizaron para extraer el compuesto de interés (soluble en solventes orgánicos) y purificarlo usando una resina de intercambio aniónico (SAX). Diferentes técnicas analíticas fueron empleadas para la caracterización de *cis*-bixina, entre ellas, DRS, FT-IR y LDI MS, las cuales confirmaron su aislamiento y purificación. Asimismo, en el análisis por HPLC-UV/Vis se observó un solo pico con un  $t_R = 3,8$  min. Por otra parte, el bajo rendimiento cuántico de fluorescencia, ( $\Phi_{cis\text{-Bixina}} = 0,02$ ) mostró que su relajación principalmente no es radiativa. Asimismo, en los ensayos LDI no se observa formación de cationes radicales de *cis*-bixina, sino aductos de sodio  $[M+Na]^+$ , donde el descriptor analítico S/N se puede aumentar agregando iones  $Na^+$ . Con el fin de estudiar el comportamiento de *cis*-bixina en fase gaseosa y su desempeño analítico como matriz MALDI, se llevaron a cabo ensayos con triacilglicéridos, xantofilas y clorofilas como analitos. Se observó que se requiere de un agente promotor de la desorción (APD) como antraceno o DCTB para hacer posible su función como matriz MALDI de transferencia catiónica. El análisis fue satisfactorio usando antraceno como APD y triacilglicéridos de aceites comerciales (girasol, oliva y sacha inchi) como analitos, los cuales probablemente tienen afinidades catiónicas mayores que *cis*-bixina.

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Marianny Yajaira Combariza Montañez, Química, Ph.D. Codirector: Luis Miguel Díaz Sánchez. Químico, M.Sc.

**Abstract**

**Title:** Evaluation of bixin as a MALDI matrix for the analysis of natural pigments\*

**Author:** Juan Esteban León Jaimes\*\*

**Key Words:** *cis*-bixin, matrix, Mass Spectrometry, MALDI.

**Description:**

*cis*-Bixin (hydrogen-(9'Z)-6,6'-diapocarotene-6,6'-methyl dioate) is an apocarotenoid present in the outer coat of Bixa orellana seeds. Being a highly conjugated pigment, it has a high molar absorptivity ( $32818 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) and absorption bands at 430, 457, 487 and 355 nm (characteristic of the *cis*-conformation). Its extraction involved the use of three techniques: Supercritical Fluid Extraction (SFE), Ultrasonic Assisted Solvent Extraction (UAE) and Solid Phase Extraction (SPE). The SFE extraction was done to defat and/or eliminate compounds strongly adhered to the lipid layer of the seed, such as carotenoids and terpenoids (including *trans*-bixin). On the other hand, UAE and SPE were used to extract the compound of interest (soluble in organic solvents) and purify it using an anion exchange resin (SAX). Different analytical techniques were used for the characterization of *cis*-bixin, including DRS, FT-IR and LDI MS, which confirmed its isolation and purification. Likewise, in the HPLC-UV/Vis analysis, a single peak with a  $t_R = 3.8$  min was observed. On the other hand, the low fluorescence quantum yield, ( $\Phi_{cis\text{-Bixin}} = 0.02$ ) showed that its relaxation is mainly non-radiative. Likewise, in the LDI assays, the formation of *cis*-bixin radical cations is not observed, but sodium adducts  $[M+Na]^+$ , where the analytical descriptor S/N can be increased by adding  $Na^+$  ions. In order to study the behavior of *cis*-bixin in the gas phase and its analytical performance as a MALDI matrix, tests with triacylglycerides, xanthophylls and chlorophylls as analytes were carried out. It was observed that a desorption promoting agent (DPA) such as anthracene or DCTB is required to enable its function as a MALDI cation transfer matrix. The analysis was successful using anthracene as DPA and triacylglycerides from commercial oils (sunflower, olive and sacha inchi) as analytes, which probably have higher cationic affinities than *cis*-bixin.

---

\* Degree Work

\*\* Science Faculty. Chemistry school. Director: Marianny Yajaira Combariza Montañez, Chemical, Ph.D. Codirector: Luis Miguel Díaz Sánchez. Chemical, M.Sc.

## Introducción

Los pigmentos de tipo clorofila y carotenoide han sido objeto de estudios científicos a nivel mundial debido a sus variadas propiedades biológicas y funciones a nivel celular. El análisis de estos compuestos continúa siendo el objetivo principal de muchas investigaciones, aun así, y debido a su labilidad y termoinestabilidad, se requieren de técnicas suaves para su análisis. En espectrometría de masas, la técnica de ionización MALDI garantiza la sobrevivencia de los iones moleculares de estos importantes pigmentos lábiles. En el proceso de Desorción/Ionización Láser Asistida por una Matriz (MALDI, por sus siglas en inglés) se utiliza un compuesto orgánico denominado matriz, que absorbe la radiación proveniente de la fuente láser para finalmente formar iones moleculares o aductos del compuesto de interés.

Existen diversas matrices en MALDI MS; a saber: líquidas, sólidas y de dos fases (líquida-sólida). Asimismo, las matrices pueden clasificarse de acuerdo con la absorción de radiación electromagnética (UV e IR). Las matrices UV MALDI son típicamente compuestos orgánicos aromáticos con estructuras moleculares que permiten la absorción eficiente de la energía proveniente del láser, (en el caso particular del láser Nd:YAG,  $\lambda = 355$  nm). El proceso de transferencia de carga más utilizado en MALDI es el de protonación del analito,  $[M + H]^+$ . Sin embargo, existen sustancias sin la capacidad de aceptar o ceder protones, *i.e.*, que no tienen sitios ácidos y/o básicos que favorezcan termodinámicamente el proceso. En estos casos, el empleo de estrategias alternativas de adquisición de carga por parte del analito, como por ejemplo la transferencia electrónica y/o catiónica se convierten en opciones viables. No obstante, las matrices comerciales ampliamente utilizadas para el análisis de compuesto termolábiles, termoinestables y de alto peso molecular, en algunos casos reaccionan con el analito y no son estables en el vacío,

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

razón por la cual se hace interesante la búsqueda y el estudio de nuevos compuestos que funcionen como matriz MALDI para promover exitosamente los procesos de transferencia de carga, ya sea electrónica, protónica o catiónica en fase gaseosa.

El Grupo de Investigación en Físicoquímica Teórica y Experimental, GIFTEX, de la Universidad Industrial de Santander-UIS, ha reportado la síntesis y evaluación de matrices MALDI-ET basadas en  $\alpha$ -cianofenilvinileno ( $\alpha$ -CNPVs) y fluorenos (FL) (Castellanos-García et al., 2017; Giraldo-Dávila et al., 2018; Ramírez-Pradilla et al., 2019) con mejor desempeño analítico hacia ciertos grupos de compuestos (complejos organometálicos y pigmentos) que los reportados con matrices de transferencia electrónica (ET) ya establecidas comercialmente como DCTB. Por otra parte, algunos reportes científicos han demostrado que moléculas aisladas de fuentes naturales, con estructuras altamente conjugadas como la curcumina, funcionan como matrices MALDI multipropósito (S Francese et al., 2013). En este proyecto de investigación se demostró que, *cis*-bixina, un apocarotenoide -éster monométílico dicarboxílico- presente en las semillas de achiote (*Bixa orellana* L.) compuesto por un esqueleto poliénico con 9 enlaces dobles conjugados, funciona como matriz MALDI de transferencia catiónica para el análisis de triacilglicéridos presentes en aceite de girasol. Sin embargo, se encontró que la transferencia de carga se hace efectiva haciendo uso de agentes promotores de la desorción, los cuales disminuyen las interacciones intermoleculares del compuesto de interés y ayudan con el proceso de desorción en MALDI. No obstante, se sugiere derivatizar el pigmento, a fin de evaluar directamente derivados de *cis*-bixina como matrices MALDI con características como buena solubilidad, alta absorptividad molar UV, alta presión de vapor, sin reacción con el analito, y estable en el vacío para analizar compuestos lábiles y termoinestables de alto peso molecular.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo General**

Evaluar el desempeño analítico de la bixina como matriz MALDI para el análisis de compuestos lábiles de tipo clorofila y carotenoide.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Aislar y caracterizar fisicoquímica y espectroscópicamente el apocarotenoide bixina a partir de las semillas de *Bixa orellana*.

Evaluar la bixina como matriz MALDI para el análisis de pigmentos tipo clorofila y carotenoide.

### 3. Marco referencial

#### 3.1 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica cualitativa y cuantitativa que permite caracterizar estructuralmente compuestos orgánicos e inorgánicos. MS puede ser empleada para determinar pesos moleculares y composición porcentual de compuestos de interés, como estructuras bioorgánicas y mezclas complejas (Zagorevskii, 2016). El principio básico de la MS consiste en generar iones del compuesto de interés -ya sea átomos o moléculas- en fase gaseosa. Luego, los iones se separan en el analizador de acuerdo con su relación masa/carga ( $m/z$ ) mediante campos eléctricos, magnéticos -ya sea estáticos o dinámicos- e incluso en regiones libres de campo. Finalmente, los iones separados se detectan y se procesa la información. La generación de estos iones puede llevarse a cabo mediante interacciones de la muestra con electrones, fotones, átomos neutros energéticos, átomos excitados electrónicamente, iones masivos de racimo y microgotas cargadas electrostáticamente (Gross, 2017). Adicionalmente, en ensayos MS/MS se puede llevar a cabo fragmentación controlada de iones de interés, lo que permite corroborar la identidad de los compuestos. Por medio de la MS es posible medir la masa molecular con alta exactitud, determinar composición elemental, patrón de fragmentación y grupos funcionales del analito *target*. MS es una técnica analítica muy sensible y versátil, con la capacidad de dar respuesta a compuestos en cantidades de attomoles ( $10^{-18}$  moles) y femtomoles ( $10^{-15}$  moles). Además, permite analizar muestras volátiles, no volátiles, polares, no polares, sólidos, líquidos y gases. Cuatro etapas básicas se realizan para hacer un análisis por MS, a saber; 1), introducción de la muestra; 2), ionización de la muestra; 3), separación y análisis de los iones y; 4), adquisición de datos (espectro de masas) (Carmen et al., 2010).

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

Uno de los pasos críticos en espectrometría de masas es la ionización de la muestra, la cual puede estar en fase vapor o fase condensada. Para la fase vapor (en donde la muestra inicialmente se volatiliza y luego se ioniza) se requieren analitos volatilizables y termoestables con pesos moleculares menores que 1000 u, así que los métodos típicos de ionización usados para su análisis son ionización electrónica (EI), ionización química (CI), fotoionización (PI) e ionización por campo (FI). En cambio, para la fase condensada (en donde la muestra se transforma directamente en iones en fase gaseosa) se pueden analizar compuestos no volátiles y térmicamente inestables con pesos moleculares mayores que 100.000 u. Para el análisis de estos analitos se encuentran ionización por electrospray (ESI), bombardeo con átomos acelerados (FAB), desorción plásmica (PDMS), desorción por campo (FD), ionización/desorción con láser (LDI) e ionización/desorción con láser asistida por una matriz (MALDI) como las técnicas más comunes de ionización (Carmen et al., 2010; Stashenko & Martínez, 2009).

### 3.2 Ionización/Desorción Láser

A partir de los años 60's diferentes investigadores han empleado láseres de diferentes longitudes de onda y anchos de pulso con el fin de generar iones -principalmente de moléculas orgánicas- que puedan ser analizados por espectrometría de masas. Los estudios en este campo han avanzado y, en los años 70's se estudió; 1), que la transferencia de energía del láser a la muestra deber ser eficiente y controlable, para ello, el analito *target* debe absorber a la longitud de onda a la que emite el láser y; 2), la energía debe transferirse en muy poco tiempo (1-100 ns) con el fin de evitar descomposición térmica de compuestos lábiles. Ahora bien, una de las mayores ventajas del uso de láseres es que permiten la formación de iones de compuestos de interés en un punto del espacio-tiempo, aun así, posteriores experimentos revelaron un límite que depende de la estructura

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

del analito y los parámetros del láser (Hillenkamp et al., 1991). Los investigadores F. Hillenkamp, M. Karas y sus colaboradores, en sus trabajos con películas de aminoácidos absorbentes de UV, notaron que con el empleo de una matriz sólida o líquida altamente absorbente se pueden analizar moléculas de mayor peso molecular y su ion molecular permanece intacto (Hillenkamp et al., 1991; Zenobi & Knochenmuss, 1998). Comercialmente se han desarrollado diferentes láseres para la ionización/desorción láser (LDI). En la región infrarrojo (IR) se ha empleado CO<sub>2</sub> y Er:YAG, mientras que en la región ultravioleta (UV) se ha empleado N<sub>2</sub> ( $\lambda=337$  nm) y Nd:YAG, ya sea con frecuencia triplicada ( $\lambda = 355$  nm) o cuadruplicada ( $\lambda = 266$  nm). Siendo este último, el más ampliamente utilizado en MALDI, con un foco láser de 10-300  $\mu\text{m}$ , ángulo de incidencia de 30-75° y usando un atenuador para ajustar la irradiancia del láser (Gross, 2017; Hillenkamp et al., 1991; Zenobi & Knochenmuss, 1998).

### 3.3 Ionización/Desorción Láser Asistida por una Matriz

Como se mencionó anteriormente, en espectrometría de masas, la etapa de ionización de la muestra es crucial para el análisis, *i.e.*, que la elección de la fuente de ionización se debe realizar dependiendo de la naturaleza la muestra y la información que se desea obtener. Si el objetivo principal es la supervivencia del ion molecular, la fuente de ionización debe ser suave y entre las más utilizadas están *Electrospray Ionization* (ESI) y *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI). Esta última es una de las técnicas de ionización más utilizadas en MS para el análisis de biomoléculas con altos pesos moleculares no volátiles como péptidos, proteínas, pigmentos, porfirinas, oligonucleótidos, oligosacáridos, y polímeros sintéticos de alto peso molecular (Giraldo-Dávila et al., 2018; Wyatt et al., 2010; Zenobi & Knochenmuss, 1998). Como su nombre lo indica, se necesita de una matriz que tiene un papel fundamental, debe absorber los fotones de

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

energía provenientes de la fuente láser y a su vez debe actuar como un disolvente del analito *target* de manera que reduzca las fuerzas intermoleculares entre las moléculas del analito. Para ello, la matriz debe tener una fuerte absorción de la radiación a la longitud de emisión del láser, y tener una baja temperatura de sublimación o alta presión de vapor (Gross, 2017; Gómez & González, 2010).

MALDI se clasifica como una técnica de ionización suave donde el analito se co-cristaliza junto con un compuesto orgánico denominado matriz, que se encuentra en proporción mayor, típicamente, 1000:1, 10000:1, 100000:1 Matriz (M):Analito (A). La matriz MALDI absorbe la energía proveniente del láser ( $10^6 \text{ Wcm}^{-2}$ ), se ioniza y permite la ionización del analito, ya sea por formación de aductos (CT), por transferencia protónica (PT) o electrónica (ET).

Se han propuesto varios mecanismos para la formación de iones del analito *target* en MALDI. Para la formación de iones primarios se han propuesto: ionización multifotónica directa, modelos multicéntricos y agrupación de energía, transferencia de protones en estado excitado, reacciones de desproporción, desorción de iones preformados, ionización térmica y pulsos de presión, espalación y choques (Zenobi & Knochenmuss, 1998). Por otro lado, para la formación de iones secundarios se han propuesto: transferencia protónica en fase gaseosa, cationización en fase gaseosa, transferencia electrónica y compensación de carga (Zenobi & Knochenmuss, 1998).

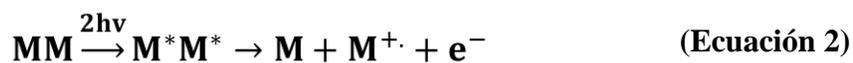
### **3.3.1 Formación de iones primarios. Ionización multifotónica directa (MPI)**

El material orgánico absorbente, *i.e.*, la matriz (M) recibe fotones directamente de la fuente láser, se excita y permanece en dicho estado por un corto tiempo (nanosegundos). Entonces, M absorbe “n” fotones adicionales hasta superar la energía de ionización,  $E_i$ , con el fin de promover un electrón y producir el catión radical de M (Zenobi & Knochenmuss, 1998).



### 3.3.2 Formación de iones primarios. Modelos multicéntricos y agrupación de energía

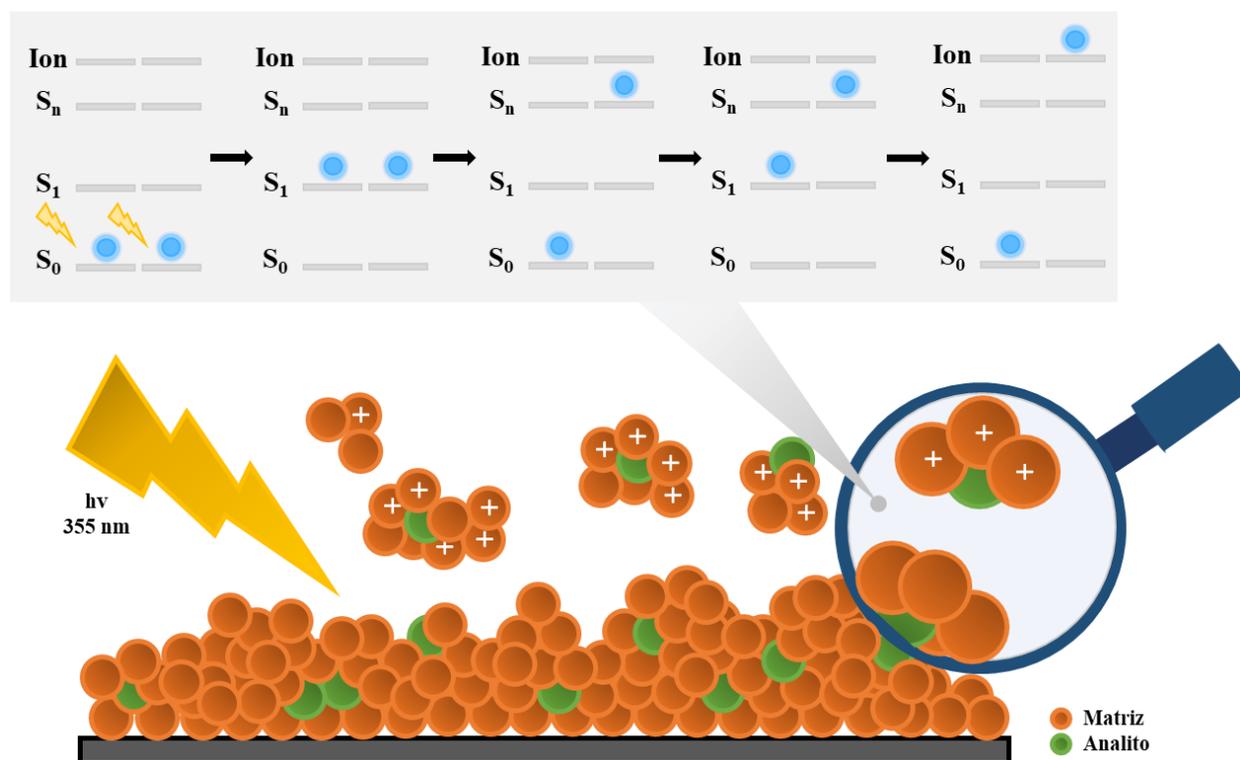
Dos o más moléculas M ya excitadas agrupan su energía con el fin de producir el catión radical de la matriz, en donde una molécula M cercana a la molécula M excitada ( $M^*$ ) se excita en vez de que la molécula  $M^*$  reciba un fotón adicional. Así pues, la energía total de las dos moléculas M excitadas, se redistribuye de un estado deslocalizado a uno localizado para disminuir el potencial de ionización de la matriz. De esta manera, los excitones móviles se agrupan dependiendo la densidad electrónica y la temperatura, y permiten que la energía de múltiples fotones provenientes de la fuente láser se transporte y se concentre para formar iones del compuesto de interés bajo el modelo de Dinámica Física y Química Acoplada (CPCD, por sus siglas en inglés) (Knochenmuss, 2016; Zenobi & Knochenmuss, 1998).



Para ello, un fotón interacciona con un electrón en el estado fundamental ( $S_0$ ) de M y salta al primer estado electrónico excitado ( $S_1$ ), de igual manera un segundo fotón interacciona con una molécula M vecina repitiendo el proceso. Seguidamente una de las moléculas M excitadas transfiere su energía a la otra permitiendo que su electrón excitado descienda al estado basal de la molécula, lo anterior se realiza con el fin de que la molécula M excitada que recibe la energía pueda llevar su electrón ya excitado a un estado excitado superior ( $S_n$ ). Finalmente, la molécula estable recibe un fotón adicional y repite el primer paso, de manera que interacciona una molécula en un estado excitado superior con una molécula en el primer estado electrónico excitado para

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

formar un ion (catión-radical) y una molécula en su estado basal (Knochenmuss, 2016), tal como se observa en la **figura 1**.



**Figura 1.** Mecanismo de formación de iones primarios bajo el modelo de Dinámica Física y Química Acoplada (CPCD), en el marco de Modelos multicéntricos y agrupación de energía.

### 3.3.3 Formación de iones secundarios. Transferencia electrónica (ET)

La transferencia electrónica en fase gaseosa se lleva a cabo si y solo si el analito tiene un valor de energía de ionización menor que la matriz MALDI utilizada, *i.e.*, la transferencia

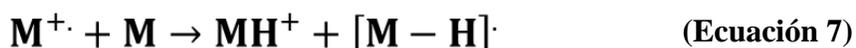
## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

electrónica sea termodinámicamente favorable ( $Ei_{(analito)} < Ei_{(matriz)}$ ). En este caso los iones de la matriz abstraen un electrón del analito neutro -en modo de iones positivos- y no ocurre una fotoionización directa del analito (Hoteling et al., 2006; McCarley et al., 1998; Zenobi & Knochenmuss, 1998). De manera que, dicha transferencia ocurre para moléculas que carecen de sitios protonables en su estructura, quienes en fase gaseosa reaccionan con un ion precursor de la matriz (catión radical).

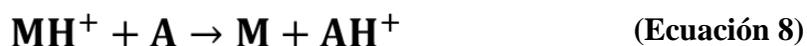


### 3.3.4 Formación de iones secundarios. Transferencia protónica (PT)

La transferencia protónica se lleva a cabo cuando cationes radicales de la matriz (formados previamente) reaccionan con moléculas neutras de la misma que dependiendo su afinidad protónica pueden formar una molécula de la matriz protonada (Zenobi & Knochenmuss, 1998).



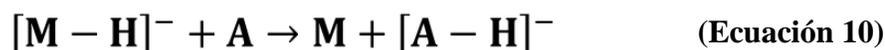
Seguidamente, la matriz protonada reacciona con el analito para transferirle un protón. En donde dicha reacción en fase gaseosa se ve favorecida termodinámicamente en su mayoría porque  $\Delta G < 0$ , y esto a su vez se favorece si el analito contiene sitios básicos que permitan su afinidad por el protón (Zenobi & Knochenmuss, 1998).



Vale la pena resaltar que este tipo de transferencia es posible si la afinidad protónica de la matriz es menor que la afinidad protónica del analito ( $AP_{(matriz)} < AP_{(analito)}$ ). Además, la reacción es exotérmica y esto conlleva a que el analito se fragmente por la liberación de dicha energía y en

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

algunos casos, a que el analito se protone repetidamente (carga múltiple) (Zenobi & Knochenmuss, 1998). Por otro lado, dependiendo la energía requerida para deprotonar la matriz, el analito luego de una reacción de captura de electrones disociativos de la matriz, podría eventualmente protonarse y permanecer como anión (Zenobi & Knochenmuss, 1998).

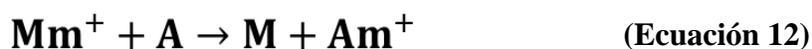


### 3.3.5 Formación de iones secundarios. Transferencia catiónica (CT)

La transferencia catiónica en fase gaseosa se ve influenciada en la preparación de la muestra y se lleva a cabo si el analito tiene una afinidad catiónica mayor que la matriz MALDI utilizada ( $\mathbf{AC}_{(\text{matriz})} < \mathbf{AC}_{(\text{analito})}$ ) Inicialmente, los cationes (m) libres añadidos (provenientes de sales catiónicas) se unen a los cationes radicales de la matriz (formados previamente) para formar aductos de la misma (Zenobi & Knochenmuss, 1998).



Seguidamente, los iones pseudo-moleculares son formados producto de reacciones matriz cationizada-analito teniendo en cuenta las afinidades catiónicas de las especies involucradas (Zenobi & Knochenmuss, 1998).



## 3.4 Matrices MALDI

Existen matrices líquidas, sólidas y dos fases (líquida-sólida). La ventaja de usar las primeras es que puede refrescar su superficie y con ello elimina el fenómeno de “puntos calientes”

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

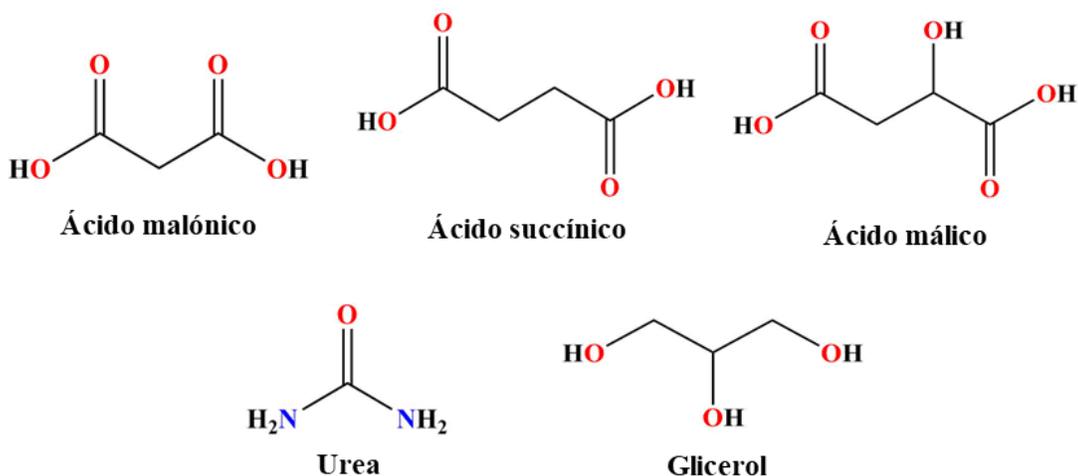
presente en matrices sólidas (Zenobi & Knochenmuss, 1998). Esto es, la formación de cristales no homogéneos en la matriz de manera que el analito presente se encuentra en pocas áreas pequeñas de la misma (Fukuyama, 2015). Dependiendo el rango en el que la matriz absorba radiación electromagnética (que está relacionado con las propiedades fisicoquímicas de la misma), las matrices pueden ser de absorción en la región ultravioleta (UV) o en la región del infrarrojo (IR). Tanaka y sus colaboradores en 1988 emplearon partículas de cobalto muy finas, las mezclaron con la matriz líquida de glicerol y con ello obtuvieron mejores resultados en la generación de iones moleculares de biomoléculas grandes que pudieron ser analizadas por MS (K. Tanaka et al., 1988), a estos tipos de matrices se les denomina matrices de dos fases (Zenobi & Knochenmuss, 1998). Para el caso de matrices UV-MALDI, las moléculas deben tener cromóforos que permitan la absorción de la radiación proveniente del láser en esa región del espectro electromagnético, típicamente estas matrices MALDI presentan estructuras con un núcleo aromático. El ácido nicotínico (NA), ácido picolínico, ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA), ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB), ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (SA), 2-[(2E)-3-(4-*terc*-butilfenil)-2-metilprop-2-eniliden] malonitrilo (DCTB) y ditranol son algunos ejemplos de matrices UV-MALDI (**Figura 2**) usados para analizar pigmentos, péptidos, proteínas, triacilglicerol y polímeros, entre otros. Por otro lado, las matrices IR-MALDI generalmente no tienen núcleos aromáticos en su estructura con el fin de disminuir la energía de absorción. En este tipo de matrices, la energía del haz es suficiente para penetrar con mayor profundidad en la matriz, y con ello, facilitar el proceso de ionización. El ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, urea y glicerol son algunos ejemplos de matrices IR-MALDI (**Figura 2**) para analizar proteínas y biomoléculas (Gross, 2017; Kampmeier et al., 1997).

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

No obstante, las matrices UV-MALDI anteriormente mencionadas a pesar de ser solubles con el analito *target*, tener alta absorptividad molar UV y alta presión de vapor, algunas de ellas reaccionan con el analito y son inestables en el vacío. Razón por la cual, se hace necesaria la búsqueda de nuevas matrices MALDI que solucionen dichos aspectos y se obtengan mejores rendimientos.

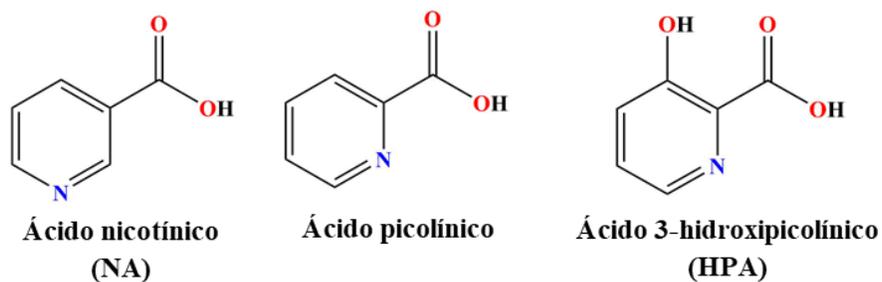
---

### Matrices IR-MALDI

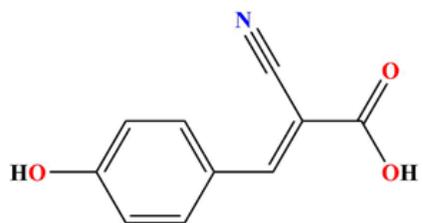



---

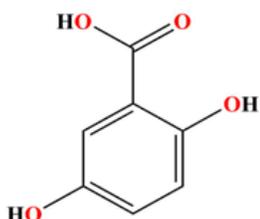
### Matrices UV-MALDI



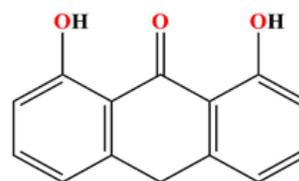
## PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES



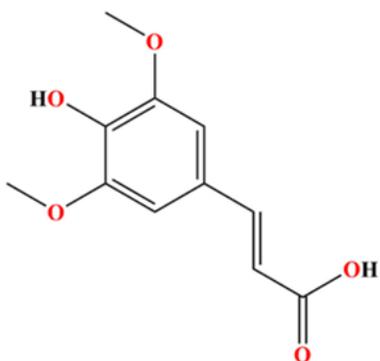
Ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA)



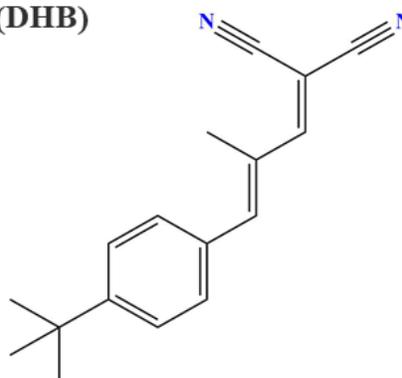
Ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB)



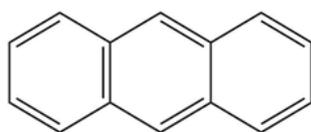
Ditranol



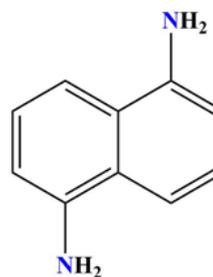
Ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (SA)



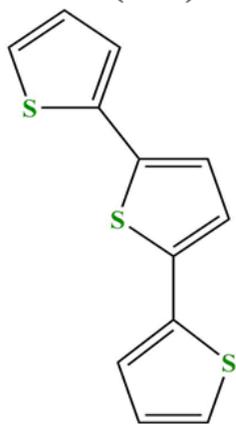
Ácido 2-[(2E)-3-(4-terc-butilfenil)-2-metilprop-2-eniliden] malonitrilo (DCTB)



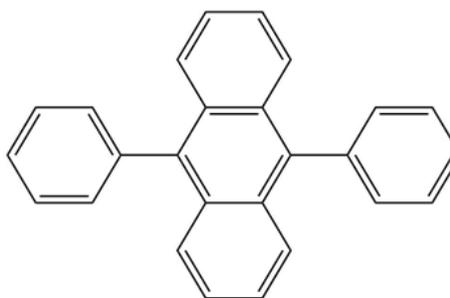
Antraceno (ANT)



1,5-diaminonaftaleno (DAN)



2,2':5',2''-tertiofeno (TER)



9,10-difenilantraceno (DP-ANT)

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

**Figura 2.** Estructura química de matrices MALDI comerciales (UV e IR) comúnmente usadas para el análisis de compuestos de alto y mediano peso molecular, lábiles y termoinestables.

En matrices MALDI la alta absorptividad en la región de emisión del láser (355 nm para el Nd:YAG) se puede traducir en una conjugación extensiva en las moléculas. Los pigmentos naturales en plantas pueden ser de tipo fotoprotectores, accesorios y fotosintéticos, y todos tienen papeles importantes en la cascada de reacciones de fijación de energía lumínica como energía química denominado fotosíntesis. Los pigmentos fotoprotectores como los carotenoides y las ficobiliproteínas funcionan absorbiendo fotones en la región UV-Vis, para luego transferirlos al sistema fotosintético donde se encuentran las clorofilas. Asimismo, los pigmentos fotoprotectores permiten disipar la energía en exceso en los fotosistemas.

Con base en lo anterior, en esta propuesta se investigó el desempeño de *cis*-bixina (un carotenoide) como matriz MALDI, para el análisis de pigmentos tipo clorofila y carotenoide, presentes en extractos de microalgas y lípidos en aceites de sachá inchi, girasol y oliva.

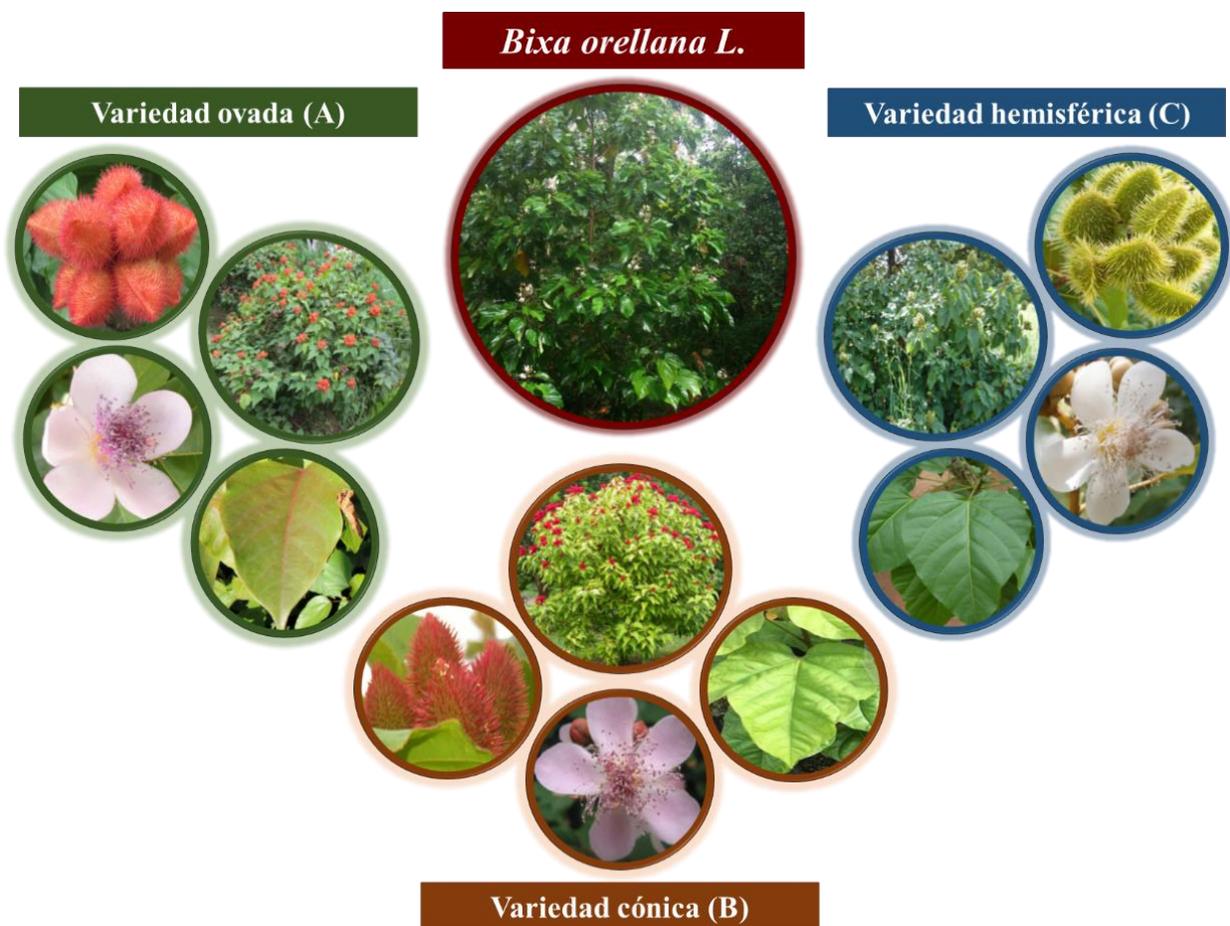
### **3.5 *Bixa orellana* L.**

La planta *Bixa orellana* (**Figura 3**) es un arbusto tropical nativo de Centroamérica y América del Sur. Es una especie ancestral de la familia Bixaceae perteneciente al género *Bixa* (Giridhar, 2014) cuya especie *Bixa urucurana Willd* es considerada como su ancestro (López et al., 2018). Se trata de una especie botánica con la siguiente identificación taxonómica (*ITIS - Report: Bixa Orellana*, 2021):

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

<b>REINO</b>	<b>PLANTAE</b>
<b>Subreino</b>	Viridiplantae
<b>Infrareino</b>	Streptophyta
<b>Superdivisión</b>	Embryophyta
<b>División</b>	Tracheophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Malvales
<b>Familia</b>	Bixaceae
<b>Género</b>	<i>Bixa</i>
<b>Especie</b>	<i>Bixa orellana</i> L

Es un arbusto perenne, leñoso y de polinización cruzada (Romero-López et al., 2019) con copa redondeada y ramificación dicotómica (Flores et al., 1988) cuyo nombre científico se debe a su descubridor Francisco de Orellana (Raddatz-Mota et al., 2017). Tiene una altura de 2-10 m y se compone de un tallo liso y poco fisurado (Flores et al., 1988). Sus hojas son alternas, simples, cordadas, puntiagudas y pecioladas. Sus flores son bisexuales, regulares e hipoginosas con un tipo de inflorescencia cerrada o monotélica, son de tonalidad rosada, morada o blanca, se agrupan en panojas terminales y son pentámeras (corola y cáliz integrado por 5 pétalos y 5 sépalos, respectivamente) (Flores et al., 1988; López et al., 2018). Posee frutos (denominados cachopas (Dias et al., 2011)) en forma de cápsula dehiscente ovalada, cónica o hemisférica. Se agrupan en racimos y su parte más externa se compone de apéndices espinosos, simples y flexibles, largos o cortos (López et al., 2018). En el interior se encuentran semillas ricas con el pigmento de interés - bixina-, son poliédricas de color rojo y cubiertas por arilos pulposos (López et al., 2018).



**Figura 3.** Variedades de la planta *Bixa orellana* L. Tomado y modificado de (Dressler & Schmidt, 2014).

Existen tres variedades fructíferas de *B. orellana* cuya clasificación se hace con relación a la forma del fruto; a saber, variedad ovada (A), cónica (B) y hemisférica (C). Se diferencian entre sí por la coloración de las flores, las hojas y el fruto, el número de frutos por racimo, su tamaño y la cantidad de semillas contenidas en ellos (ver **figura 3**). La **variedad A** consta de flores rosadas, hojas verde claro con venación roja, frutos con el pericarpio y las cerdas de tonalidad roja, un número de frutos medio y mayor contenido de semillas en ellos, por consiguiente, mayor contenido de bixina. Por su parte, la **variedad B** consta de flores violetas, hojas verde claro, frutos de

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

tonalidad variada (rojo, verde, amarillo, marrón) y un número de frutos mayor pero un contenido medio de semillas en ellos. Finalmente, la **variedad C** consta de flores blancas, hojas verde oscuro, frutos con el pericarpio y las cerdas de tonalidad verde, un número de frutos menor y bajo contenido de semillas en ellos, hecho que indica la poca cantidad de bixina presente (Akshatha et al., 2011).

Cabe resaltar que el pigmento bixina, por sus diversas aplicaciones como colorante en la industria de alimentos, belleza y textil, y sus propiedades biodegradables y no tóxicas, incluyendo su actividad antioxidante y antimicrobiana, ha despertado el interés de diversos países a nivel mundial (Stringheta et al., 2018). Por tal razón, en los últimos años se ha venido incrementando la producción de las semillas de *B. orellana*, alcanzando valores de 14500 toneladas de semilla por año (López et al., 2018), siendo América Latina (principalmente Perú, Brasil y México) el mayor productor (60%), seguido por África (27%) y Asia (12%) (Raddatz-Mota et al., 2017).

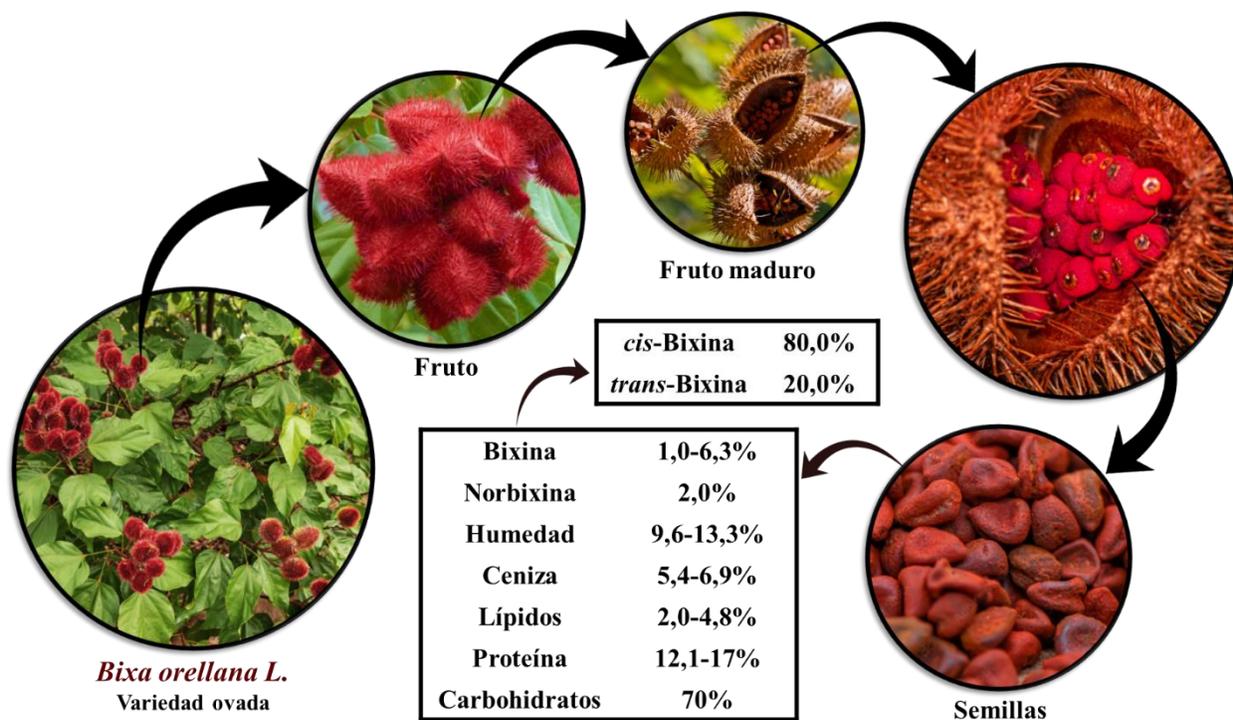
### 3.6 Pigmento natural: bixina

La bixina es un pigmento no tóxico, de olor agradable (dulce) y sabor salino amargo, que presenta isomería geométrica (Scotter, 2009), y se observa en dos coloraciones; a saber, naranja y roja (Giridhar, 2014) para los isómeros *cis*- y *trans*- respectivamente. Como se indicó anteriormente, se encuentra en las semillas del arbusto *B. orellana* L., las cuales se componen principalmente de 1.0-6.3% de bixina, 12.1-17.0% de humedad, 5.4-6.9% de cenizas, 2.0-4.8% de lípidos, 12.1-17.0% de proteínas y 70.0% de carbohidratos (Albuquerque & Meireles, 2012) (ver **Figura 4**).

La bixina, es un apocarotenoide -más específicamente diapocarotenoide- de éster monometílico dicarboxílico presente en la capa superficial de las semillas de las plantas *Crocus*

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

*sativus* (azafrán), *Vitis vinífera* (uva) y *Bixa orellana* (achiote), siendo esta última su principal fuente de obtención (Guaratini et al., 2004; Siva et al., 2010).



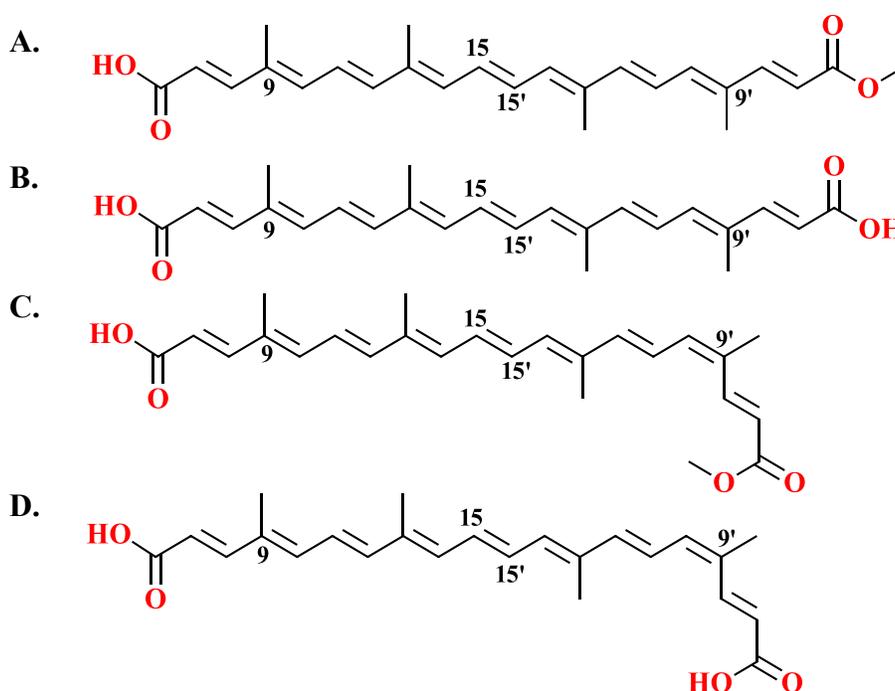
**Figura 4.** Planta *Bixa orellana* con especificación de la composición de las semillas. Tomado y modificado de Akula & Rao Pamidighantam, 2003 y Vilar et al., 2014.

Heiduschka y Panzer en 1917 elucidaron la estructura molecular del apocarotenoide bixina, el cual, en su forma *trans*- tiene 9 dobles enlaces conjugados lineales (Rodríguez-Amaya, 2015) (**Figura 5**), esta estructura actúa como un cromóforo con una longitud máxima de absorción en la región UV-vis del espectro electromagnético. Además, la *trans*-bixina presenta una coloración roja intensa, puede sufrir cambios estructurales debido a la oxidación y es susceptible a isomerización (Barnicoat, 1937; FAO & Additives, 2006; Scotter, 2009). La bixina está clasificada en la categoría de “cromóforos con sistemas conjugados” (Wong, 1989), donde la conjugación le aporta un efecto

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

fotoprotector (Mathews-Roth et al., 1974), *i.e.*, la deslocalización de los electrones en el esqueleto poliénico le confiere propiedades fotofísicas y fotoquímicas, incluida la fotoisomerización (Scotter, 2009).

La extracción de la bixina puede llevarse a cabo en aceite vegetal, con solventes orgánicos, en solución alcalina o con fluido supercrítico, dependiendo el interés del análisis. En el caso de extracción con aceites vegetales y fluido supercrítico, se obtiene un extracto enriquecido con el isómero *trans*-, mientras que utilizando solventes orgánicos se obtiene el isómero *cis*-. Asimismo, mediante la hidrólisis alcalina es posible la transformación de bixina en la sal norbixina (ver **Figura 5**) (Giridhar, 2014; Rodrigues et al., 2014; Taham et al., 2015).



**Figura 5.** Estructura química de los isómeros *trans*- (A) y *cis*- (C) bixina (C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>) e isómeros *trans*- (B) y *cis*- (D) norbixina (C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>).

Ahora bien, cabe resaltar que *cis*-bixina o (hidrógeno-(9'*Z*)-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato de metilo) representa el 80% de los carotenoides presentes en la semilla, (**Figura 5**) mientras que

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

el 20% restante, corresponde a compuestos fenólicos y carotenoides como caroteno, criptoxantina, luteína, zeaxantina, licopenoato, *trans*-bixina y metil bixina (Chisté et al., 2011; Giridhar, 2014; Scotter, 2009). El isómero *cis*-bixina es soluble en solventes orgánicos e insoluble en aceite vegetal, una vez aislado, podría eventualmente convertirse con radiación UV en el isómero *trans*-debido a su estabilidad (por impedimento estérico) (Giridhar, 2014). Por su parte, el compuesto *trans*-bixina es soluble en aceite vegetal y proporciona la coloración roja característica, está presente en concentraciones traza o puede formarse en el proceso de extracción y aislamiento (Giridhar, 2014).

Las semillas de *B. Orellana* se componen de una sección interna rica en ácidos grasos, ceras y cenizas minerales, una cáscara formada por celulosa, taninos y flavonoides, y una envoltura externa rica en sustancias cerosas y pigmentos, donde el componente principal es *cis*-bixina (Ver **figura 6**) (Balogun & Fetuga, 1988; Biosci et al., 2020; Biswas et al., 2018; de Oliveira Júnior et al., 2019; Giorgi et al., 2013; Giridhar, 2014; Ribeiro et al., 2005; Shahid-ul-Islam et al., 2016; Silva et al., 2008; D. D. A. Vilar et al., 2014).

## PROPIEDADES FISIQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

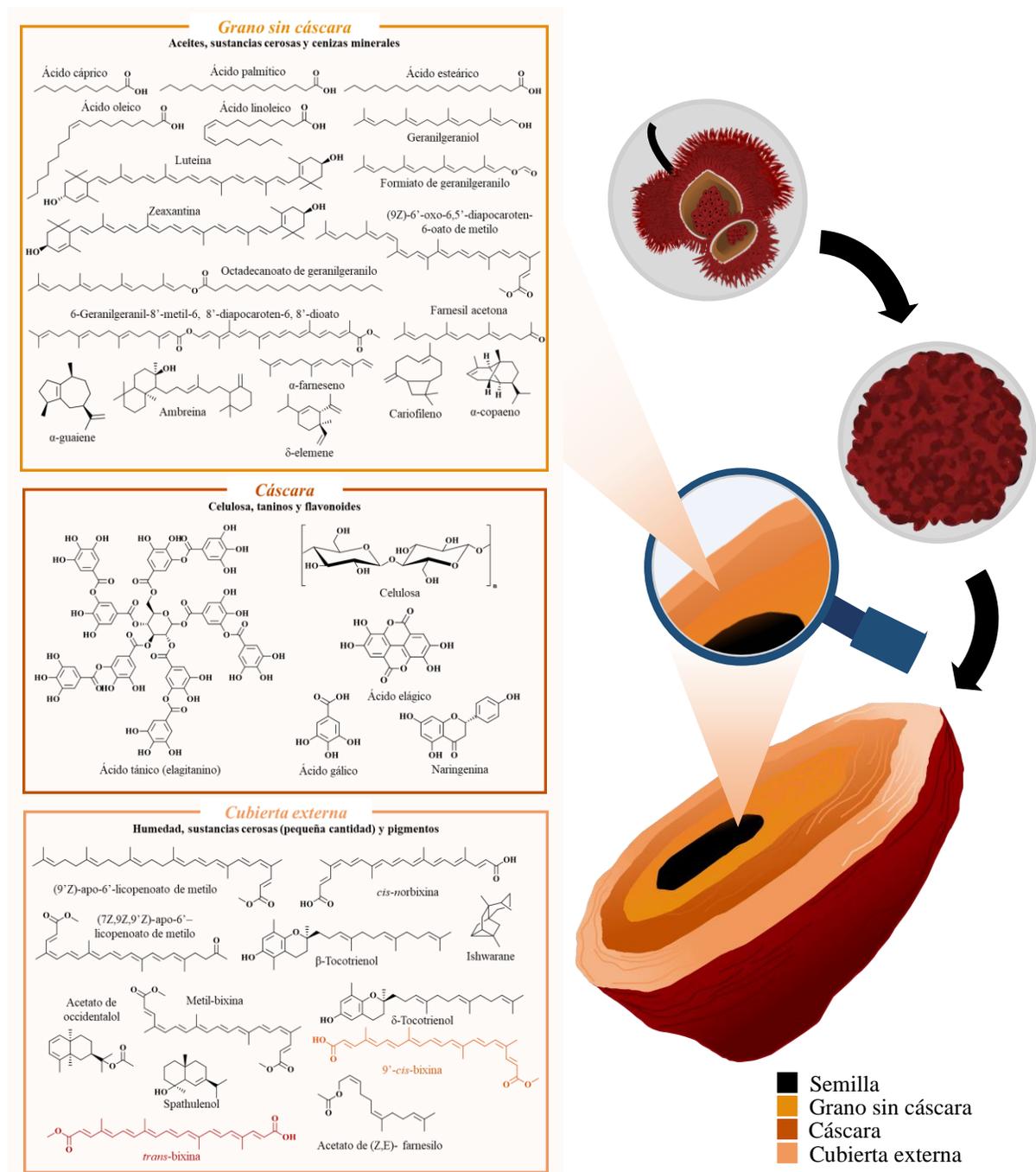


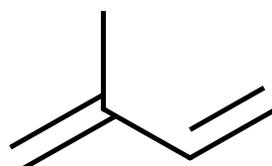
Figura 6. Compuestos presentes en las semillas de *B. orellana*.

Camara y colaboradores en el año 2003 elucidaron por primera vez la ruta biosintética de la bixina (Siva et al., 2010). Los autores reportaron que el licopeno es el carotenoide del cual

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

proviene el pigmento, razón por la cual, la bixina es considerada como un apocarotenoide. Es decir, un compuesto que se forma por escisión oxidativa (mediada por enzimas) de la cadena principal del carotenoide. Lo anterior indica que, la bixina puede considerarse como carotenoide para fines prácticos. Por consiguiente, se hace importante el conocimiento de los pasos implicados en la formación de carotenoides, los cuales pertenecen a la familia de los terpenos y su biosíntesis es vía isoprenoide (Raddatz-Mota et al., 2017).

Los terpenos son compuestos formados por unidades de isopreno ( $C_5H_8$ ) (**Figura 7**) y se clasifican de acuerdo con el número de unidades que tenga en su estructura. Así, los terpenos  $C_{10}$  (compuestos por 2 unidades de isopreno) se denominan monoterpenos, los terpenos  $C_{15}$  (compuestos por 3 unidades de isopreno) se denominan sesquiterpenos, los terpenos  $C_{20}$  (compuestos por 4 unidades de isopreno) se denominan diterpenos, los terpenos  $C_{30}$  (compuestos por 6 unidades de isopreno) se denominan triterpenos, los terpenos  $C_{40}$  (compuestos por 8 unidades de isopreno) se denominan tetraterpenos y para aquellos con más de 8 unidades de isopreno se denominan politerpenos (Pérez-Urria Carril & Ávalos García, 2009).



**Figura 7.** Estructura química del isopreno,  $C_5H_8$

Su biosíntesis puede llevarse a cabo mediante dos rutas metabólicas, a saber, ruta del ácido mevalónico ocurrida en el citosol y ruta del fosfato de metileritrilo (MEP) ocurrida en el cloroplasto (Ver **Figura 8**). Para el primer caso, tres moléculas de acetil-coenzima A se unen para formar el ácido mevalónico, el cual se fosforila en la posición del alcohol primario, se descarboxila

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

y deshidrata para formar el respectivo difosfato de isopentilo (IPP) que eventualmente se isomeriza en difosfato de dimetilalilo (DMAPP) y se establece un equilibrio entre sí. Para el segundo caso, el gliceraldehído-3-fosfato y ácido pirúvico se unen para formar el fosfato de metileritrilo, el cual se fosforila y deshidrata para formar el respectivo DMAPP. Ahora bien, IPP (“cabeza”) y DMAPP (“cola”), considerados como los precursores de todos los terpenos, se unen para formar geranil difosfato (GPP), precursor de todos los monoterpenos. Este último puede unirse nuevamente a una molécula de IPP para formar difosfato de farnesilo (FPP), precursor de casi todos los sesquiterpenos, quien puede incorporar otra molécula IPP para formar el geranilgeranil difosfato (GGPP), precursor de los diterpenos. Asimismo, la adición de dos moléculas de FPP y GGPP forman triterpenos y tetraterpenos, respectivamente (Taiz & Zeiger, 2002).

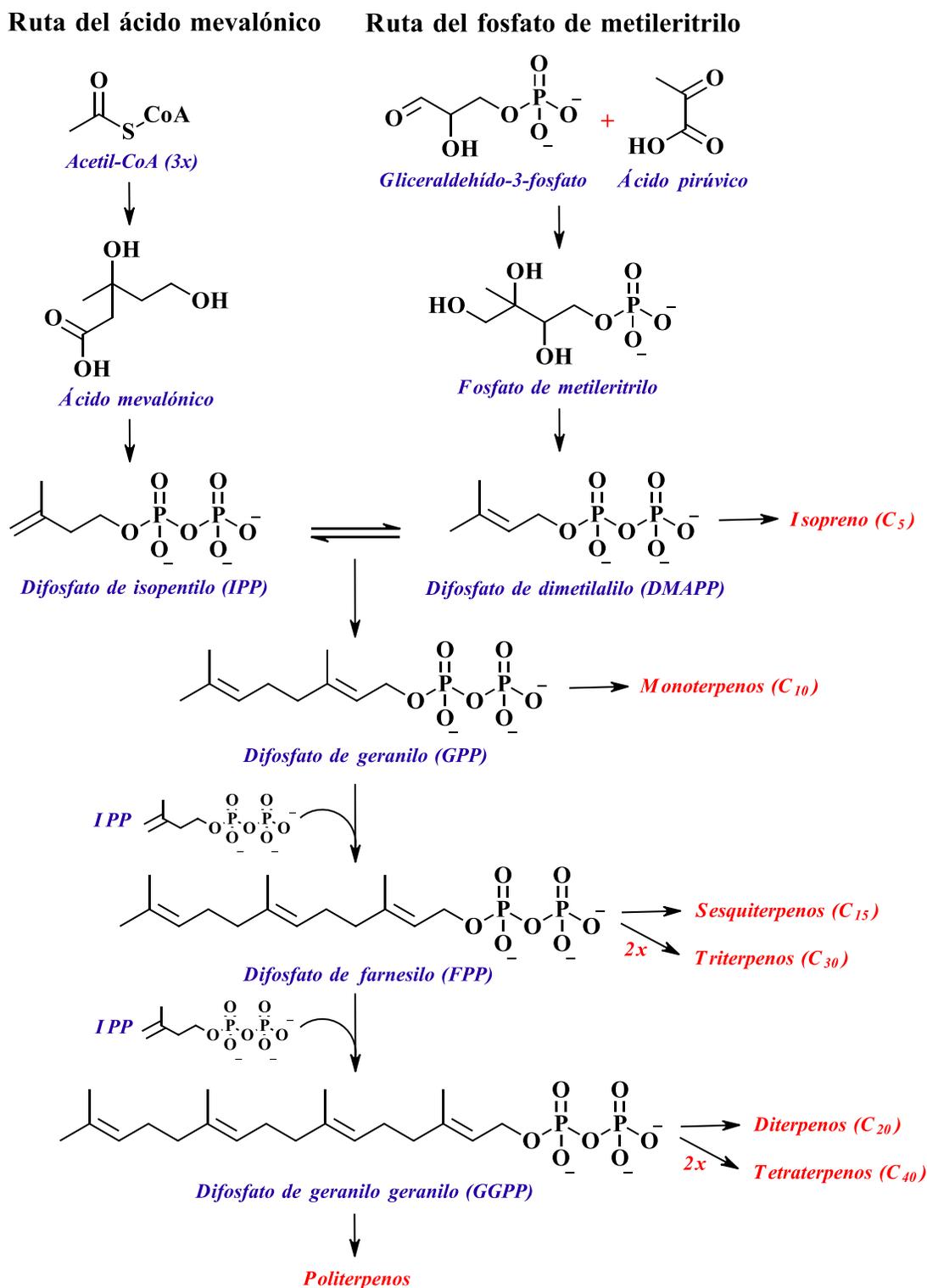
De esta manera, la unión de dos moléculas GGPP mediante fitoeno sintasa (PSY) permite la formación del intermediario pirofosfato de prefitoeno y luego *cis*-fitoeno (C<sub>40</sub>), quien posteriormente sufre cuatro reacciones de desaturación (deshidrogenación gradual y simétrica) para la formación de fitoflueno,  $\xi$ -caroteno, neurosporeno y finalmente licopeno (carotenoide más simple) mediante fitoeno desaturasa (PDS) y  $\xi$ -caroteno desaturasa (ZDS) (Raddatz-Mota et al., 2017; Siva et al., 2010; Srivastava & Srivastava, 2015) (Ver **Figura 8**). Cabe resaltar que las isomerizaciones *cis-trans* se llevan a cabo *in vivo* porque el fitoeno se sintetiza en configuración 15-*cis* pero se isomeriza para mayor estabilidad (Siva et al., 2010).

Una vez formado el licopeno, ocurre la escisión de los enlaces 5-6 y 5'-6' e incorporación del grupo aldehído mediante la enzima dioxigenasa (LCD) para la formación de bixin aldehído. Seguidamente el compuesto se carboxila mediante bixina aldehído deshidrogenasa (ADH) para la formación de norbixina y finalmente se sintetiza el apocarotenoide mediante carboxil metil

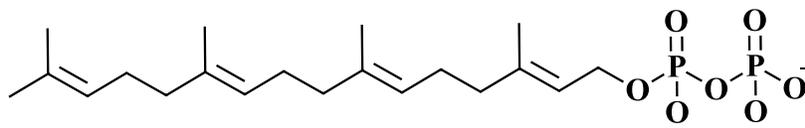
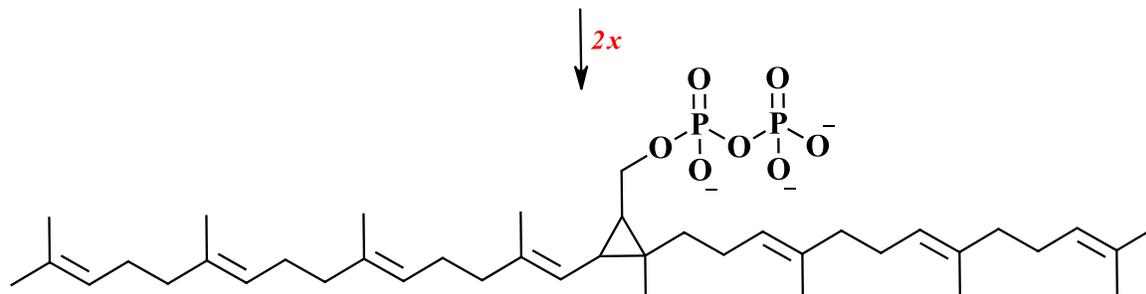
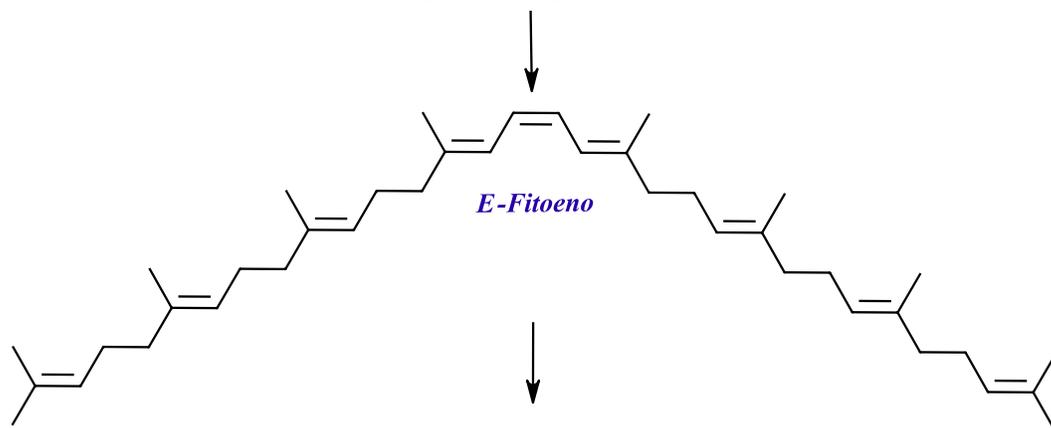
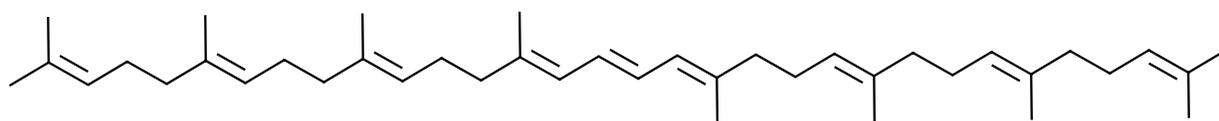
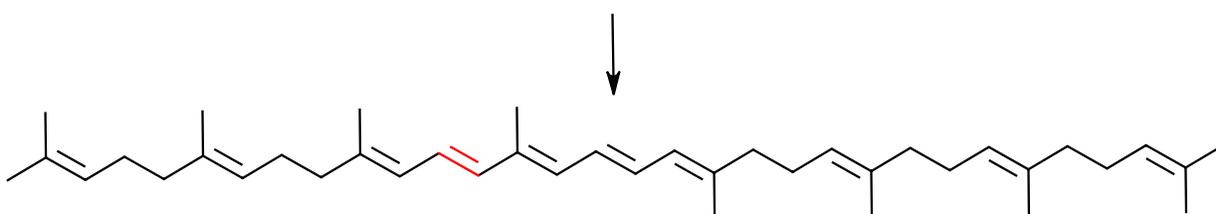
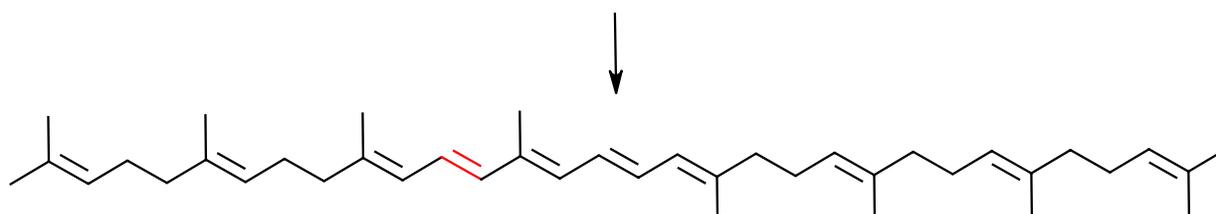
## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

transferasa (CMT) para la formación de bixina (Raddatz-Mota et al., 2017; Siva et al., 2010) (Ver

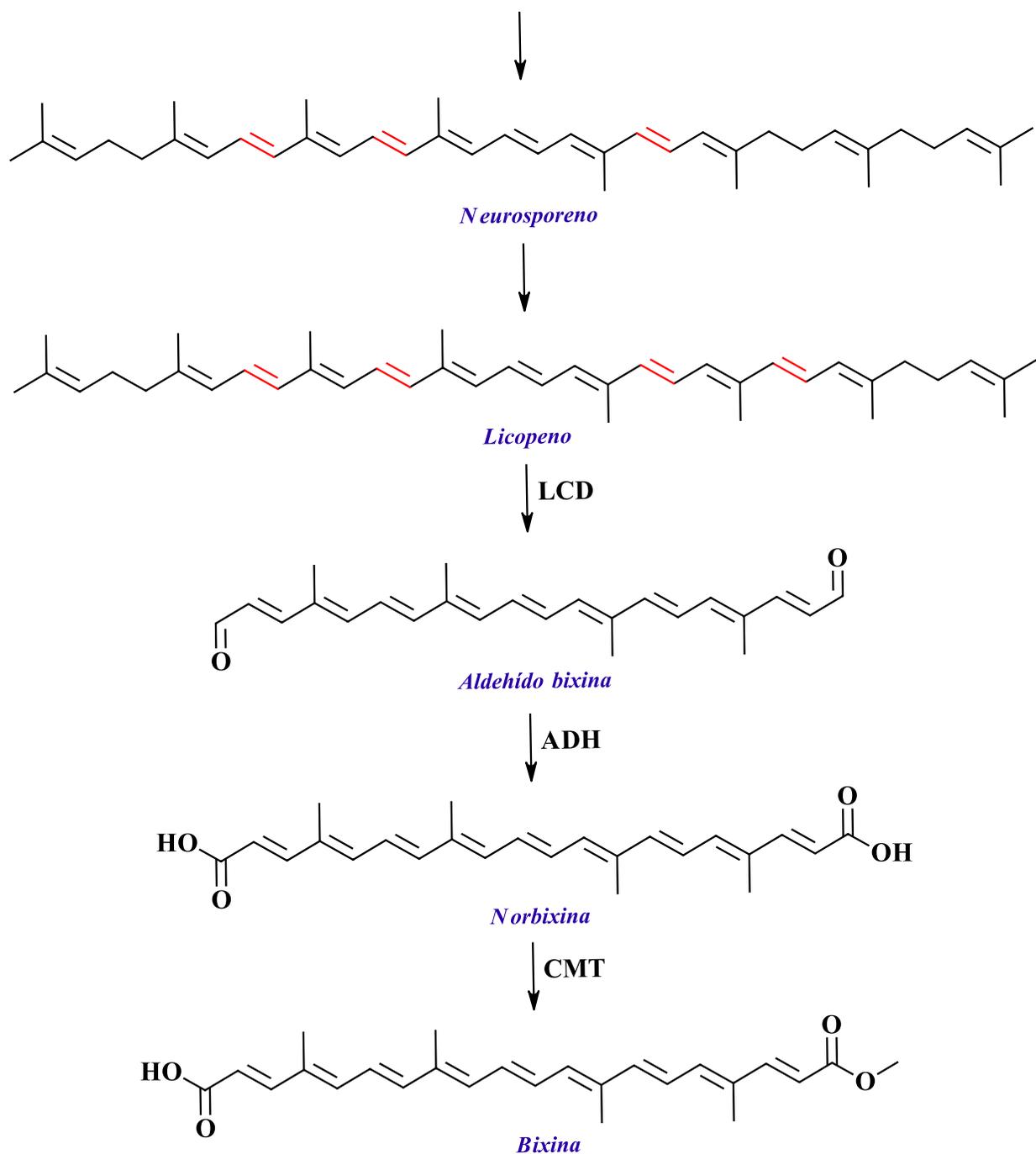
Figura 8).



## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

*Difosfato de geranilo geranilo (GGPP)**Pirofosfato de prefitoeno**E-Fitoeno**Fitoeno**Fitoflueno**Fitoflueno*

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES



**Figura 8.** Pasos involucrados en la biosíntesis de bixina,  $C_{25}H_{30}O_4$ .

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

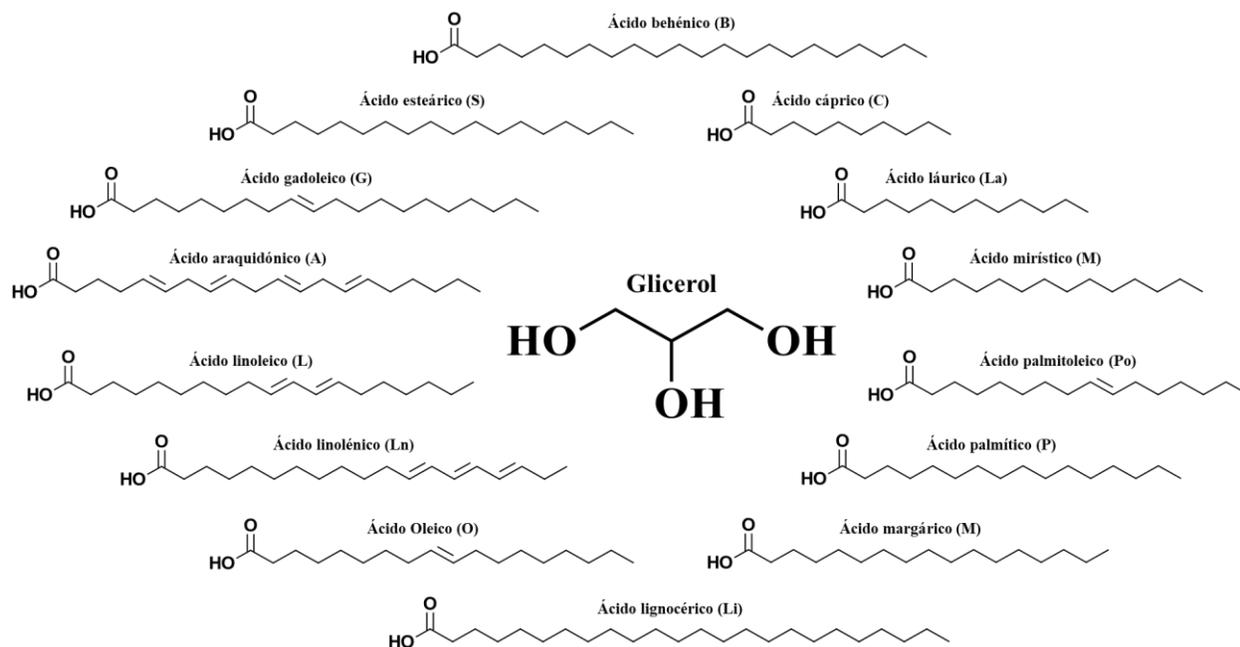
### 3.7 Triacilglicéridos, clorofilas y carotenoides

Los triacilglicéridos (TAG) son una clase de lípidos vegetales que incluyen derivados de ácidos grasos. Están compuestos de una molécula de glicerol al que están unidos tres moléculas de ácidos grasos mediante enlace éster (Tao, 2007). Sus propiedades físicoquímicas (térmicas y cristalográficas, reactividad química y actividad superficial) dependen de la composición de dichos ácidos grasos, su posición en la molécula de glicerol, grado de insaturación, longitud y estereoquímica (configuración geométrica y distribución espacial) (Tao, 2007). No obstante, dichas propiedades se ven afectadas por la rotación libre entre los carbonos del glicerol y ácidos grasos, de manera que existe gran variedad de conformaciones y por tanto, patrones cristalográficos (polimorfismo) (Tao, 2007). Son biosintetizados en forma *cis*- pero se isomerizan a la forma *trans*- con el aumento de temperatura. Son numerosos y hoy día han sido aplicados a nivel industrial y biológico (Tao, 2007).

Los TAG's tienen diversas funciones a nivel celular, entre ellas, sirven como precursores en la síntesis de azúcares, su degradación seguida de la  $\beta$ -oxidación produce ATP e incorporan ácidos grasos libres presentes en el medio (Yang & Benning, 2018). Asimismo, son considerados fuente eficiente de carbono y energía, por ello se encuentran normalmente en semillas, pericarpios y polen. Además, recientemente se ha reportado su presencia en hojas (Lin & Oliver, 2008).

Los ácidos grasos pueden ser saturados e insaturados, y difieren en la longitud de la cadena hidrocarbonada ( $C_{10}$  a  $C_{24}$ ), siendo  $C_{16}$  y  $C_{18}$  los predominantes en la mayoría de plantas (Tao, 2007). En la **figura 9** se muestra la estructura general del glicerol y los principales ácidos grasos presentes en aceites naturales de oliva, girasol y sacha inchi (Calvano et al., 2007; Fanali et al., 2011; Jergović et al., 2017; Ollivier et al., 2003; Stolyhwo et al., 1985), cuyos TAG's fueron identificados en este proyecto de investigación.

## PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES



**Figura 9.** Estructura química del glicerol y ácidos grasos presentes en aceite de oliva, girasol y sachá inchi.

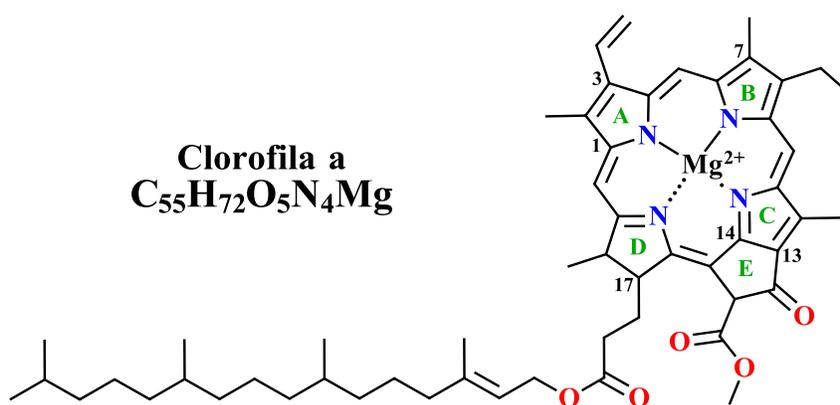
Las clorofilas son pigmentos naturales presentes en todas las plantas, se encuentran localizados en organelos internos denominados cloroplastos, ahí, las clorofilas se encuentran asociadas con carotenoides, lípidos y lipoproteínas (Yilmaz & Gökmen, 2015). Las clorofilas tienen como función principal coleccionar energía solar y servir como transporte de electrones dentro de los centros de reacción, fundamentales en el proceso de la fotosíntesis. El transporte electrónico a cargo de este tipo de moléculas es posible debido a la presencia de dobles enlaces conjugados en sus estructuras (**Figura 10**) (A. Tanaka & Tanaka, 2006)

La estructura química básica de las clorofilas es un tetrapirrol cíclico (cuatro anillos de pirrol, A, B, C, D, enlazados con puentes de metino) con un quinto anillo isocíclico adicional (E), un ion metálico ( $Mg^{2+}$ ) coordinando con cuatro átomos de nitrógeno y un alcohol isoprenoide

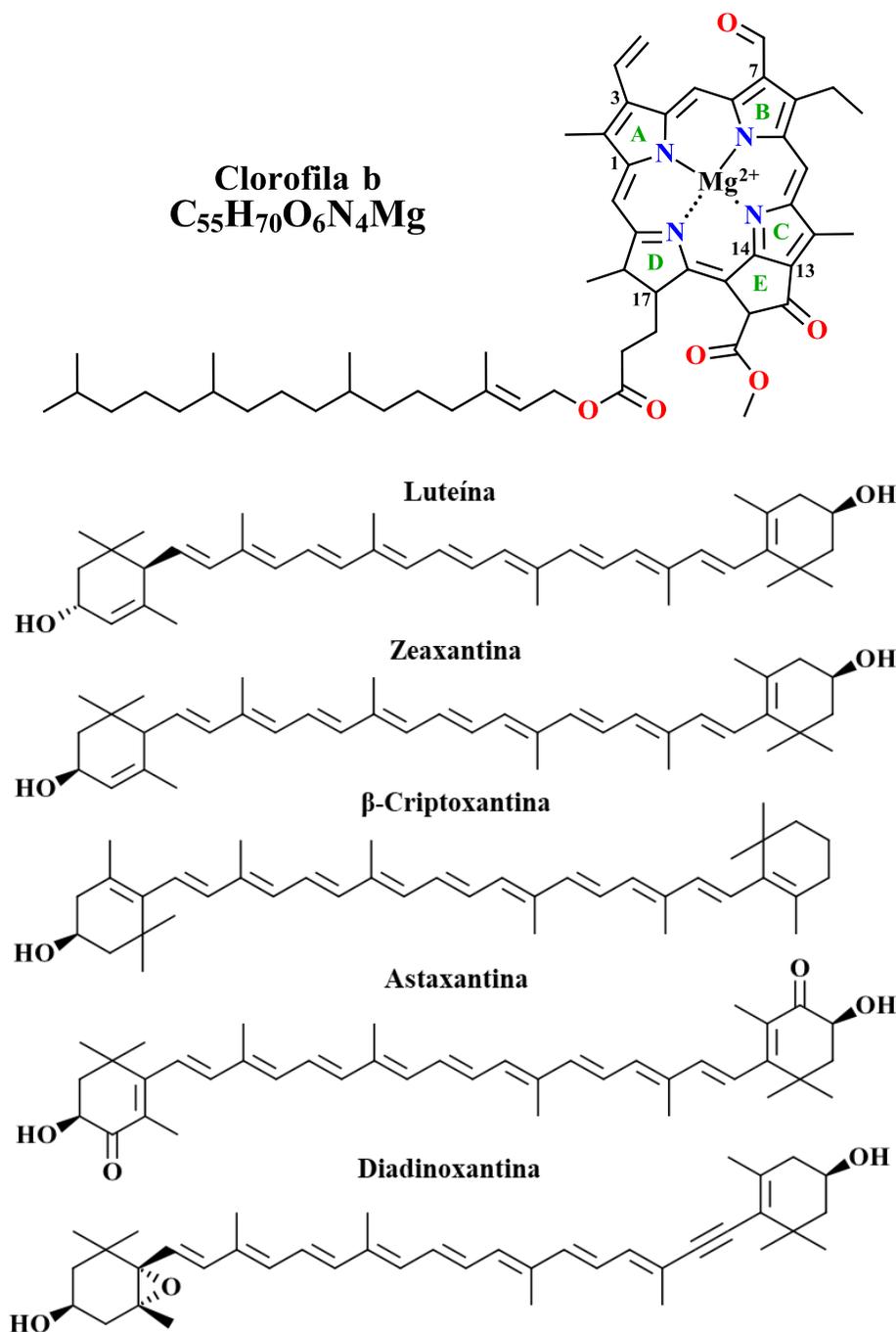
## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

monoinsaturado (fitol) esterificado a ácido propiónico unido al C-17 (Yilmaz & Gökmen, 2015). Existen 5 tipos de clorofilas (a, b, c, d y e) que difieren entre sí por la presencia de distintos sustituyentes en C-3, C-7 y C-17 y por las diferentes longitudes de onda máxima a las que absorben, de las cuales las más abundantes son clorofila a y b en las plantas vasculares (Yilmaz & Gökmen, 2015).

La estabilidad de las clorofilas depende del pH, la temperatura, el oxígeno, los metales y las enzimas presentes en el medio. Estos pigmentos se degradan fácilmente bajo condiciones ácidas; donde, para el caso de clorofila a, se forma feofitina a *i.e.*, ocurre la pérdida del átomo central de  $Mg^{2+}$ . Por su parte, los tratamientos térmicos suaves conllevan a la formación de isómeros de clorofila (a' y b') y en algunos casos, a la formación de feofitina, pirofeofitina y pirofeoforbida. Lo anterior, mediado por enzimas como clorofilasa, lisil oxidasa (LOX), peroxidasa (POD) y polifenol oxidasa (PPO) que se activan bajo estas condiciones. Asimismo, el ion  $Mg^{2+}$  de la clorofila puede ser intercambiado con iones como  $Zn^{2+}$  y  $Cu^{2+}$  para formar complejos más estables y el pigmento puede sufrir oxidación fotosensibilizada (Yilmaz & Gökmen, 2015).



## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES



**Figura 10.** Estructura química de clorofilas y xantofilas representativas.

Por otro lado, los carotenoides son tetraterpenos derivados del fitoeno, compuestos de 40 átomos de carbono o un poco menos (norcarotenoide y apocarotenoide). Los carotenoides pueden

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

ser compuestos hidrocarbonados (carotenos) o derivados oxigenados de carotenos (xantofilas). Su estructura básica es lineal (*e.g.*, licopeno) y esta puede ser ciclada en uno o ambos extremos de la molécula (*e.g.*,  $\beta$ -caroteno) (Sánchez et al., 1999). Los carotenoides, desempeñan la función de antioxidantes en organismos fotosintéticos y la cadena poliénica presente en sus estructuras es más estable en una conformación *trans*- debido a que los enlaces son coplanares y el impedimento estérico es mínimo. Los carotenoides son moléculas lipofílicas y tienen la capacidad de absorber luz en la región visible por la presencia de dicha cadena poliénica. Sin embargo, la presencia de la cadena poliénica los hace sensibles a la degradación oxidativa y a la fotoisomerización, que pueden ocurrir a temperaturas altas y/o a pH bajo (Sánchez et al., 1999).

Como se mencionó anteriormente, las xantofilas son carotenoides oxigenados que tienen en su estructura grupos hidroxilo o epóxidos (Vats, 2017). Son pigmentos amarillos-naranjados-rojos cuya función es modular la energía absorbida por las hojas de la planta, de manera que se involucran en el proceso de fotosíntesis. Por ello, se encuentran unidos a moléculas de clorofila y proteínas presentes en las membranas integrales de células vegetales (Vats, 2017).

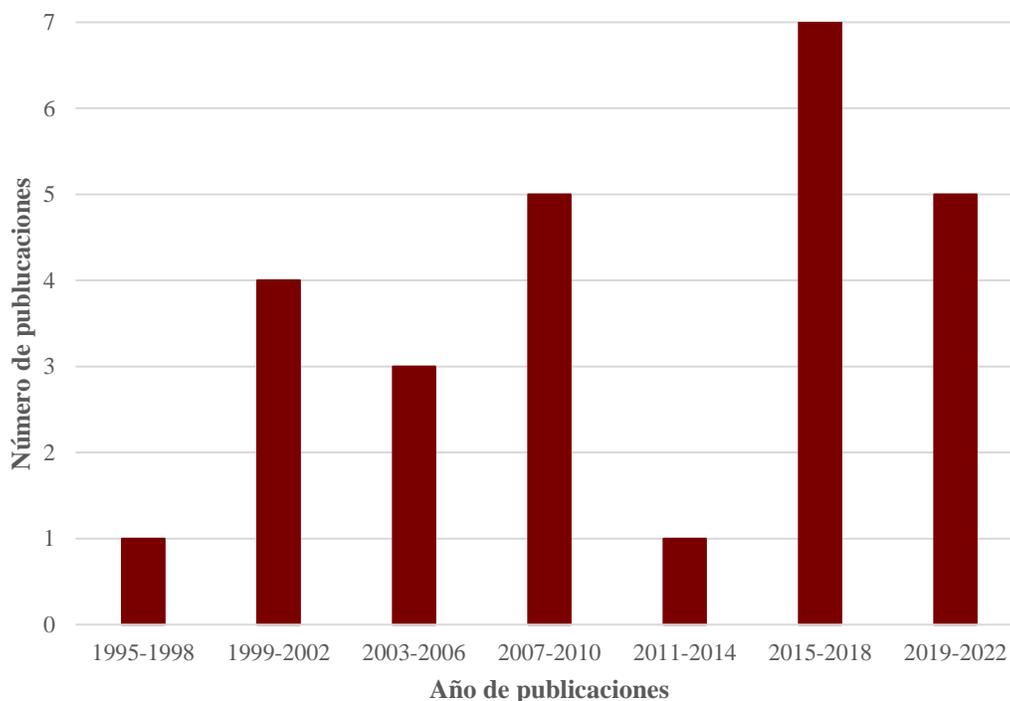
Las xantofilas más comunes son luteína, zeaxantina y  $\beta$ -criptoxantina cuyas estructuras se observan en la **figura 10**. Estos compuestos y sus derivados son fitoquímicos que ayudan a proteger las plantas contra amenazas externas como la radiación UV, patógenos o pequeños insectos.

### 3.8 Antecedentes

Con el fin de determinar el número de artículos científicos que han sido publicados desde el año 1995 hasta 2022, relacionados con el empleo del compuesto bixina como matriz MALDI en la espectrometría de masas, se usó la base de datos Scopus (*Elsevier*) (**Figura 11**). La búsqueda

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

se realizó el 24 de febrero de 2022, usando la ecuación de búsqueda TITLE-ABS-KEY (“*bixin* AND *Mass Spectrometry*”).



**Figura 11.** Publicaciones científicas de bixina en espectrometría de masas.

En la **Figura 11**, se puede observar una representación de la relación entre el número de publicaciones y el periodo de tiempo comprendido desde 1995 hasta 2022. La búsqueda, utilizando la ecuación de búsqueda descrita anteriormente arrojó un total de 26 publicaciones. Aun así, en ninguno de estos reportes se utilizó el pigmento bixina como matriz MALDI, ni se estudiaron sus propiedades en fase gaseosa. Los estudios reportados tienen como objetivo central la extracción, identificación y/o caracterización de la bixina por medio de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, así como sus aplicaciones. En la búsqueda realizada también se pudo observar que el país que más ha contribuido al estudio de la bixina ha sido Brasil, con un mayor número de publicaciones (7), seguido por Reino Unido (5), Bélgica (4) y Estados Unidos (3).

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

De las 26 publicaciones, se destacan los trabajos realizados por Faria, D.V. y colaboradores (Faria et al., 2019), en el que observaron la influencia de la luz sobre los cultivos de plantas *B. orellana* ('Piave Vermelha' y 'UESB74') y con ello, la manera como se ve afectada la biosíntesis del apocarotenoide bixina. Estos autores notaron que la 'Piave Vermelha' prefiere luz LED azul/roja para biosintetizar satisfactoriamente y en mayor proporción la bixina, mientras que el genotipo 'UESB74' prefiere luz fluorescente con irradiancias de  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Por otro lado, Rao y colaboradores (Prabhakara Rao et al., 2015) analizaron los lípidos presentes en las semillas de *B. orellana* mediante GC-MS y los compararon sus resultados con los lípidos presentes en las semillas de *Trachyspermum copticum*. Los autores, reportan que existe una alta presencia de lípidos neutros en ambas fuentes (más del 95%), siendo la semilla de *B. orellana* la que tiene mayor cantidad (98.1%). De igual manera, los autores investigaron la composición de ácidos grasos de dichos lípidos y encontraron ácido palmítico y linoleico en mayor abundancia en las semillas de *B. orellana* y ácido petroselínico y linoleico en las otras semillas de estudio. Asimismo, Chisté, R.C., Yamashita, F. y colaboradores (Chisté et al., 2011) extrajeron carotenoides y compuestos fenólicos presentes en las semillas de achiote, usando una mezcla de acetona:metanol:agua (50:40:10, v/v/v), para luego cuantificarlos usando HPLC-DAD-MS/MS. Como era de esperarse, de acuerdo con estudios previos (Giridhar, 2014), la bixina es el principal carotenoide presente. Por su parte, Rehbein, J. y colaboradores (Rehbein et al., 2007) trabajaron específicamente con el apocarotenoide bixina, utilizaron dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) como método de extracción de la bixina, para luego purificarla e identificarla por LC-MS. Erdawati E. y colaboradores (Erdawati et al., 2021) llevaron a cabo un proceso similar pero su extracción se hizo con solvente asistida por ultrasonido. Los autores notaron que la condición óptima para la extracción del pigmento es agua destilada: acetato de etilo (1:7 v/v) como solvente y un tiempo de

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

extracción de 15 min con baja potencia de radiación. Los compuestos aislados se identificaron por espectroscopía IR y LC-MS.

Curiosamente, Siva, R. y colaboradores (Siva et al., 2010) encontraron que los genes codificantes en la ruta biosintética para la formación de bixina (que codifican la dioxigenasa de escisión del licopeno -precursor-, la bixina aldehído deshidrogenasa y la norbixina carboxil metiltransferasa), no sólo están presentes en la *B. orellana*, sino que también en *Crocus sativus* (azafrán) y *Vitis vinífera* (uva). Así que se encontró la presencia de este apocarotenoide en otras dos fuentes naturales haciendo uso de GC-MS.

Otros investigadores, como Bittencourt, C y colaboradores (Bittencourt et al., 2005) se interesaron por estudiar la termoestabilidad de la bixina mediante espectrometría de masas de iones secundarios con analizador de tiempo de vuelo (TOF-SIMS). Los autores, notaron que la señal correspondiente al apocarotenoide desaparece a 150 °C y a temperaturas ligeramente menores se observa la formación de dímeros. Por otro lado, Scotter (Scotter, 2009) hizo un análisis riguroso en el que aisló los isómeros *cis*-, *di-cis*- y *trans*- de bixina y norbixina presentes en el extracto de achiote por medio de HPLC y determinó sus diferencias usando detectores de MS. Notó que la separación en la columna fue posible usando acetonitrilo como fase móvil en una elución isocrática de ácido acético al 0,4% a 35 °C en una columna HRPB C<sub>8</sub>/C<sub>18</sub>.

El estudio más reciente ha sido realizado por Oliveira y colaboradores (Oliveira et al., 2022). Los autores reportan una técnica ambiental suave y novedosa para la cuantificación del pigmento. Los autores emplean LC-MS con *Venturi easy ambient sonic spray ionization* (V-EASI) como interfaz. Con ello, resaltan el uso de una fuente de ionización suave para analizar muestras en solución y cuantificar el pigmento de interés.

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

De esta manera, se observa que la bixina ha sido estudiada para fines de su identificación en extractos de achiote, pero aún no se han explorado sus propiedades fisicoquímicas para ser evaluada como matriz MALDI. Asimismo, otros pigmentos aislados de fuentes naturales *e.g.*, la 1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-hepta-1,6-dieno-3,5-diona o curcumina (Ver **figura 12**) aislado de la planta herbácea cúrcuma (*Curcuma longa L.*) (S Francese et al., 2013) ha sido utilizada en diferentes aplicaciones; a saber, dar coloración y conservación de alimentos, como tinte de telas, para tratar enfermedades cardiovasculares, en otras aplicaciones (S Francese et al., 2013). Curcumina, es un pigmento natural de color amarillo-naranja presente en los rizomas de la planta en forma tautomérica, esto es, forma ceto (si es disuelta en solventes polares) y forma enólica (si es disuelta en solventes apolares).

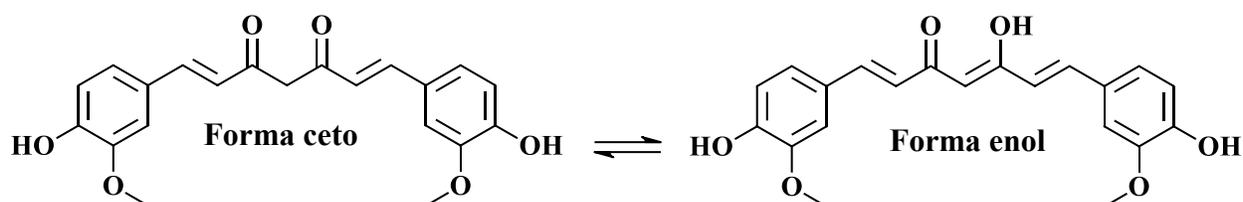
Asimismo, en el año 2011 se descubrió que la curcumina puede ser usada para desempolvar las huellas de dedos latentes en diversas superficies. Lo anterior, debido a la formación de puentes de hidrógeno entre los ácidos grasos del sebo contenidos en la huella y los grupos carbonilo e hidroxilo presentes en el pigmento (S Francese et al., 2013).

Por lo anterior, Francese S. y colaboradores analizaron las propiedades fisicoquímicas del colorante y su aplicación en ciencia forense. Los autores reportaron el uso de la curcumina como matriz MALDI para el análisis de compuestos termolábiles como medicamentos, lípidos, péptidos y proteínas, y sus aplicaciones para la obtención de imágenes químicas de muestras biológicas de huellas dactilares (S Francese et al., 2013) así como de tejidos pulmonares y piel de rata (Baker et al., 2017; S Francese et al., 2013).

Años más tarde, Francesa S. (Simona Francese, 2015) describió un protocolo para la creación de perfiles (MSP) y la formación de imágenes por MALDI MS (MSI) para analizar satisfactoriamente huellas dactilares en superficies de vidrio, diferentes tipos de metal, madera,

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

plástico, cuero, cartón y cerámica. La autora reporta que la curcumina presenta ventajas sobre el CHCA por su fluorescencia, hecho que facilita la visualización de la huella. Además, se requiere de muy poca cantidad porque se adhiere fuertemente a las superficies. Sin embargo, si la marca es antigua, la adherencia es poca porque el contenido de lípidos es mínimo. Los autores, describen la detección y mapeo de péptidos y proteínas, reportan el análisis del método de deposición de la matriz: *Spray-Coating* o método *Dry-Wet* e inclusive, describe el protocolo MALDI MSI de huellas dactilares en preservativos.



**Figura 12.** Estructura química de la curcumina,  $C_{21}H_{20}O_6$

Para el año 2017, Francese S. y colaboradores (S Francese et al., 2017) reportaron el uso de la curcumina bajo el método *Dry-Wet* y encontraron su utilidad en ensayos de laboratorio. Sin embargo, descubrieron que la fuerte adherencia del pigmento a las huellas dactilares hace casi imposible su limpieza, de manera que fue impedido su uso en escenas de crimen. Por otro lado, los autores reportaron que las técnicas MALDI MSP y MALDI MSI son útiles en ciencia forense, ya que permiten detectar sustancias endógenas (*e.g.*, lípidos y péptidos), sustancias exógenas (*e.g.*, detección y mapeo de drogas de abuso), sustancias semiexógenas y sustancias de contacto con el fin de construir el perfil del infractor.

Posteriormente, Macedo y colaboradores (de Macedo et al., 2017) reportaron el uso de la curcumina como matriz MALDI para obtener imágenes químicas de la piel. Los autores se

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

interesaron por analizar la distribución espacial de analitos como proteínas, péptidos, lípidos y metabolitos, así como la absorción de fármacos en la piel y la preparación de muestras (recolección y conservación de muestras, inclusión de tejidos, criosección, lavado y aplicación de matriz) para su respectivo análisis. Notaron que la preparación de muestras es un paso crucial para un análisis satisfactorio, de manera que detallaron las consideraciones para tener en cuenta en cada paso analítico, y a su vez, determinaron que se obtienen mejores resultados empleando el pigmento como matriz. Los estudios se compararon con la matriz CHCA (comúnmente usada por su eficiencia y versatilidad) y se observó que usando curcumina pueden localizarse el fármaco acitretina en la epidermis y los lípidos de la piel con mayor intensidad en las imágenes obtenidas.

Partiendo de la información anterior, pigmentos obtenidos de fuentes naturales pueden ser utilizados como matrices MALDI para el análisis de compuestos como lípidos, péptidos y proteínas. La bixina, un apocarotenoide obtenido de *B. orellana L.* por sus propiedades fisicoquímicas como la absorción de radiación en el UV y estabilidad por deslocalización de electrones al igual que la curcumina despierta interés para su evaluación como matriz MALDI en el análisis de triacilglicéridos y pigmentos de tipo clorofila y carotenoide.

#### 4. Metodología

Este trabajo de investigación se llevó a cabo con el propósito de aislar el apocarotenoide principal de las semillas de *B. Orellana*, medir ciertas propiedades fisicoquímicas del compuesto aislado y emplearlo para promover reacciones en fase gaseosa como matriz MALDI. En la primera etapa, la *cis*-bixina se aisló y purificó mediante extracción con fluido supercrítico, extracción con solvente asistida por ultrasonido y extracción en fase sólida. Seguidamente, el compuesto aislado se caracterizó por espectroscopía ultravioleta visible, espectroscopia de reflectancia difusa, espectroscopía infrarroja y espectrometría de masas LDI. Asimismo, se calculó el coeficiente de absorptividad molar y se determinó el rendimiento cuántico de fluorescencia. En la segunda etapa del proyecto de investigación, se estableció el comportamiento de *cis*-bixina en fase gaseosa bajo condiciones MALDI, se determinó su mecanismo de transferencia de carga y se empleó como matriz MALDI. Los resultados obtenidos utilizando *cis*-bixina como matriz MALDI, fueron comparados con la matriz comercial DHB, la cual funciona como matriz de transferencia protónica y catiónica.

#### 4.1 Aislamiento y caracterización de *cis*-bixina presente en las semillas de *Bixa orellana*

##### 4.1.1 Extracción de *cis*-bixina a partir de las semillas de la planta *B. orellana*

Las semillas de *Bixa orellana* (variedad ovada) se adquirieron de manera comercial (plaza local), y el apocarotenoide principal -*cis*-bixina- se extrajo mediante tres técnicas de extracción siguiendo un orden lógico, a saber; extracción con fluido supercrítico (SFE), extracción con solvente asistida por ultrasonido (UAE) y extracción en fase sólida (SPE).

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

**4.1.1.1 Extracción con fluido supercrítico (SFE).** La primera etapa consistió en tratar las semillas de achiote haciendo uso de SFE con un equipo Apeks Supercritical 1500-1L, equipado con un cilindro de 0,7 L de capacidad para la extracción y un sistema de bombeo de CO<sub>2</sub> (4500 psi). Para ello, 100 g de semillas de *B. orellana* se llevaron al equipo SFE por 5 horas a 38,3 °C (311,45 K) y 1350 psi (91,86 atm), condiciones máximas alcanzadas por el equipo que se acercan a las condiciones reportadas por Albuquerque y Meireles (Albuquerque & Meireles, 2012). Pasado el tiempo de extracción, se colectaron las semillas desengrasadas junto con una fracción rica en compuestos lipídicos.

**4.1.1.2 Extracción con solvente asistida por ultrasonido (UAE).** En la segunda etapa se utilizaron las semillas desengrasadas por SFE del paso anterior. Se empleó un sonicador *Bransonic CPX3800* equipado con un depósito de acero inoxidable de 4 L de capacidad y con una frecuencia de trabajo igual a 40 kHz. Para ello, 1 g de semillas se trataron con 10 mL de acetato de etilo y se llevaron a ultrasonido por 15 min a temperatura ambiente (Cardarelli et al., 2008). El proceso se hizo por triplicado, con 10 ciclos de extracción para cada uno hasta decoloración de la semilla.

**4.1.1.3 Extracción en fase sólida (SPE).** La tercera y última etapa consistió en la purificación de la muestra. Se usaron cartuchos Biotage ISOLUTE-XL SAX que constan de 500 mg de una resina de intercambio aniónico como sorbente (amina cuaternaria con ion cloruro como anión). Para ello, el extracto obtenido por UAE se secó bajo corriente de argón y 0,1 g se disolvieron en 8 mL de metanol. Seguidamente, se llevó a pH 7,3 con una solución de NaOH 0,01 M y se adicionaron 2 mL de buffer K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> al mismo pH. Los cartuchos se acondicionaron con 5 mL de metanol (solvente afín a *cis*-bixina) y 5 mL del buffer previamente

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

preparado, para luego eluir la muestra. Una vez depositada esta, se eliminaron interferencias con 5 mL de hexano y 5 mL de una solución metanol:agua (30:70 v/v). A continuación, se dejó pasar una solución de 2 mL de buffer  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  a pH 2,7 y la *cis*-bixina pura se eluyó con soluciones de 1 mL de acetato de etilo acidificado al 10% con ácido fórmico (Biotage, 2015).

Con el fin de confirmar el proceso de purificación, el extracto se dejó secar y *ca.*, 1 mg se disolvió en 2 mL de metanol (MeOH), la solución se filtró con un filtro de membrana politetrafluoroetileno (PTFE) con un diámetro del poro igual a 0,45  $\mu\text{m}$  y se depositó en un vial HPLC para su respectivo análisis. Se estableció un tiempo de corrida igual a 10 min y se usó una columna en fase reversa,  $\text{C}_{18}$  (4.6  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), en condiciones isocráticas con ACN como fase móvil y detector UV a una  $\lambda = 457$  nm, establecida previamente como la longitud de máxima absorción de la *cis*-bixina en el análisis UV-Vis.

### 4.1.2 Caracterización del pigmento bixina

**4.1.2.1 Espectroscopía UV-Vis.** La medición UV-Vis se realizó en un espectrofotómetro Thermo Scientific GENESYS 10S UV-VIS bajo un rango de trabajo de 300 a 600 nm en el que se usó una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico y cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) como blanco en la celda de referencia. Asimismo, se determinó el coeficiente de absortividad molar a partir de la pendiente de la curva de absorbancia *vs* concentración, utilizando la ecuación de Lambert-Beer para soluciones diluidas (ver ecuación 13). Donde; A, corresponde a la absorbancia medida de la solución; b, el camino óptico de la celda utilizada; C, la concentración molar de la solución de bixina y;  $\epsilon$ , el coeficiente de absortividad molar a la longitud de onda específica.

$$A = \epsilon \cdot b \cdot C \quad \text{(Ecuación 13)}$$

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

Para ello, se prepararon 7 soluciones diluidas de bixina en tetrahidrofurano (THF) en un rango de 3 a 30  $\mu\text{M}$ , la absorbancia de cada solución se midió a la longitud de onda específica  $\lambda=355$  nm, se utilizó una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico y THF como blanco en la celda de referencia.

**4.1.2.2 Espectroscopía de Reflectancia Difusa.** Se midió el espectro de reflectancia difusa para conocer la absorción de la *cis*-bixina en estado sólido utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401PC con esfera de integración. Para la medición del blanco, se utilizó sulfato de bario ( $\text{BaSO}_4$ ), en un barrido espectral desde 300 hasta 800 nm, con un *slit* de 1 nm. La muestra fue homogeneizada y se depositaron 5 mg sobre un fondo del blanco en el portamuestras, el cual sirvió como soporte tal como se observa en la **figura 13**.



**Figura 13.** Portamuestra con 5 mg de *cis*-bixina depositada en un fondo de  $\text{BaSO}_4$  para análisis por reflectancia difusa.

**4.1.2.3 Rendimiento cuántico de fluorescencia.** Con el fin de conocer la probabilidad de desactivación de la *cis*-bixina en un estado excitado por mecanismo radiativo (fluorescencia) o no radiativo, se determinó su rendimiento cuántico con base en la **ecuación 14**.

$$\Phi_X = \Phi_{ST} \left( \frac{m_X}{m_{ST}} \right) \left( \frac{\eta_X^2}{\eta_{ST}^2} \right) \quad \text{(Ecuación 14)}$$

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

Donde los subíndices  $x$  y  $ST$  corresponden a la muestra y el estándar, respectivamente;  $\Phi$ , corresponde al rendimiento cuántico de fluorescencia;  $m$ , a la pendiente luego de graficar área de emisión fluorescente Vs absorbancia y;  $n$ , al índice de refracción del solvente usado para la preparación de las muestras.

Para ello, se prepararon 5 soluciones diluidas de *cis*-bixina en diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) y antraceno en etanol (fluoróforo estándar) en un rango de 0,6 a 3  $\mu\text{M}$ . La absorbancia de cada solución se midió a la longitud de onda específica  $\lambda=355$  nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific GENESYS 10S UV-VIS y se utilizó una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Posteriormente, se tomó el espectro de emisión de fluorescencia en un espectrofotómetro Horiba PTI QM-40 en una cubeta de fluorescencia (celda de cuarzo) de 1 cm de paso óptico, un rango de 360 a 700 nm con una longitud de onda de excitación igual a 355 nm y un ancho de hendidura de 0,5 para la excitación y emisión. El rendimiento cuántico del antraceno (estándar) se tomó de la información suplementaria de Barrios y colaboradores, con valor de 0,29 (Barros et al., 2019).

**4.1.2.4 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR).** Se midió el espectro infrarrojo haciendo uso del equipo Bruker FT-IR tensor II con celda ATR que fue cubierta en su totalidad por el compuesto de interés -*cis*-bixina-.

**4.1.2.5 Espectrometría de masas LDI.** Para los ensayos LDI se usó un espectrómetro de masas MALDI TOF-TOF Bruker Ultraflex extreme – Bruker Daltonics, Billerica, MA, equipado con un láser *Smart Beam* de Nd:YAG ( $\lambda = 355$  nm) con frecuencia de 1 kHz y salida máxima de energía de 85  $\mu\text{J}$  aproximadamente por disparo y un pulso de duración de 6 ns con ancho de spot 10 – 100  $\mu\text{m}$  de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La obtención de los espectros de masas se

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

hizo en un rango de  $m/z$  200 a 1100 en modo reflectrón positivo usando voltaje de aceleración de 25 kV con PIE (*pulsed ion extraction*) de 100 ns. Para el análisis MALDI se preparó una solución 2,5 mM de *cis*-bixina en metanol, se tomó una alícuota de 1  $\mu$ L y se depositó sobre el portamuestras MALDI.

De igual manera se hicieron experimentos de cationización del compuesto de interés. En este caso, se preparó una solución 2,5 mM de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en metanol, se mezclaron volúmenes iguales con una solución 2,5 mM de bixina en metanol y se tomó una alícuota de 1  $\mu$ L para depositarla sobre el portamuestras MALDI.

### **4.2 Preparación de la muestra en la evaluación de *cis*-bixina como matriz MALDI para el análisis de triacilglicéridos, xantofilas y clorofilas.**

Para evaluar el desempeño de *cis*-bixina como matriz MALDI de transferencia catiónica, inicialmente se prepararon soluciones 2,5 mM de TAG en MeOH y 0,13 M de DHB en ACN:H<sub>2</sub>O (1:1) al 0.1% de ácido trifluoroacético, para luego ser mezcladas en relaciones molares analito:matriz (A:M) 1:3000 y analizadas en MALDI como se describirá más adelante. Seguidamente, se preparó una solución 2,5 mM de *cis*-bixina en MeOH y se mezcló con las soluciones de TAG, previamente preparadas en relaciones molares analito:matriz (A:M) 1:100, 1:1000 y 1:10000.

Una vez realizados los análisis anteriores, se procedió a evaluar antraceno y DCTB 2,5 mM en MeOH, como posibles agentes promotores de la desorción (ADP), para lo cual se mezclaron con la solución de *cis*-bixina en relaciones molares matriz:APD 1:1, 1:100 y 1:1000 y se analizaron en MALDI como se describirá más adelante. Asimismo, los TAG's fueron analizados junto con

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

los APD bajo condiciones MALDI, en relaciones molares 1:100 para DCTB y 1:1 para antraceno, proporciones previamente escogidas de acuerdo con los resultados de este proyecto de investigación.

Finalmente, se llevaron a cabo los ensayos de identificación de TAG utilizando *cis*-bixina y ADP. Para realizar los análisis, se mezclaron las soluciones de *cis*-bixina junto a TAG y APD en relaciones molares matriz:APD:analito 100:10000:1, 1000:100000:1 y 10000:1000000:1 para DCTB y 100:100:1, 1000:1000:1 y 10000:10000:1 para antraceno (ver **tabla 1**). De igual manera, el análisis de astaxantina y diadinoxantina se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, se prepararon las soluciones a 2,5mM en MeOH y las soluciones finales se variaron en relación molar matriz:APD:analito 100:10000:1, 1000:100000:1, 10000:1000000:1, 100000:10000000:1 y 1000000:100000000:1 para DCTB y 100:100:1, 1000:1000:1, 10000:10000:1, 100000:100000:1 y 1000000:1000000:1 para antraceno (ver **tabla 1**). Para el análisis de clorofila a, se variaron las relaciones molares en 100:10000:1, 1000:100000:1, 10000:1000000:1 para DCTB y 100:100:1, 1000:1000:1, 10000:10000:1 para Antraceno (ver **tabla 1**).

**Tabla 1.** Condiciones de la preparación de la muestra para la identificación de TAG's, xantofilas y clorofila a. Donde M: *cis*-bixina, APD: Agente promotor de la desorción y A: analito.

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

Ensayo	Relación molar M:APD:A
Identificación de <b>TAG's</b> usando <i>DCTB</i> como APD	100:10000:1
	1000:100000:1
	10000:1000000:1
Identificación de <b>TAG's</b> usando <i>antraceno</i> como APD	100:100:1
	1000:1000:1
	10000:10000:1
Identificación de <b>xantofilas</b> usando <i>DCTB</i> como APD	100:10000:1
	1000:100000:1
	10000:1000000:1
	100000:10000000:1
Identificación de <b>xantofilas</b> usando <i>antraceno</i> como APD	100:100:1
	1000:1000:1
	10000:10000:1
	100000:100000:1
Identificación de <b>clorofila a</b> usando <i>DCTB</i> como APD	100:10000:1
	1000:100000:1
	10000:1000000:1
Identificación de <b>clorofila a</b> usando <i>antraceno</i> como APD	100:100:1
	1000:1000:1
	10000:10000:1

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

La preparación de las muestras se basó en el método de *dried droplet*, así que se mezclaron 15  $\mu\text{L}$  de cada solución preparada para cada relación molar y se agitaron por 1 min a 1500 rpm. Se depositó 1  $\mu\text{L}$  de la mezcla sobre el portamuestras MALDI con 3 repeticiones de cada una. Seguidamente, se registraron los espectros de masas en el rango de  $m/z$  100 a 1200, y se obtuvieron los diferentes descriptores analíticos para los análisis. La calibración del equipo en el rango de masas especificado se realizó utilizando la serie de péptidos estándar: leucina-encefalina, bradiquinina, bombesina y sustrato de renina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO).

## 5. Discusión de resultados

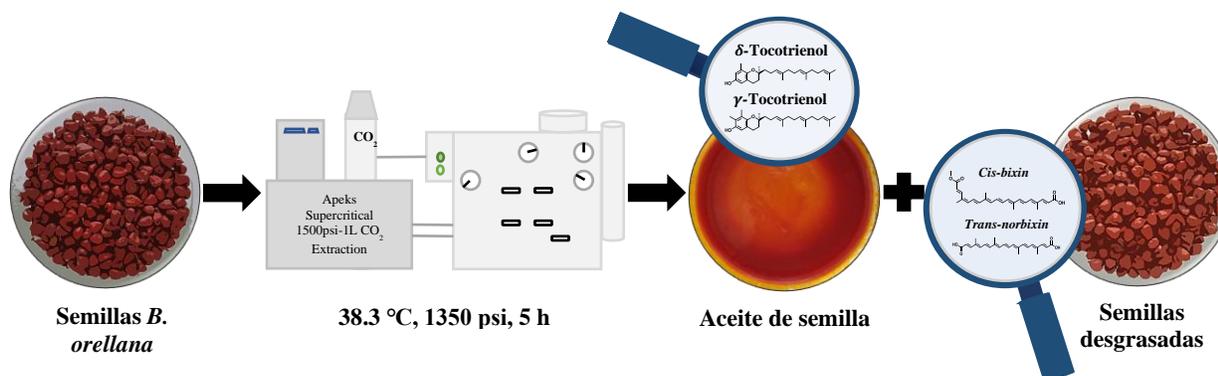
### 5.1 Aislamiento de *cis*-bixina presente en las semillas de *Bixa orellana*.

Las técnicas de SFE, UAE y SPE fueron necesarias para extraer y purificar satisfactoriamente *cis*-bixina ( $C_{25}H_{30}O_4$ ). La SFE fue necesaria para desgrasar las semillas, es decir, para eliminar la fracción lipídica, así como para eliminar los carotenoides y terpenoides que se unen fuertemente a la bicapa lipídica, los cuales son muy solubles en  $CO_2$  en estado supercrítico. Además, los lípidos y demás carotenoides presentes pueden interferir haciendo más compleja la extracción y purificación de *cis*-bixina, la cual es soluble en solventes orgánicos e insoluble en aceite vegetal. Los posibles compuestos eliminados en el paso de desgrasado utilizando SFE son dimetil-(9Z,9'Z)-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato, (9'Z)-apo-6'-licopenoato de metilo y sus derivados, luteína, zeaxantina, norbixina, metil (9Z)-10'-oxo-6,10'-diapocaroten-6-oato y sus derivados, 6-geranilgeranil-8'-metil-6, 8'-diapocaroten-6, 8'-dioato y sus derivados, isómeros de la vitamina E como  $\delta$ -tocotrienol y  $\gamma$ -tocotrienol, y ácidos grasos como palmítico, linolenoico, oleico, linolénico y esteárico (Biswas et al., 2018; Giorgi et al., 2013; Giridhar, 2014; Ribeiro et al., 2005; Shahid-ul-Islam et al., 2016; Silva et al., 2008; D. Vilar et al., 2014). De esta manera, la SFE permitió obtener un extracto correspondiente al aceite de la semilla y por otro lado, semillas desengrasadas ricas en *cis*-bixina (Ver **figura 14**).

Como se mencionó anteriormente y bajo las condiciones predichas en la sección 4.1.1.1, la SFE permite eliminar compuestos fuertemente adheridos a la fracción lipídica, por lo que el isómero *trans*-bixina (soluble en aceite vegetal por su característica lipofílica) podría eventualmente ser eliminado en la extracción. Sin embargo, la cantidad extraída de este isómero es mínima debido a que se encuentra en concentraciones traza de forma natural.

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

Cabe resaltar que las propiedades de solubilidad de los dos isómeros son diferentes debido a sus configuraciones geométricas. Por ejemplo, el momento dipolar del isómero *cis*- es mayor que el del *trans*-. Consecuentemente, la *cis*-bixina es más polar y se solubiliza en solventes orgánicos medianamente polares, mientras que el isómero *trans*- (menos polar) es afín a sustancias apolares.



**Figura 14.** Resultados del proceso SFE con obtención de dos productos, aceite de semilla y semillas desengrasadas.

Por su parte, reportes en la literatura muestran mediante análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM) que la superficie de las semillas luego del proceso SFE es más porosa, lo que facilita la posterior extracción del isómero *cis*-, debido a que queda más expuesto sobre la superficie. Inclusive, autores afirman que la bixina se encuentra en arilos sobre la superficie de las semillas, lo que implica que no es necesario de triturarlas para su posterior extracción por UAE (Rodrigues et al., 2014).

El segundo tipo de extracción usado fue UAE tal como se indicó en la sección 4.1.1.2, esta fue necesaria para extraer el isómero *cis*- que es soluble en solventes orgánicos medianamente polares. Entre ellos, se eligió el acetato de etilo porque se extrae la mayor cantidad de bixina, según

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

lo reportado por Cardarelli y colaboradores (Cardarelli et al., 2008). De esta manera, la UAE permitió obtener un extracto rico en *cis*-bixina y, por otro lado, semillas decoloradas (Ver **figura 15**).



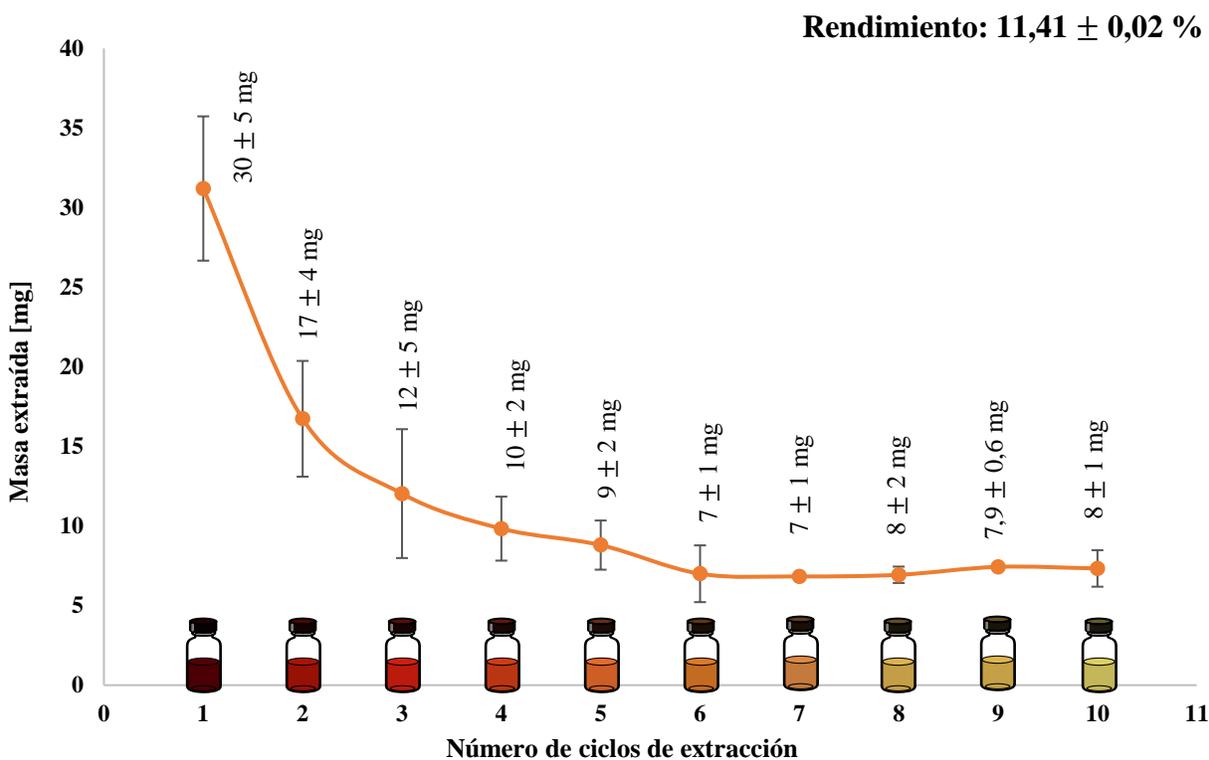
**Figura 15.** Resultados del proceso UAE con obtención de dos productos, semillas decoloradas y un extracto rico en *cis*-bixina, en donde  $n$ , corresponde al ciclo de extracción y  $m$ , al número de experimentos. Asimismo, se muestra una TLC evidenciando algunos de los compuestos extraídos.

Vale la pena resaltar que se emplearon ondas de ultrasonido porque permiten una extracción eficaz con tiempos de extracción cortos. Estas ondas inducen el fenómeno de cavitación, en el que, la energía emitida es suficiente para que el solvente forme microburbujas próximas a la superficie de la semilla, las cuales sufran implosión y con ello, permitan eliminar gran parte de las moléculas adheridas a la capa superficial de la semilla. Rodrigues y colaboradores demostraron esto mediante SEM, los autores muestran el efecto de cavitación en ciertas partes de la semilla y esto a su vez confirma la presencia de *cis*-bixina en el epicarpio de la semilla (Rodrigues et al., 2014). Asimismo, puede ocurrir un efecto sonocapilar, el cual se refiere al aumento de la profundidad y velocidad de penetración del solvente en los poros de las semillas producidos por SFE (Chemat et al., 2017). Esto permite que el solvente en caso de tener afinidad

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

por compuestos de capas más internas de la semilla, puedan ser extraídos sin ningún problema. Por ello, en la cromatografía de capa fina (TLC, por sus siglas en inglés) se observa la presencia de otros compuestos junto con *cis*-bixina (Ver **figura 15**). Muy probablemente las condiciones empleadas permitieron extracción de varios compuestos superficiales o no, afines al solvente usado (acetato de etilo). La extracción se llevó a cabo a temperatura ambiente con el fin de evitar posible descomposición del producto de interés, sin embargo, esta puede elevarse ligeramente para obtener un mayor rendimiento de extracción.

La masa obtenida en cada ciclo de extracción se muestra en la **figura 16**. Como era de esperarse, a medida que aumenta el ciclo de extracción, disminuye la cantidad de masa extraída. Sin embargo, la tonalidad e intensidad del color en cada ciclo no se correlaciona con la concentración de los compuestos extraídos, ya que posiblemente los extractos 7-10 almacenaban cierto porcentaje de humedad haciendo que la masa medida aumente y no se observe diferencia significativa como en los primeros extractos. No obstante, se observa que en el ciclo número 10 la masa extraída corresponde a un valor de  $8 \pm 1$  mg lo que indica que eventualmente en posteriores ciclos de extracción se puede obtener más extracto.

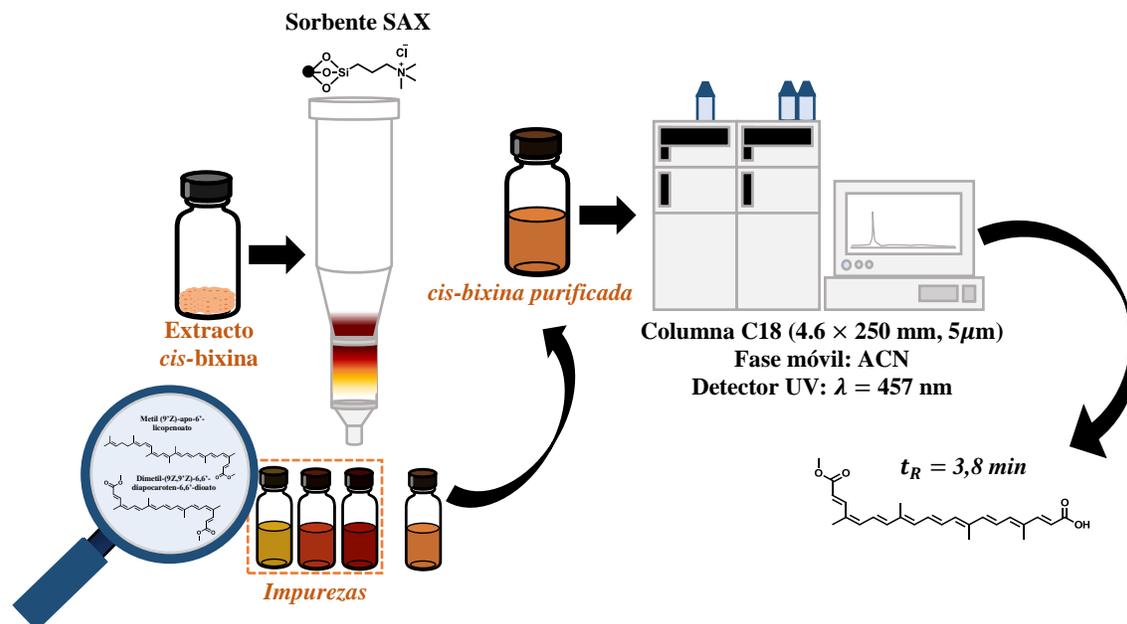


**Figura 16.** Masa extraída de las semillas *B. orellana* usando EtOAc como solvente, con un total de 10 extractos y obteniendo un rendimiento de extracción igual a  $11,41 \pm 0,02\%$ .

Finalmente, se utilizó la técnica de extracción en fase sólida (SPE) con el fin de purificar la *cis*-bixina (ver **figura 17**), como se explicó en la sección 4.1.1.3 de la metodología. Se eligió un sorbente de intercambio iónico por la naturaleza del analito de interés (presencia de un grupo ácido). De manera que ocurre una interacción entre dos especies cargadas, por un lado, una carga negativa proveniente de la *cis*-bixina, y por el otro, una carga positiva proveniente del sorbente SAX (amina cuaternaria). Cada uno de los disolventes pudieron fluir a través de la columna por gravedad ya que se trata de una matriz orgánica (no acuosa) que no requiere de un lecho sorbente con vacío, centrifugación o el uso de una presión positiva. La tasa de flujo escogida fue acorde al

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

tamaño del cartucho (10 mL), ello con el fin de evitar problemas como recuperaciones bajas por no retención adecuada del analito o no limpieza del extracto.



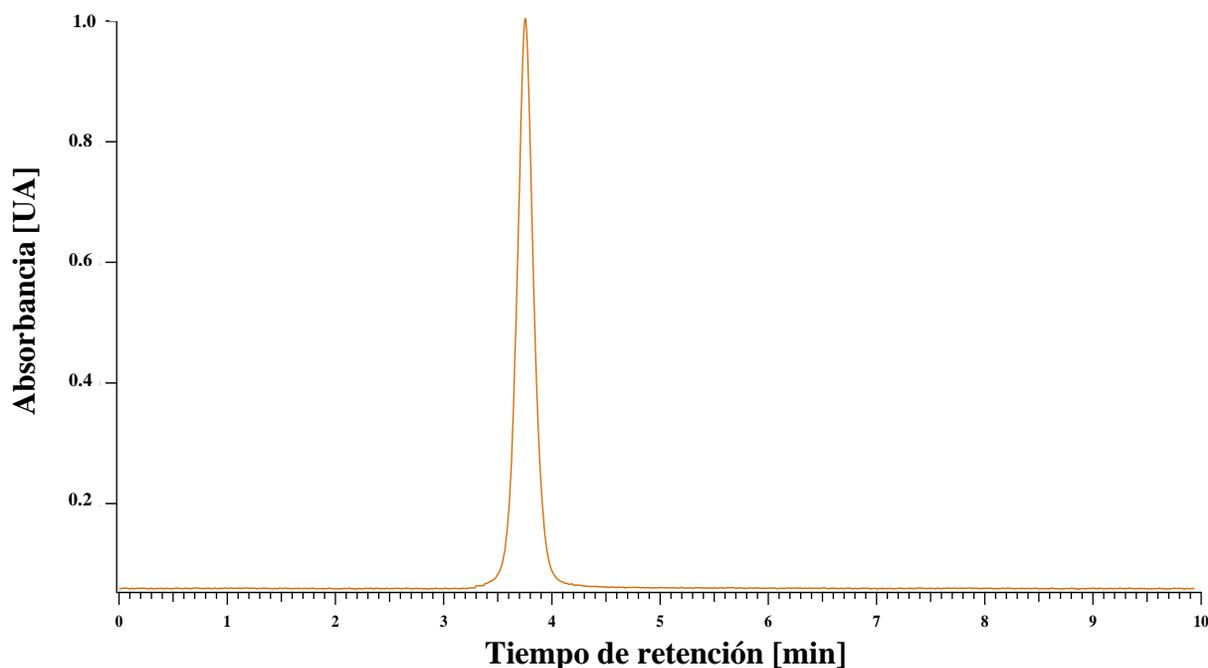
**Figura 17.** Resultados del proceso SPE, en el que las impurezas primero fueron eluidas y seguidamente el compuesto de interés, el cual se confirmó su purificación por análisis HPLC.

El procedimiento constó de 6 pasos, a saber; 1) pretratamiento de la muestra, 2) acondicionamiento de la columna, 3) equilibrado de la columna, 4) aplicación de la muestra, 5) lavado de la columna y, 6) elución del analito de interés. El pretratamiento de la muestra implicó diluir la muestra en metanol para reducir su viscosidad y además, elevar el pH 2,6 unidades por arriba del  $pK_a$  del analito *target* (4,69) con una solución de NaOH, para garantizar la presencia de iones. Posterior a ello, la adición del buffer al mismo pH de la muestra (tal como se indicó en la sección 4.1.1.3) fue necesario para asegurar la permanencia del compuesto de interés en su forma iónica. Los volúmenes de elución fueron bajos para no saturar el sistema y a su vez, para permitir

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

la existencia de una interfaz adecuada entre el sorbente y la muestra, de manera que exista mayor interacción entre los mismos. La muestra fue disuelta en un solvente polar para garantizar homogeneidad en la muestra. Asimismo, el paso 3 implicó establecer las mismas condiciones tanto en la columna como en la muestra, a fin de normalizar el sistema. La muestra fluyó con un caudal no mayor a 10 mL/min y como era de esperarse, el analito (en forma iónica) fue retenido por la amina cuaternaria que constituye el sorbente por interacción iónica. Finalmente, el paso 6 implicó disminuir el pH 2 unidades por debajo del  $pK_a$  del analito *target* para debilitar la interacción entre el sorbente y *cis*-bixina, en otras palabras, para garantizar la presencia del analito en forma de molécula (protonado), para luego ser eluido de la columna con un solvente afín, tal como se indicó en la metodología.

Ahora bien, la presencia de un solo pico en el cromatograma obtenido por HPLC permite corroborar la purificación del compuesto de interés, el cual eluyó con un tiempo de retención igual a 3,8 min (ver **figura 18**). Dicho valor es bajo por la poca interacción y/o afinidad entre la fase estacionaria (compuesta por una cadena larga de 18 carbonos) y la *cis*-bixina (compuesto principalmente por una cadena poliénica).



**Figura 18.** Resultados del análisis por HPLC para la elución de *cis*-bixina del cartucho SAX. El análisis se hizo en fase reversa, usado C<sub>18</sub> (4,6 × 250 mm, 5 μm) como fase estacionaria, ACN como fase móvil y detector UV con  $\lambda = 457$  nm.

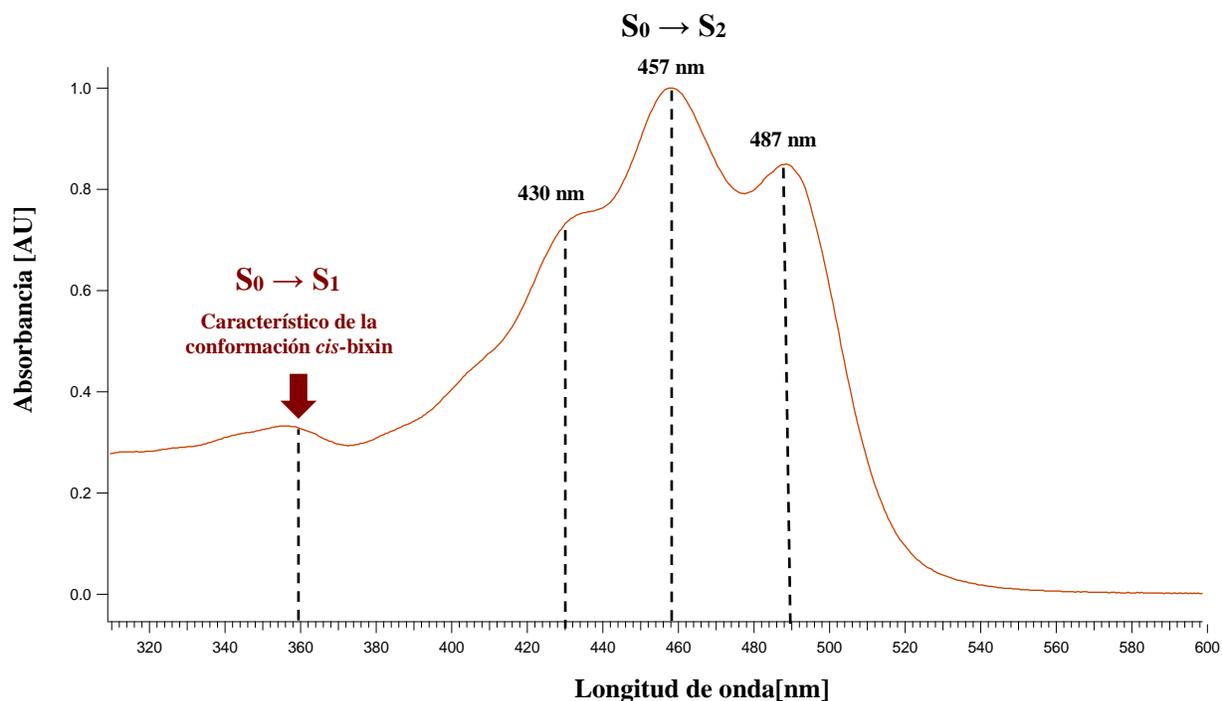
## 5.2 Caracterización espectroscópica de la bixina presente en las semillas de *Bixa orellana*

### 5.2.1 Espectroscopía UV-Vis

La espectroscopía UV-Vis brinda información sobre el cromóforo presente en la molécula de interés mediante análisis de transiciones electrónicas. De esta manera, el espectro de absorción UV-Vis del apocarotenoide *cis*-bixina muestra una transición electrónica principal (región visible) entre el orbital HOMO ( $\pi$ ) y el orbital LUMO ( $\pi^*$ ), es decir, una transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  (Kesan, 2016) en la región visible (ver **figura 19**), tal como ha sido reportado por otros autores (Dias et al., 2011; Fiedor et al., 2016; Rahmalia et al., 2014, 2015; Yusa Marco et al., 2008). Dicha transición ocurre

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

por la presencia de electrones  $\pi$  presentes en los orbitales p de los carbonos  $sp^2$  comprendidos en la cadena poliénica. La transición se ve favorecida por la presencia de una conjugación extendida de enlaces dobles (cromóforo extenso), los cuales disminuyen la brecha de energía entre los orbitales HOMO y LUMO, por lo que la radiación UV-Vis es suficiente para llevar a cabo la transición. De hecho, desde el punto de vista de la mecánica cuántica puede explicarse este fenómeno, la energía es inversamente proporcional al cuadrado de la longitud de conjugación (longitud de la caja), *i.e.*, a medida que aumenta la longitud de la cadena poliénica, la brecha de energía entre los orbitales comprendidos en la transición cada vez se hace menor (Kesan, 2016).



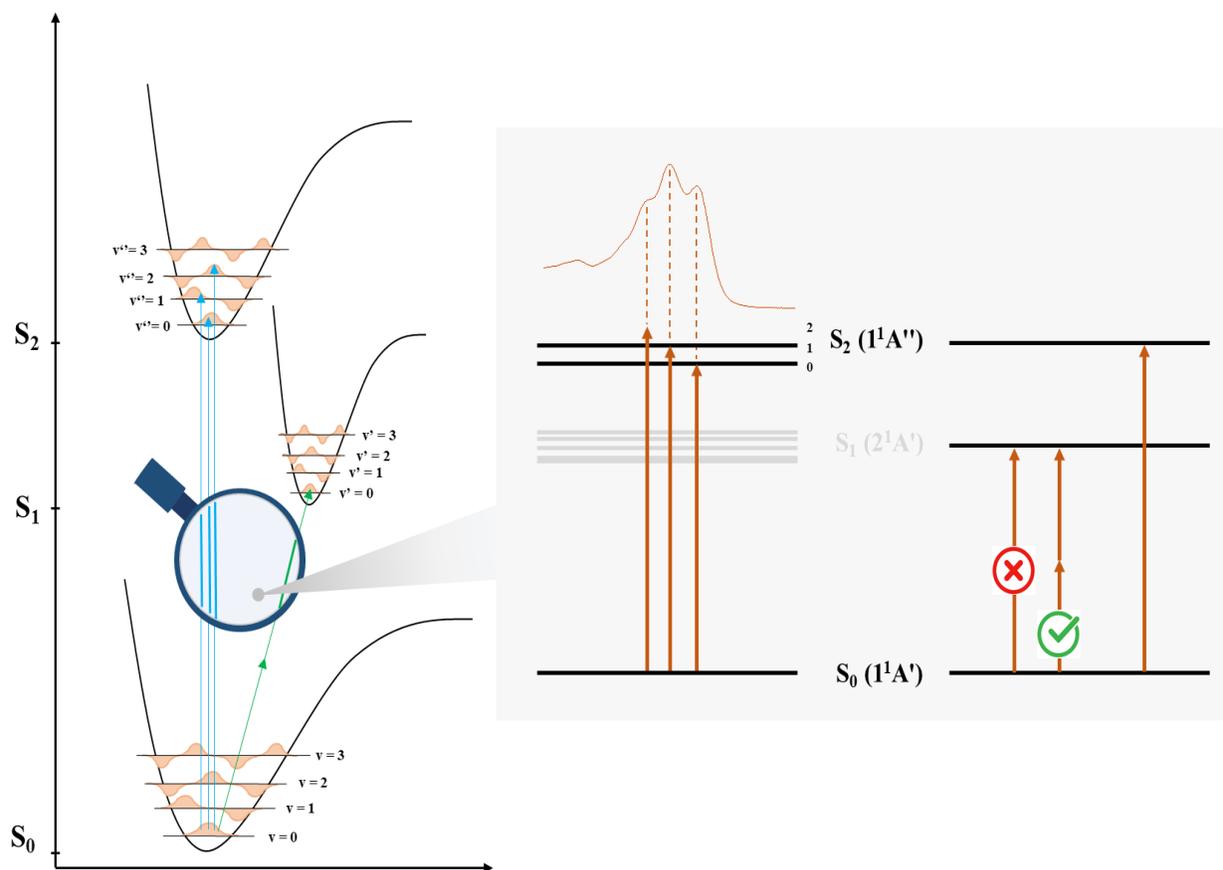
**Figura 19.** Espectro UV-Vis de cis-bixina en  $CHCl_3$  en un rango de 300 a 600 nm. Dos bandas principales son observadas, una correspondiente a la transición fuertemente permitida  $S_0 \rightarrow S_2$  y la otra, correspondiente al pico 'cis'  $S_0 \rightarrow S_1$ .

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

Ahora bien, la teoría de grupos permite hacer una aproximación válida porque define matemáticamente la simetría molecular del compuesto de interés (las propiedades de simetría de sus funciones de onda), sus estados electrónicos y los tipos de transiciones permitidas o prohibidas. El compuesto *cis*-bixina en una conformación específica tan solo tiene dos elementos de simetría, la identidad (E) y un plano horizontal ( $\sigma_h$ ), por lo tanto pertenece al grupo puntual  $C_s$  (Fiedor et al., 2016). Esto significa que sus representaciones irreducibles y por ende, sus estados electrónicos son  $1^1A'$  (estado basal) y  $2^1A'$ ,  $1^1A''$  (estados excitados). En este caso, todas las transiciones electrónicas son permitidas por simetría, sin embargo, la transición correspondiente a  $S_0 \rightarrow S_1$  (en la región UV) conocida como pico 'cis' permanece "oscura" (Fiedor et al., 2016). Esto se debe a que la absorción de un fotón no es energía suficiente para que un electrón salte del estado basal al primer estado excitado. Para ello, se requieren dos fotones con energía UV (Fiedor et al., 2019). De hecho, el proceso se facilita con la isomería *cis*- porque esta conformación disminuye la barrera energética comprendida entre los dos estados, razón por la cual su banda se observa en el espectro (ver **figura 19**). La transición  $S_0 \rightarrow S_1$  sucede de manera no vertical (ruptura de la aproximación Born-Oppenheimer), por lo tanto el acoplamiento vibrónico entre las funciones de onda que describen los modos vibracionales en las dos superficies de energía potencial (SEP), es mínimo. Esto tiene sentido porque la promoción de dos electrones (por la absorción de dos fotones) localizados en dos átomos de carbono consecutivos en la cadena poliénica del estado basal, induce un cambio de hibridación  $sp^2$  a  $sp^3$  en el esqueleto carbonado. De manera que se forma temporalmente un enlace simple que rota libremente y esta distorsión molecular es la causante de la barrera energética alta, por lo que, el mínimo de equilibrio en la SEP para  $S_1$  cambia considerablemente con respecto al mínimo de equilibrio en la SEP para  $S_0$  (Fiedor et al., 2019) (ver **figura 20**). Asimismo, el costo energético requerido para la transición  $S_0 \rightarrow S_1$  es muy alto

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

porque los dos electrones deben ser promovidos simultáneamente y debe romperse su correlación (paridad). De igual manera, cabe resaltar que el cambio de hibridación es necesario para que se produzca la intersección cónica entre los estados y el proceso se lleve a cabo satisfactoriamente (Fiedor et al., 2019).



**Figura 20.** Transiciones electrónicas en *cis*-bixina. Se muestra un resumen de los procesos involucrados en las transiciones  $S_0 \rightarrow S_1$  y  $S_0 \rightarrow S_2$ . Tomado y modificado de Fiedor et al., 2016, 2019.

En la isomería *cis*-, el acoplamiento vibrónico en la transición  $S_0 \rightarrow S_1$  se incrementa porque los mínimos de las SEP se acercan considerablemente, por tanto la barrera energética

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

disminuye y su transición se intensifica en el espectro. De hecho, a medida que se acerca al centro de la molécula, disminuye la barrera energética, la cual depende del número de electrones  $\pi$  en el sistema conjugado.

Por otro lado, la banda de absorción principal (en la región visible) brinda información estructural porque está determinada por el cromóforo de la molécula. Dicha transición ( $S_0 \rightarrow S_2$ ) exhibe una banda ancha de absorción comprendida entre 400 y 520 nm, y se divide en tres bandas vibratorias (modos vibracionales simétricos C = C y C-C), las cuales se diferencian muy bien por la conjugación extendida que se presenta en la molécula. Las bandas vibratorias corresponden a las transiciones  $S_0 \rightarrow S_2(v=0)$ ,  $S_0 \rightarrow S_2(v=1)$  y  $S_0 \rightarrow S_2(v=2)$ , las cuales suceden en femtosegundos. Asimismo, son bandas anchas debido a los niveles rotacionales y a la superposición de señales (Kesan, 2016) (ver **figura 20**).

Cabe resaltar que, el espectro de absorción de *cis*-bixina comparado con un carotenoide análogo (sin la presencia de grupos laterales), mostraría la existencia de un corrimiento batocrómico, ya que se trata de una molécula que extiende su conjugación por la presencia de los grupos ácidos y éster. Por consiguiente, se disminuye la brecha de energía entre los estados electrónicos y se aumenta la longitud de onda máxima de absorción (Kesan, 2016). Asimismo, por efecto del solvente puede verse implicado su desplazamiento, ya que un aumento en la polarizabilidad del mismo implica un mayor corrimiento batocrómico de las bandas  $\pi \rightarrow \pi^*$ . De igual manera, el solvente interfiere en la apariencia misma del espectro, por ello se eligió un solvente medianamente polar (cloroformo) que permitiera observar una buena resolución de las bandas vibratorias (Kesan, 2016).

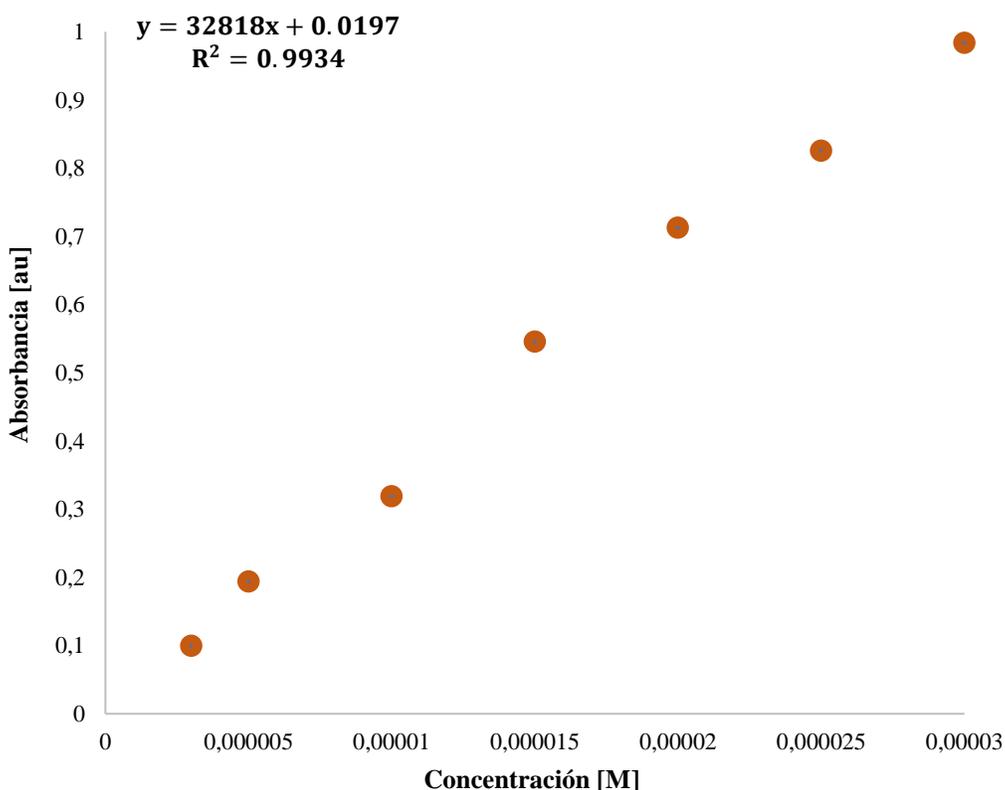
Por otro lado, si se comparara el espectro de absorción de los dos isómeros, se espera que haya un corrimiento hipocrómico en el espectro de *cis*-bixina por la presencia del pico 'cis'. Sus

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

intensidades con la banda de máxima absorción son inversas y su intensidad aumenta a medida que la curvatura sea más próxima al centro de la molécula.

Finalmente, el espectro UV-Vis permite explicar la coloración general (naranja-rojiza) de la bixina en general, ya que absorbe en las regiones azul y verde del espectro electromagnético (450-550 nm).

Ahora bien, el coeficiente de absortividad molar ( $\epsilon$ ) se calculó mediante la ecuación de Lambert-Beer (a una longitud de 355 nm), tal como se describió en la sección 4.1.2.1., de la metodología. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 21**. Se observa una tendencia lineal y un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) igual a 0,993, lo cual indica alta correlación en los resultados obtenidos.



**Figura 21.** Cálculo del coeficiente de absortividad molar para *cis*-bixina a  $\lambda = 355$  nm, obteniendo un valor igual a  $32818 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

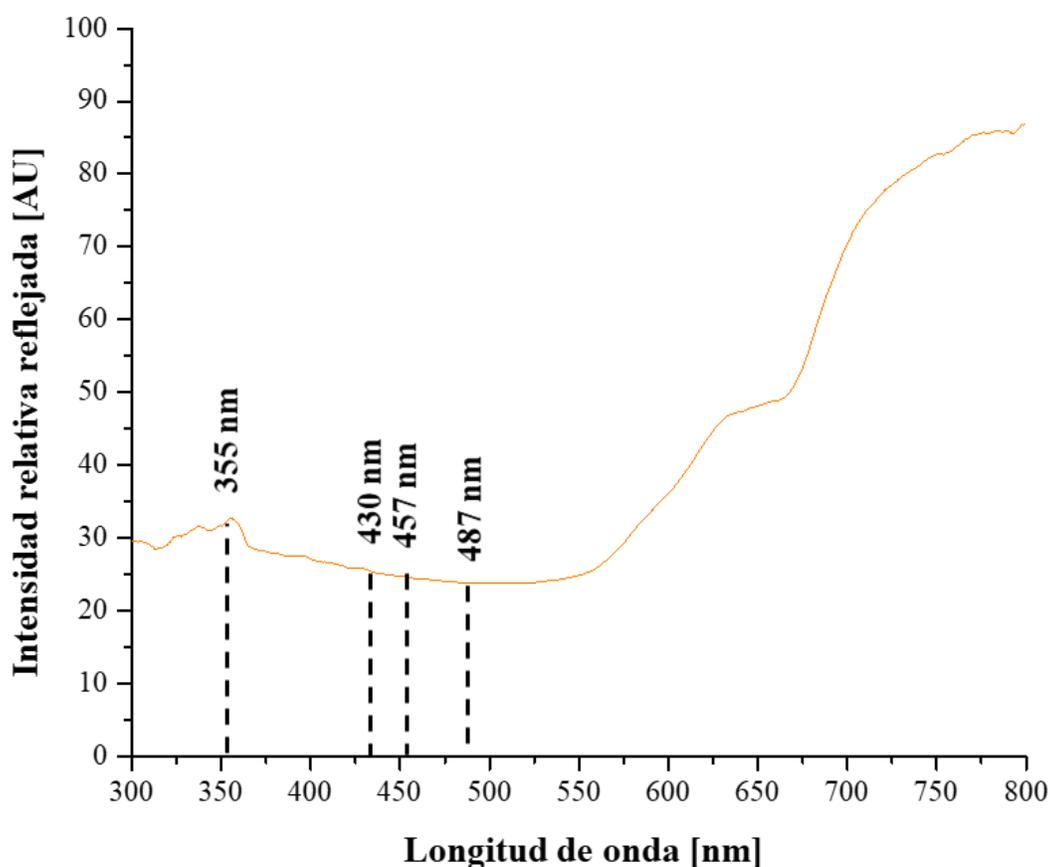
A partir de los datos graficados en la **Figura 21**, se determinó que la *cis*-bixina tiene un coeficiente de absortividad molar igual a  $32818 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , el cual corresponde aproximadamente a la tercera parte del valor obtenido por Tay-Agbozo, quien determinó el coeficiente a la longitud máxima de absorción usando  $\text{CHCl}_3$  como solvente, obteniendo un valor igual a  $1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Tay-Agbozo, 2018). El valor obtenido indica una buena eficiencia de absorción de fotones en estado líquido a la longitud de onda a la que emite radiación el láser MALDI. Incluso, su valor es comparable con los valores reportados por otros autores para derivados de fenilenvinilenos -H, - $\text{OCH}_3$ , -Cl, y matrices comerciales como DCTB, los cuales tienen valores de 38000, 41000, 32000 y  $33980 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  respectivamente (Godoy, 2019).

### 5.2.2 Espectroscopía de reflectancia difusa

La espectroscopía de reflectancia difusa brinda información de la energía absorbida y/o reflejada en estado sólido del compuesto de interés. De manera que su espectro se complementa con el espectro obtenido por espectroscopía de absorción UV-vis (**figuras 19 y 22**) (Hecht, 1976). Como es de esperarse, los espectros varían en intensidad, ya que mientras en una región de un espectro se absorbe, en la misma región del otro espectro, se refleja (es decir, no se absorbe o se absorbe poco) y viceversa. Por consiguiente, las transiciones electrónicas que suceden por absorción de energía son las mismas para ambos casos, pues se trata del estudio de la misma molécula. En la **figura 22** se observa el espectro de reflectancia difusa obtenido para *cis*-bixina donde se pueden observar regiones de mínima intensidad relativa reflejada para longitudes de onda que comprenden el rango entre 300 y 550 nm, y regiones de máxima intensidad relativa reflejada para longitudes de onda entre 550 y 800 nm. Como era de esperarse, los resultados obtenidos se relacionan con el espectro de absorción UV-Vis. El apocarotenoide absorbe

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

principalmente en la región visible (400 a 520 nm), razón por la cual, su intensidad relativa reflejada es mínima. Asimismo, la intensidad relativa reflejada ligeramente mayor en la región UV (340 a 370 nm) indica la absorción de radiación correspondiente al pico 'cis' y la máxima intensidad relativa reflejada en la región de 520 a 800 nm indica una baja absorción en el espectro UV-Vis. De esta manera, se observa que la proporción de intensidades se mantiene, por lo tanto, a mayor intensidad relativa reflejada en el espectro de reflectancia difusa menor absorción en el espectro UV-Vis y viceversa.



**Figura 22.** Espectro UV-Vis de reflectancia difusa para *cis*-bixina en un rango de 300 a 800 nm.

Su principio se fundamentó en el hecho de que la muestra se incidió con radiación UV-Vis e infrarrojo cercano en un ángulo de  $0^\circ$ . Luego del proceso de absorción, se reflejó radiación en

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

diferentes direcciones por reflexión difusa (sobre las capas más profundas) o en una única dirección por reflexión especular (sobre la superficie). Finalmente, la geometría de la esfera integradora permitió medir la radiación emitida por reflexión difusa y desechar la radiación emitida por reflexión especular, de manera que se obtuvo un espectro de reflectancia difusa preciso con reflectancia relativa al sulfato de bario (usado como blanco estándar).

Por último, mediante este análisis se concluye que la *cis*-bixina absorbe considerable cantidad de energía a la longitud de onda de emisión del láser MALDI ( $\lambda = 355$  nm), por lo que su potencial desempeño como matriz se puede ver favorecido. Sin embargo, su valor de intensidad relativa reflejada (32) no es comparable con los valores reportados para DCTB (1) (Godoy, 2019).

### **5.2.3 Rendimiento cuántico de fluorescencia (FQY)**

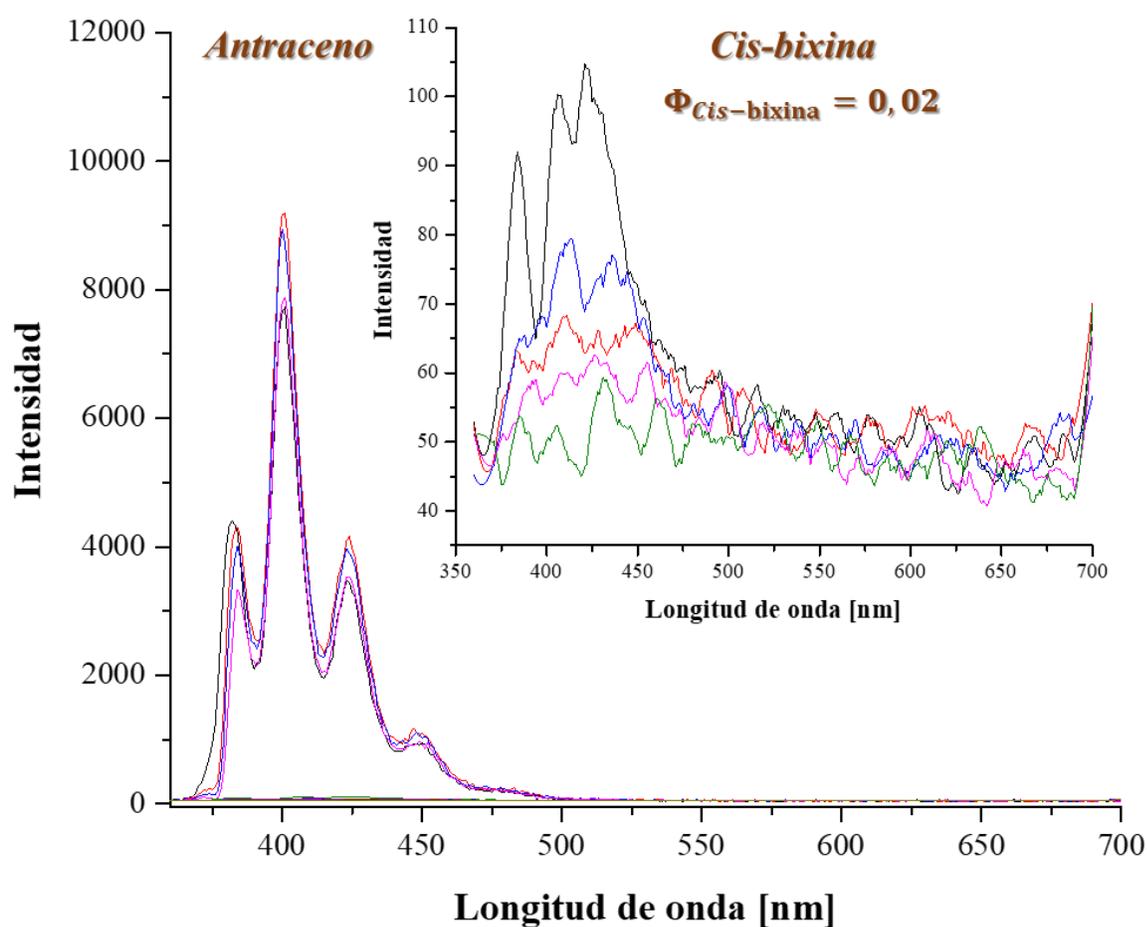
El FQY se entiende como la eficiencia con que un sistema se relaja por fluorescencia y no por un mecanismo no radiativo, es decir, la probabilidad con que un sistema en estado excitado regrese a su estado fundamental con emisión de fotones (Limited, 2011; Rurack & Spieles, 2011). Esta propiedad brinda información relacionada con la capacidad de un sólido para emitir fotones o para calentarse y expandirse, ambos procesos importantes durante el proceso MALDI. El análisis del FQY se realizó de acuerdo con planteado en la sección 4.1.2.3. de la metodología. Los resultados se muestran en la **figura 23**.

El método comparativo reportado por Williams y colaboradores (Rhys Williams et al., 1983) fue usado para calcular el  $\Phi_R$  del compuesto de interés, *cis*-bixina. Se usó el antraceno como muestra estándar, con  $\Phi_{ST}$  igual a 0,29 (Barros et al., 2019) y la ecuación 14 para calcularlo, como se describió en la sección 4.1.2.3 de la metodología. Para ello, la concentración empleada fue muy baja (con absorbancia no superior a 0,1) con el fin de evitar los efectos de reabsorción, el efecto

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

de filtro interno y mantener la linealidad en todo el rango de concentración (Dhami et al., 1995; Kumar Panigrahi & Kumar Mishra, 2019)

Como se observa en la **figura 23**, se obtuvo un rendimiento cuántico de fluorescencia muy bajo debido al tiempo que dura la molécula en el estado excitado, de manera que prefiere residir en la relajación vía conversión interna. Sin embargo, estudios han demostrado que el tiempo puede incrementarse dependiendo el solvente y el grado de conjugación del compuesto estudiado (Andersson et al., 2001).



**Figura 23.** Espectros de fluorescencia para las soluciones (0,6 a 3  $\mu$ M) de antraceno en etanol y *cis*-bixina en diclorometano

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

Cabe resaltar que una molécula puede desactivarse por medio de tres rutas, saber; por fluorescencia (pérdida de energía por emisión de fotones), por conversión interna y relajación vibratoria (pérdida de energía de forma no radiativa con emisión de calor hacia el entorno), o por cruce entre sistemas a un estado triplete y posterior desactivación no radiativa (Limited, 2011). De acuerdo con los resultados obtenidos, *cis*-bixina se relaja por conversión interna y relajación vibratoria, ya que se observa un valor  $\Phi_R$  muy bajo (0,02 o 2%), también atribuido a una severa deformación de la estructura planar del compuesto (Heller, 1964). De hecho, la fluorescencia en los carotenoides se produce con un rendimiento muy bajo, no hay entrecruzamiento entre sistemas para producir estados triplete, y las desactivaciones  $S_2-S_1$  y  $S_1-S_0$  suceden por conversión interna (decaimiento no radiativo) (Llansola-Portoles et al., 2017).

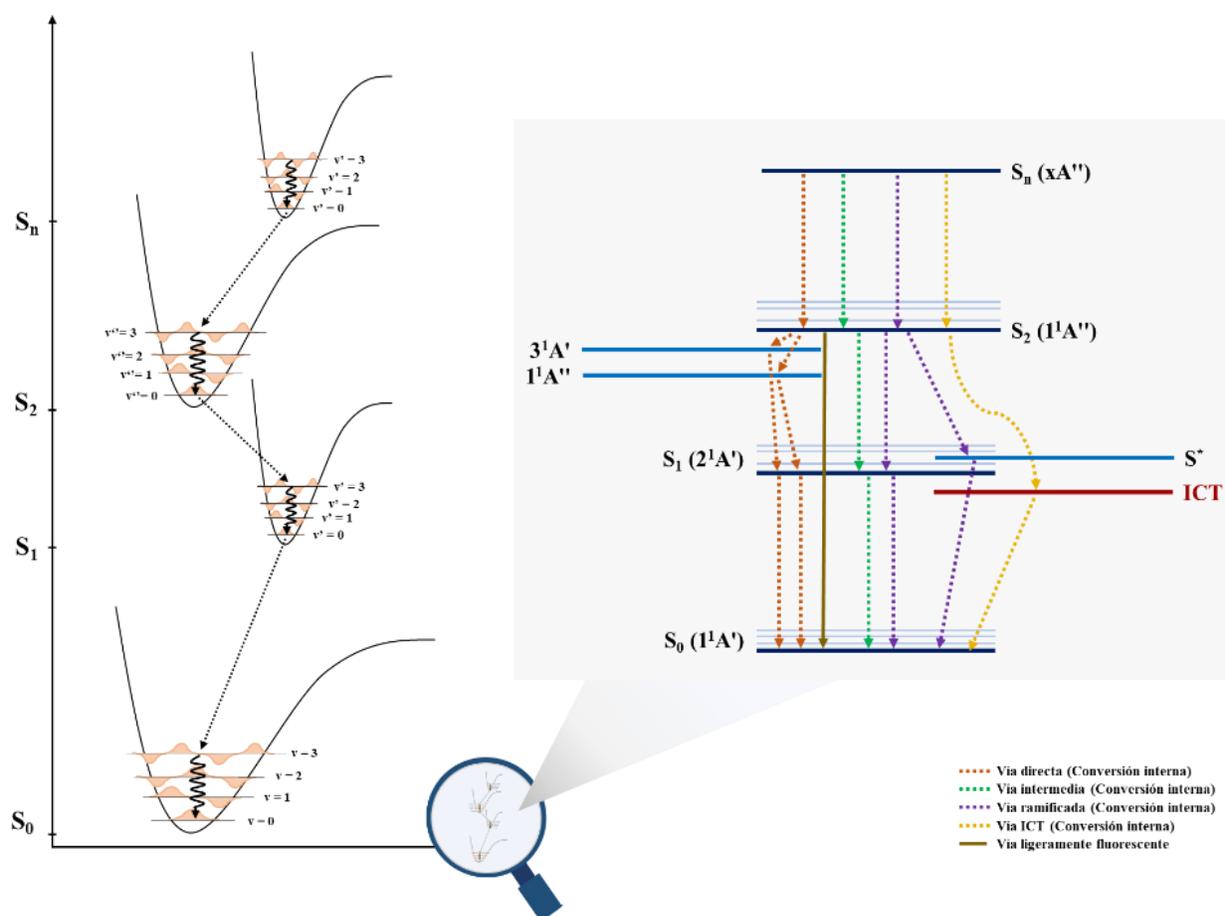
Estos resultados son consistentes con la literatura, algunos autores reportan que para carotenoides con nueve enlaces dobles o más, tan sólo una pequeña fracción de las moléculas excitadas en  $S_2$ , se relajan al estado basal con emisión de fotones (Andersson et al., 2001) (Ver **figura 24**).

Asimismo, se ha reportado la existencia de estados electrónicos “oscuros” ( $3^1A'$ ,  $1^1A''$ ,  $S^*$ , ICT) usados por la molécula para relajarse por conversión interna, (Kesan, 2016) a excepción del ICT (transferencia de carga intramolecular) que generalmente se asocia con fluorescencia (Ver **figura 24**). Estos estados electrónicos “oscuros” corresponden a un estado independiente o un estado tipo  $S_1$ /ICT que se forma por la presencia de carbonilos en la estructura molecular y el uso de solventes polares para la medición. Surge por una relajación rotacional acompañada de una transferencia de electrones desde un donante a un aceptor deficiente en la misma molécula (Misra,

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

2018). Estas vías de relajación dependen del solvente y su polarizabilidad (a mayor polaridad, mayor transferencia de carga) (Ragnoni et al., 2015).

Recientemente se ha encontrado que los carotenoides se relajan por conversión interna mediante tres vías, a saber; vía directa ( $S_2 \rightarrow S_1 \rightarrow S_0$ ), la cual opera en carotenoides cortos, vía intermediada ( $S_2 \rightarrow 1^1A'' \rightarrow S_1 \rightarrow S_0$  o  $S_2 \rightarrow 3^1A' \rightarrow S_1 \rightarrow S_0$ ) que involucra estados intermedios y, la vía ramificada, en la que parte de la población excitada se relaja vía  $S_2 \rightarrow S^* \rightarrow S_0$ , y la otra parte como vía directa (Tomáš Polívka & Sundström, 2004) (Ver **figura 24**).



**Figura 24.** Posibles mecanismos de relajación, principalmente por conversión interna, para el compuesto de interés, *cis*-bixina. Tomado y modificado de Tomáš Polívka & Sundström, 2009.

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

La conversión interna  $S_2-S_1$  ocurre de manera ultrarrápida debido a una intersección cónica entre las superficies de energía potencial de dichos estados, de manera que el acoplamiento vibrónico se hace intenso y la brecha entre los mismos disminuye (Tomáš Polívka & Sundström, 2004). Se encontró que existen estados intermedios que sirven de “puente de acoplamiento vibratorio” para facilitar la conversión interna entre  $S_2$  y  $S_1$ . En donde, la conversión interna  $S_2 \rightarrow 1^1A''$  sucede en el nivel vibratorio  $v = 1$  de  $1^1A''$  y la siguiente relajación ( $1^1A'' \rightarrow S_1$ ) sucede en el nivel vibratorio  $v = 3$  de  $S_1$  (Ver **figura 24**). Lo anterior, para carotenoides con 9 y 10 enlaces dobles conjugados, en los que  $1^1A''$  está ligeramente por debajo de  $S_2$ . Para carotenoides más largos, el estado  $1^1A''$  se encuentra muy por debajo de  $S_2$ , por tanto, la vía de relajación es mediada por  $3^1A'$ , quien se encuentra ligeramente por debajo de  $S_2$ , con tiempos de vida aún más cortos (10 fs) (Tomáš Polívka & Sundström, 2004) (Ver **figura 24**). Por otro lado, se encontró que el estado  $S^*$  aparece notoriamente cuando el carotenoide se une a proteínas captadoras de luz. Su tiempo de vida es 6 ps y está ubicado por debajo y separado de  $S_1$ , de manera que no representa un estado intermedio. Asimismo, se encontró que su energía es bastante cercana a  $S_1$  y no interactúa con este, ya que  $S^*$  solo aparece cuando se excitan niveles vibratorios más altos de  $S_2$  (Tomáš Polívka & Sundström, 2004) y se origina con una conformación retorcida del carotenoide (estado electrónico excitado separado) o por un estado fundamental caliente (Tomáš Polívka & Sundström, 2009).

Por último, el estado excitado ( $S_1$ ) se desactiva una vez más por conversión interna (en picosegundos) al estado basal ( $S_0$ ) que está asociado a un cambio en la frecuencia de estiramiento  $C = C$  para permitir el acoplamiento vibrónico  $S_1-S_0$  (Hashimoto et al., 2018). De hecho, estudios han demostrado que la conversión interna  $S_1$  a  $S_0$  aumenta a medida que disminuye la brecha de

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

energía entre dichos estados (Andersson et al., 2001), la cual se relaciona con la longitud del polieno conjugado (Ver **figura 24**).

Ahora bien, en MS MALDI, el tiempo de vida media de los estados excitados para matrices comerciales, ocurre en una escala de pocos nanosegundos (Zenobi & Knochenmuss, 1998), mientras que para *cis*-bixina, ocurre en una escala de femtosegundos a picosegundos. Esto indica que usando *cis*-bixina como matriz, se requiere de una interacción ultrarrápida matriz-analito para transferir la carga. No obstante, el tiempo es más que suficiente porque el tiempo de permanencia de los iones en la fuente está en la escala de microsegundos.

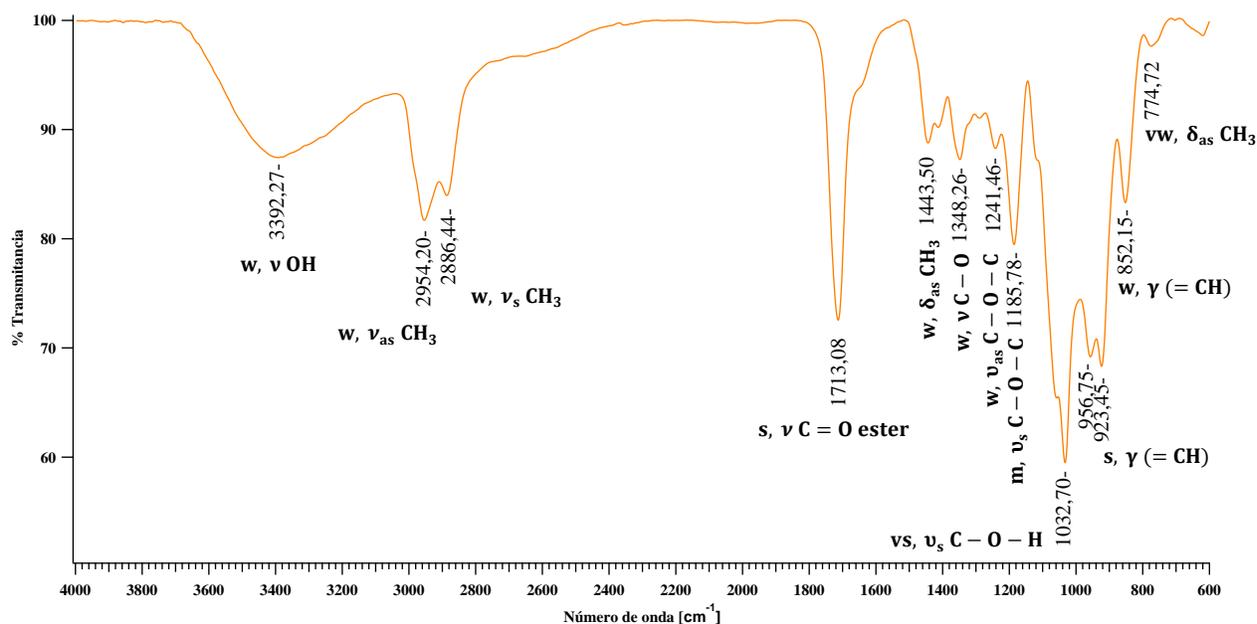
Ahora bien, el bajo rendimiento cuántico de *cis*-bixina indica que se desactiva de manera no radiativa, lo cual es interesante desde el punto de vista de la espectrometría de masas, las matrices MALDI cuya relajación es térmica, favorecen la liberación de iones a la fase gaseosa, y permiten la transferencia de protones o cationes, *i.e.*, la formación de iones secundarios (Hoteling et al., 2006). De acuerdo con el valor de rendimiento cuántico, *cis*-bixina permitiría el análisis de moléculas que puedan ionizarse vía transferencia protónica o catiónica en MALDI MS. En el caso contrario, analitos sin sitios de protonación o cationización, la relajación térmica propia de *cis*-bixina favorecerá la fragmentación y eventualmente dificultará el análisis (Castellanos, 2015).

### ***5.2.4 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)***

La espectroscopía infrarroja brinda información sobre la estructura molecular del compuesto de interés. Esto implica el análisis de las transiciones entre niveles energéticos vibracionales (que son únicos para cada molécula) por la absorción de radiación de infrarrojo medio (4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ ). De esta manera, se obtienen bandas que se caracterizan por su frecuencia (energía), forma, intensidad y cuyas frecuencias dependen de las masas de los átomos, su

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

disposición geométrica y fuerza de los enlaces químicos implicados. Con base en lo anterior, se tomó el espectro FTIR para *cis*-bixina, tal como se describió en la sección 4.1.2.4 de la metodología (ver **figura 25**).



**Figura 25.** Espectro FT-IR para *cis*-bixina en un rango de 4000 a 700 cm<sup>-1</sup>. En donde ν: estiramiento; δ: tensión en el plano; γ: flexión fuera del plano; vs: Intensidad muy fuerte (81-100%); s: intensidad fuerte (61-80%); m: intensidad media (41-60%); w: intensidad baja (21-40%) y vw: intensidad muy baja (0-20%).

En el espectro mostrado en la **Figura 25**, se observa una banda de baja intensidad en 3392,27 cm<sup>-1</sup> correspondiente a la vibración de estiramiento -O - H presente en el grupo ácido de la molécula. Asimismo, se observan las bandas en 2954,20 y 2886,44 cm<sup>-1</sup> correspondientes a estiramientos asimétricos y simétricos respectivamente, del enlace -C - H en los metilos presentes en la cadena poliénica. Una banda intensa a 1713,08 cm<sup>-1</sup> corresponde a la frecuencia de estiramiento del carbonilo (C = O) presente en el grupo éster, la cual se solapa con la banda

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

correspondiente al carbonilo del grupo ácido. La presencia del grupo éster se confirma con las bandas en 1241,46 y 1185,78  $\text{cm}^{-1}$ , las cuales corresponden a estiramientos asimétricos y simétricos  $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ , respectivamente. Por su parte, el grupo ácido se confirma con la banda muy intensa a 1032,70  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento simétrico  $-\text{C}-\text{O}-\text{H}$ . De igual manera, el enlace  $-\text{C}-\text{O}-$  se confirma por la banda en 1348,26  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a su estiramiento. Por último, las bandas en 1443,50 y 774,72  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a la tensión asimétrica en el plano de  $-\text{CH}_3$ ; y las bandas intensas a 956,75  $\text{cm}^{-1}$ , 923,45  $\text{cm}^{-1}$  y la banda en 852,15  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a la flexión fuera del plano de los hidrógenos de  $=\text{C}-\text{H}$  en la cadena poliénica. Asimismo, otros autores han reportado la caracterización de *cis*-bixina mediante FT-IR (Isaza Jiménez et al., 2019; Rahmalia et al., 2015; Yusa Marco et al., 2008), cuyo análisis es consistente con lo reportado en esta sección.

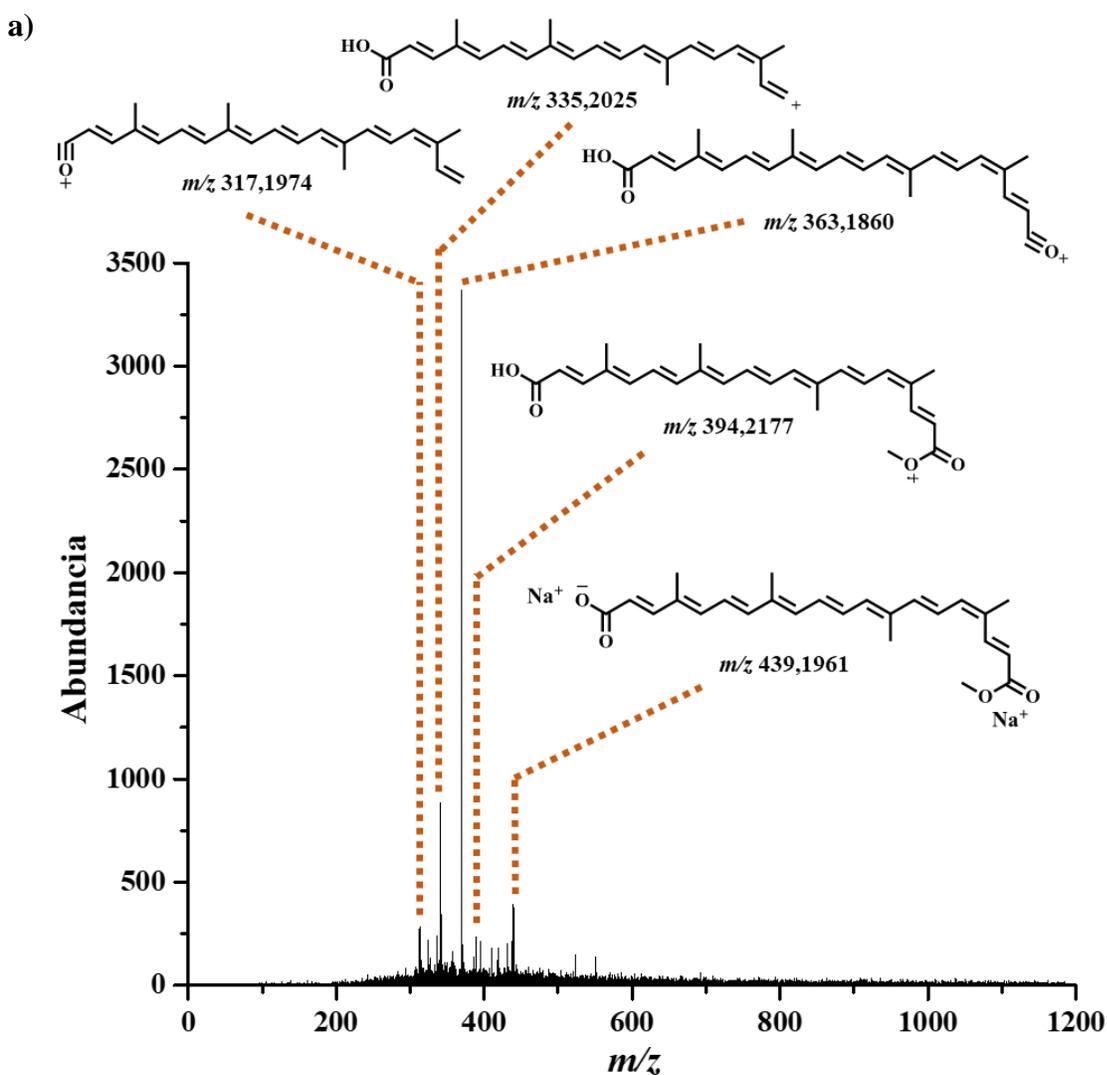
### 5.2.5 Espectrometría de masas LDI

Con el fin de confirmar el aislamiento y la purificación del compuesto de interés, se analizó el espectro LDI en modo de iones positivo medido para *cis*-bixina como se muestra en la **figura 26**, el cual se tomó como se mencionó con la sección 4.1.2.5, de la metodología. En el espectro LDI de *cis*-bixina ( $\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{O}_4$ ), se observa la presencia de algunas señales, la más abundante en  $m/z$  363,1860 (ion pico de base) correspondiente al fragmento  $[\text{M}-\text{OCH}_3]^+$ . En el espectro LDI no se observan agregados u oligómeros del compuesto, lo cual implica que las condiciones en MALDI MS no son suficientes para generar la aglomeración de dos o más moléculas de *cis*-bixina.

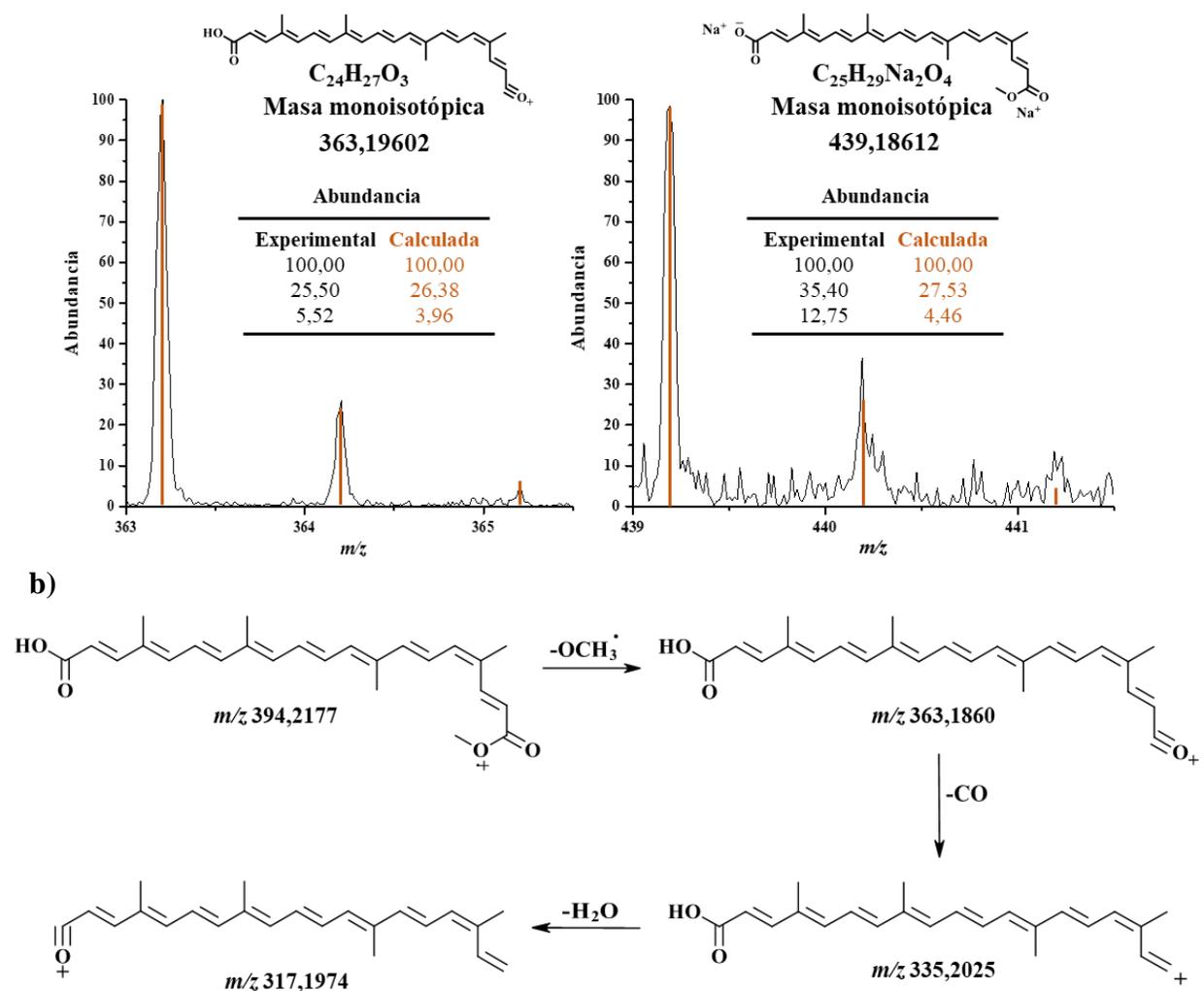
Por otro lado, en el espectro LDI mostrado en la **figura 26a**, se observa la formación de aductos de *cis*-bixina ( $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_4$ ), con el catión metálico sodio presente en el medio,  $[\text{M}-\text{H}+2\text{Na}]^+$ , a  $m/z$  439,1961 con una abundancia baja. De igual manera, se observa el catión radical a  $m/z$

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

394,2177 con una abundancia baja, lo cual indica una baja estabilidad del catión radical de *cis*-bixina ( $C_{25}H_{30}O_4$ ) en fase gaseosa. Asimismo, se observan fragmentaciones por ruptura simple a  $m/z$  363,1860, 335,2025 y 317,1974 correspondientes a las pérdidas de  $-OCH_3$ ,  $-COOCH_3$  y  $-[COOCH_3 + H_2O]$ , respectivamente (Ver **figura 26b**). Las cuales, ya han sido reportadas por otros autores como el patrón de fragmentación para *cis*-bixina en modo de ionización positivo (Chisté et al., 2011; de Oliveira Júnior et al., 2019).



## PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES



**Figura 26.** Espectro de masas LDI en modo de iones positivo para *cis*-bixina 2,5mM en un rango  $m/z$  de 0 a 1200, una incidencia del láser igual a 50  $\mu$ J y un volumen igual a 1 $\mu$ L depositado sobre el target MALDI. Los acercamientos corresponden a los patrones isotópicos de la señal más abundante y el aducto de sodio (a). Asimismo, patrón de fragmentación para *cis*-bixina en modo de ionización positiva (b).

Con base en lo anterior, en la **tabla 2** se resume el valor de masa experimental y masa calculada para cada señal, con su respectiva exactitud relativa de la masa, S/N y patrón isotópico.

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

**Tabla 2.** Señales observadas en el espectro de masas LDI de *cis*-bixina en modo de ionización positiva, con su respectiva masa experimental, masa calculada, exactitud relativa en la masa, S/N y patrón isotópico.

Especie química detectada	Fórmula molecular	Masa experimental	Masa calculada	$\Delta$ ppm	S/N	Patrón Isotópico
$[M-(COOCH_3 + H_2O)]^+$	$C_{23}H_{25}O$	317,1974	317,1905	21,7	8,4	317,1974; 318,1988; 319,1928
$[M-COOCH_3]^+$	$C_{23}H_{27}O_2$	335,2025	335,2011	4,2	26,8	335,2025; 336,2075; 337,2036
$[M-OCH_3]^+$	$C_{24}H_{27}O_3$	363,1860	363,1960	27,5	106,0	368,1860; 369,1875; 370,1823
$M^+$	$C_{25}H_{30}O_4$	394,2177	394,2144	8,4	7,8	394,2177; 395,2154; 396,2145
$[M-H+2Na]^+$	$C_{25}H_{29}Na_2O_4$	439,1961	439,1861	22,8	13,7	439,1961; 440,1934; 441,1993

El patrón isotópico de la señal más abundante ( $C_{24}H_{27}O_3$ ) y la señal correspondiente al aducto de sodio ( $C_{25}H_{29}Na_2O_4$ ) coinciden con los patrones isotópicos calculados con uno y dos isótopos de  $^{13}C$ , lo cual confirma la detección de especies químicas para *cis*-bixina ( $C_{25}H_{30}O_4$ ) (Ver figura 26a).

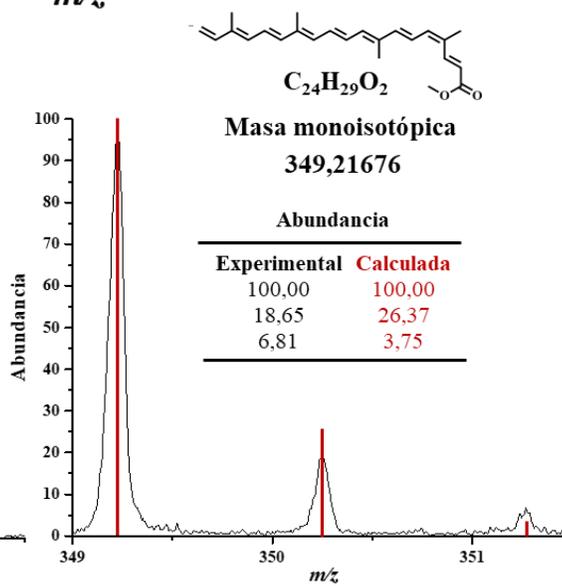
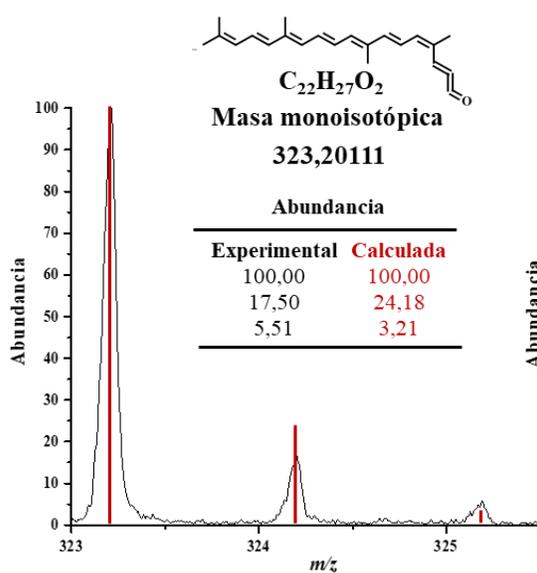
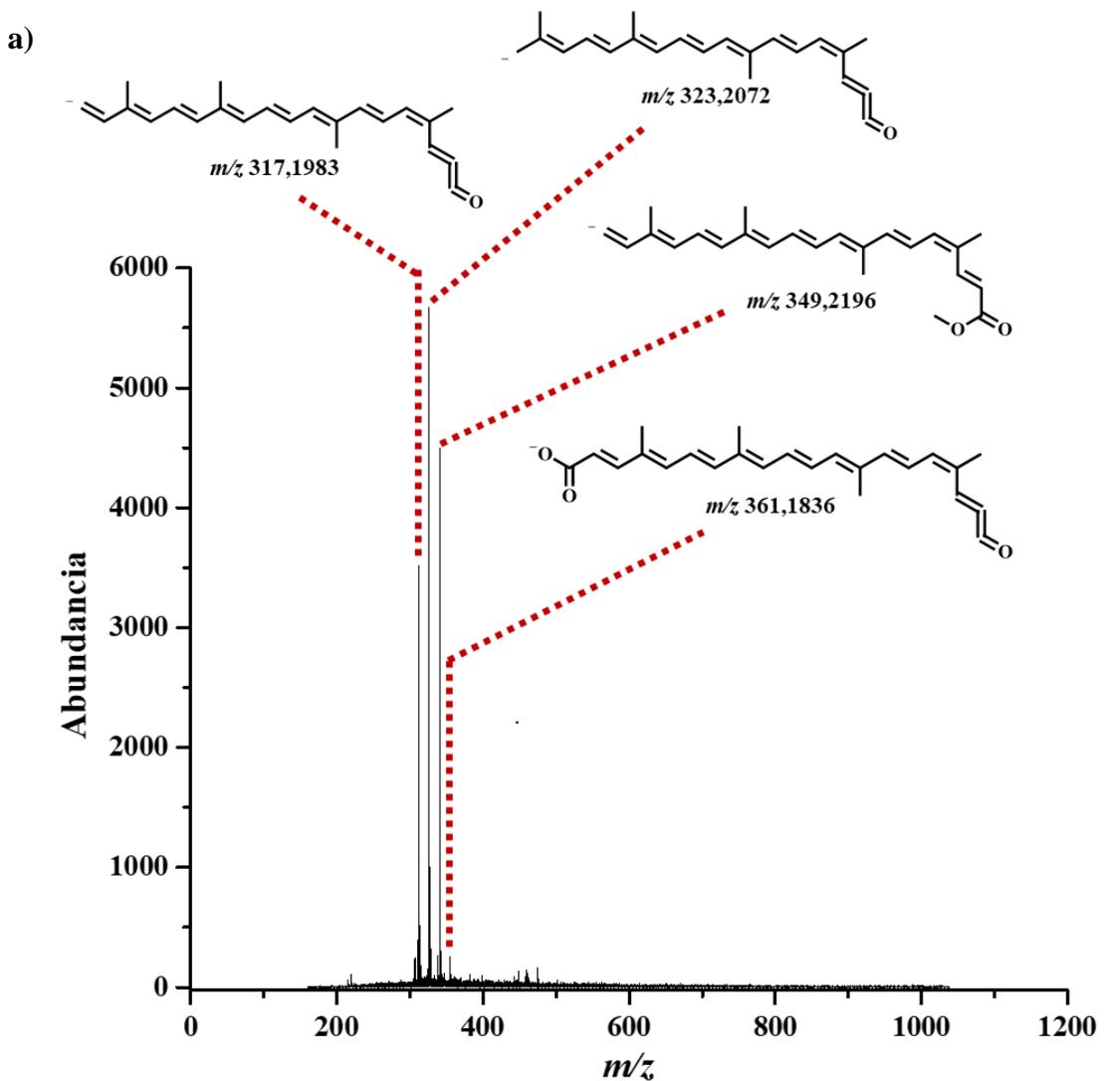
## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

Se observa que a zonas de masas bajas y altas no hay presencia de señales, por lo que la *cis*-bixina puede ser potencialmente usada como matriz MALDI para caracterizar analitos de bajo y alto molecular sin llegar a interferir en su análisis. Contrariamente a lo que sucede con matrices comerciales como DCTB (ver **anexo A**) y 9-nitroantraceno, las cuales forman aductos en abundancia (Streletskii et al., 2005; Streletskiy et al., 2004; Ulmer et al., 2000).

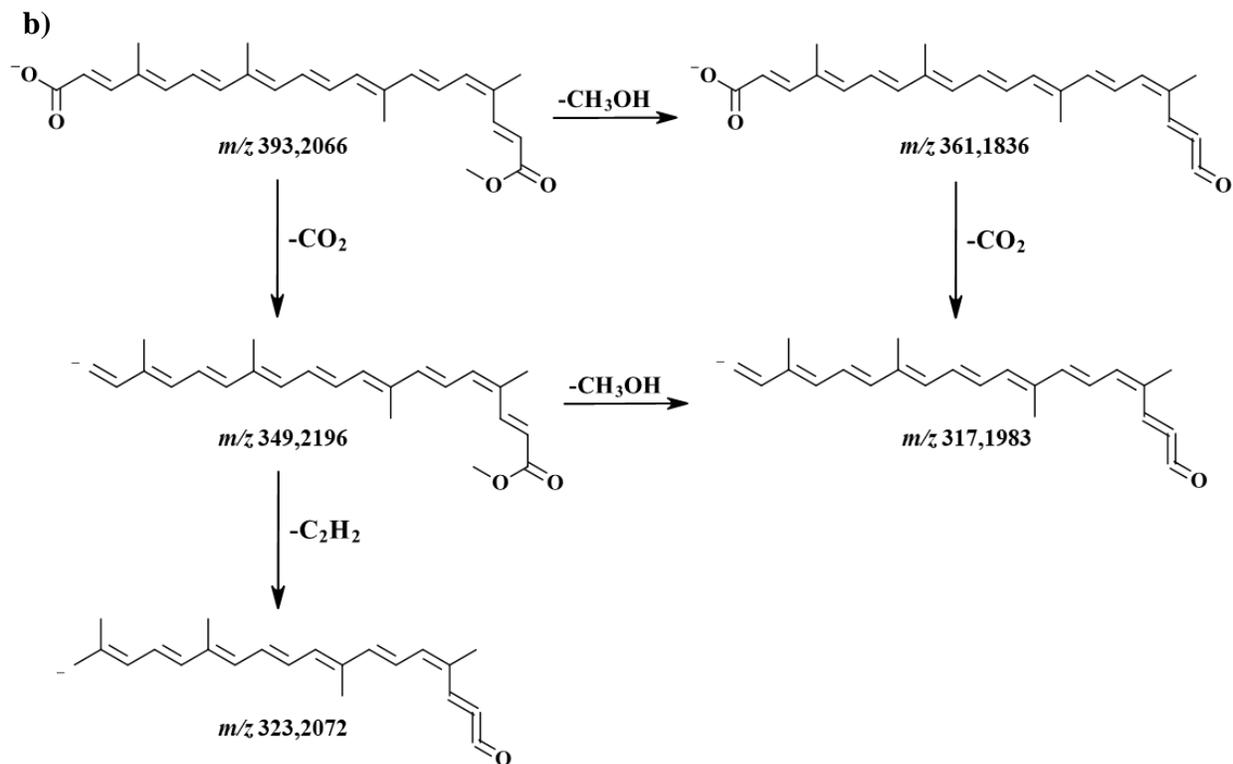
Cabe resaltar que las variaciones de energía y la presencia de agua o cualquier otro solvente prótico influyen en la presencia de iones protonados  $[M+H]^+$  o cationes radicales  $M^+$  en el espectro de masas. Por consiguiente, a condiciones de 50  $\mu$ J por disparo del láser, *cis*-bixina no se observa principalmente como catión radical, contrariamente a lo que sucede con carotenoides analizados por *ESI* como  $\beta$ -caroteno (Guaratini et al., 2004). Ahora bien, el modo de ionización fue suave y no se observa el compuesto de interés doblemente cargado, lo cual indica su estabilidad por resonancia (efecto mesomérico) y alta conjugación.

De igual manera se analizó el espectro LDI en modo de iones negativo, el cual se muestra en la **figura 27a**. Se observa la presencia de muy pocas señales correspondientes a fragmentos de *cis*-bixina. El ion pico base a  $m/z$  323,2072 corresponde al fragmento  $[M-H-(COO\cdot + C_2H_2)]$ , muy estable por resonancia. Asimismo, se observan señales a  $m/z$  361,1836, 349,2196 y 317,1983 correspondientes a las pérdidas de  $-H-CH_3OH$ ,  $-H-COO\cdot$  y  $-H-[CH_3OH + COO\cdot]$ , respectivamente (Ver **figura 27b**). Las cuales, ya han sido reportadas por otros autores como el patrón de fragmentación para *cis*-bixina en modo de ionización negativo (Chisté et al., 2011).

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES



## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES



**Figura 27.** Espectro de masas LDI en modo de iones negativo para *cis*-bixina 2,5mM en un rango  $m/z$  de 0 a 1200, una incidencia del láser igual a 50  $\mu$ J y un volumen igual a 1 $\mu$ L depositado sobre el target MALDI. Los acercamientos corresponden a los patrones isotópicos de las señales más abundantes (a). Asimismo, patrón de fragmentación para *cis*-bixina en modo de ionización negativa (b).

Así como sucede en modo de iones positivo, no se observan agregados u oligómeros del compuesto. Tampoco se observa el anión radical, lo cual establece una baja estabilidad del  $M^{\cdot-}$  de *cis*-bixina en fase gaseosa. Por su parte, el patrón isotópico de las señales más abundantes ( $C_{22}H_{27}O_2$  y  $C_{24}H_{29}O_2$ ) coinciden con los patrones isotópicos calculados con uno y dos isótopos de  $^{13}C$ , lo cual confirma la detección de especies químicas para *cis*-bixina ( $C_{25}H_{30}O_4$ ) en modo de ionización negativa (Ver figura 27a).

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

De esta manera, en la **tabla 3** se resume los valores de masa experimental y masa calculada para cada especie química detectada, con su respectiva exactitud relativa en la masa, S/N y patrón isotópico.

**Tabla 3.** Señales observadas en el espectro de masas LDI de *cis*-bixina en modo de ionización negativa, con su respectiva masa experimental, masa calculada, exactitud relativa en la masa, S/N y patrón isotópico.

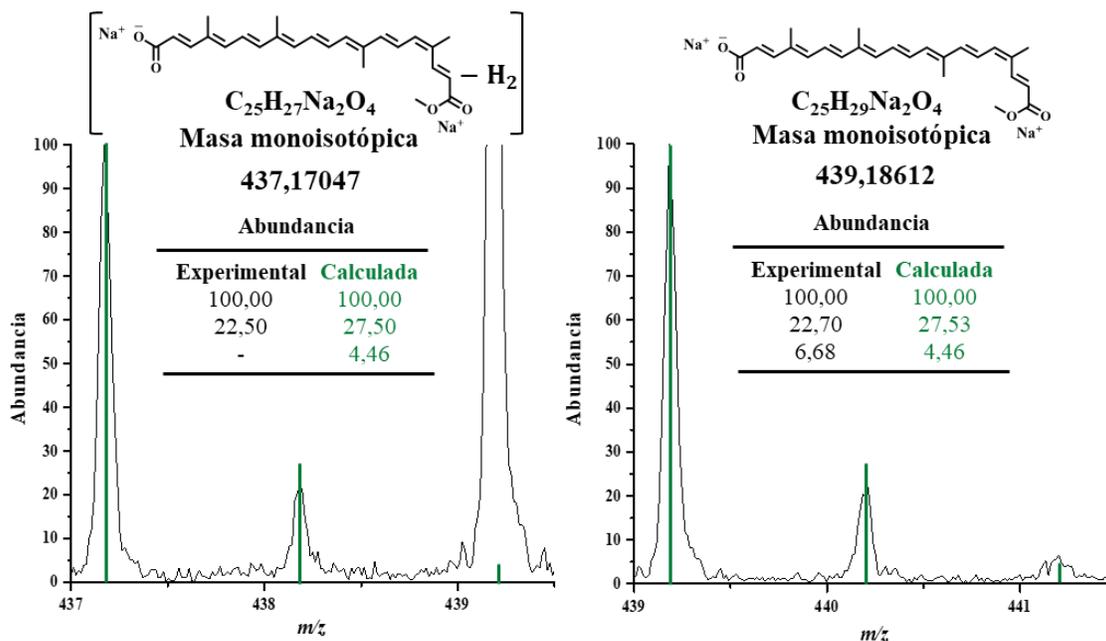
Especie química detectada	Fórmula molecular	Masa experimental	Masa calculada	$\Delta$ ppm	S/N	Patrón Isotópico
$[M-H-(CO_2 + CH_3OH)]^-$	$C_{23}H_{25}O$	317,1983	317,1905	24,6	136,1	317,1983; 318,1877; 319,1995
$[M-H-(CO_2 + C_2H_2)]^-$	$C_{22}H_{27}O_2$	323,2072	323,2011	18,9	213,6	323,2072; 324,2015; 325,2052
$[M-H-CO_2]^-$	$C_{24}H_{29}O_2$	349,2196	349,2168	8,0	165,7	349,2196; 350,2140; 351,2176
$[M-H-CH_3OH]^-$	$C_{24}H_{25}O_3$	361,1836	361,1804	8,8	7,9	361,1836; 362,1849; 363,1837

Asimismo, en los ensayos para la formación de aductos de sodio de *cis*-bixina ( $C_{25}H_{30}O_4$ ) en fase gaseosa, mostraron un aumento considerable en la relación S/N de la señal correspondiente al aducto de sodio (S/N 76,3 comparado con S/N 13,7 en LDI (+)), la cual se observa a  $m/z$  439.1779 (Ver **figura 28**). Sin embargo, se observan señales adicionales a  $m/z$  437,1641, 455,1726

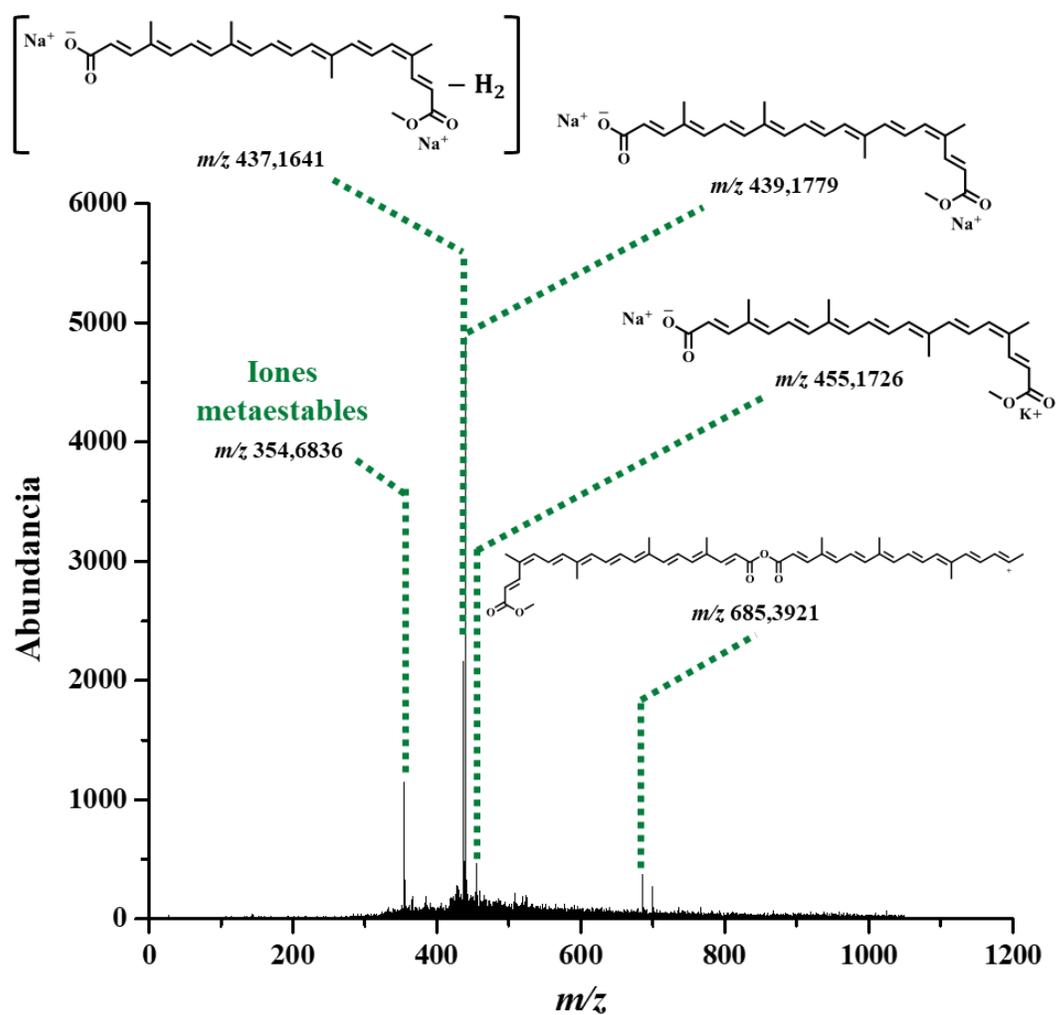
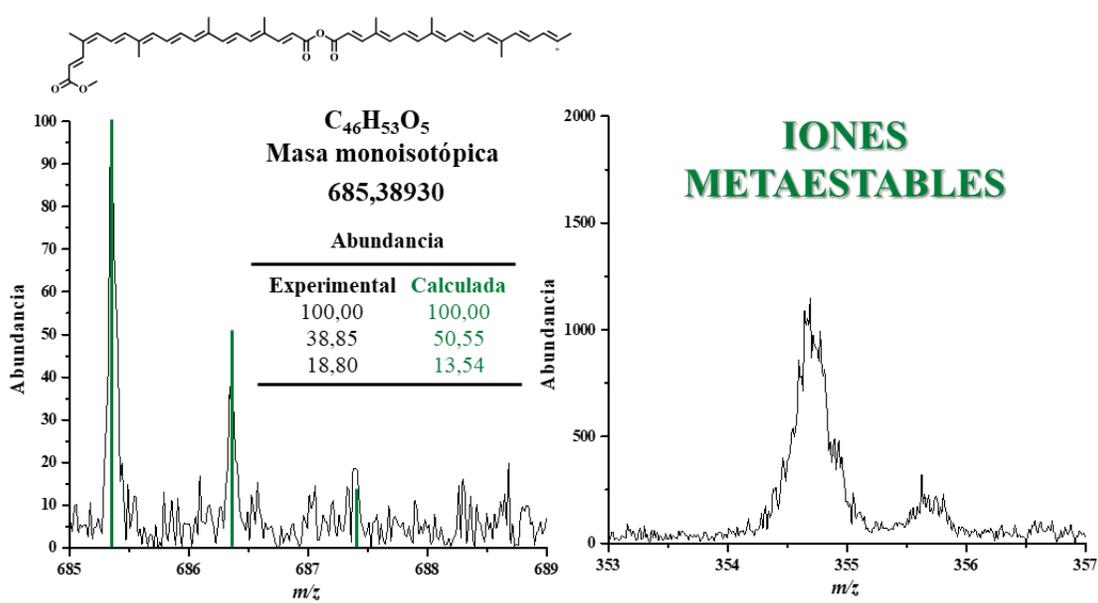
## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

y 685,3921 correspondientes a  $[M-H+2Na-H_2]^+$ ,  $[M-H+Na+K]^+$  y  $[2M-H_2O-(CH=CH-COOCH_3)]^+$ , respectivamente. Asimismo, se observa una señal a  $m/z$  354,6617 correspondiente a un ion “metaestable” que se forma fuera de la cámara de ionización y se observan como una banda ancha.

En la **figura 28** se observa que la señal más abundante (ion pico de base) corresponde al aducto de sodio de *cis*-bixina ( $C_{25}H_{30}O_4$ ), en el cual, los iones de sodio se unen a los pares de electrones libres de los oxígenos de la función éster. A diferencia de los iones reportados en los ensayo LDI, curiosamente al inducir la cationización de *cis*-bixina, se observan agregados con pérdida de la función éster a  $m/z$  685,3921. Los patrones isotópicos de las especies reportadas corresponden a las estructuras mencionadas anteriormente como se puede observar en la **figura 28** y en la **Tabla 4**. Asimismo, en la **tabla 4** se resume los valores de masas experimental y masa calculada para cada señal asignada, con la respectiva exactitud relativa de masa, S/N y patrón isotópico.



## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES



## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

**Figura 28.** Espectro de masas LDI en modo de iones positivo para *cis*-bixina 2,5mM mezclada en igual proporción con una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2,5 mM en MeOH, en un rango *m/z* de 0 a 1200, una incidencia del láser igual a 50 μJ y un volumen igual a 1μL depositado sobre el target MALDI. Los acercamientos corresponden a la presencia de iones metaestables y patrones isotópicos de las señales discutidas en el texto.

**Tabla 4.** Señales observadas en el espectro de masas LDI de *cis*-bixina como aducto de sodio por la adición de una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en metanol, con su respectiva masa experimental, masa calculada, exactitud relativa en la masa y S/N.

Especie química detectada	Fórmula molecular	Masa experimental	Masa calculada	Δppm	S/N
[M-H+2Na-H <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	437,1641	437,1705	14,6	37,0
[M-H+2Na] <sup>+</sup>	C <sub>25</sub> H <sub>29</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	439,1779	439,1861	18,7	76,3
[M-H+Na+K] <sup>+</sup>	C <sub>25</sub> H <sub>29</sub> KNaO <sub>4</sub>	455,1726	455,1601	27,5	7,2
[2M-H <sub>2</sub> O-(CH=CH-COOCH <sub>3</sub> )] <sup>+</sup>	C <sub>46</sub> H <sub>53</sub> O <sub>5</sub>	685,3921	685,3893	4,1	8,7

### 5.3 Evaluación de *cis*-bixina como matriz MALDI para el análisis de triacilglicéridos, xantofilas y clorofilas.

#### 5.3.1 Identificación de triacilglicéridos usando DHB como matriz MALDI.

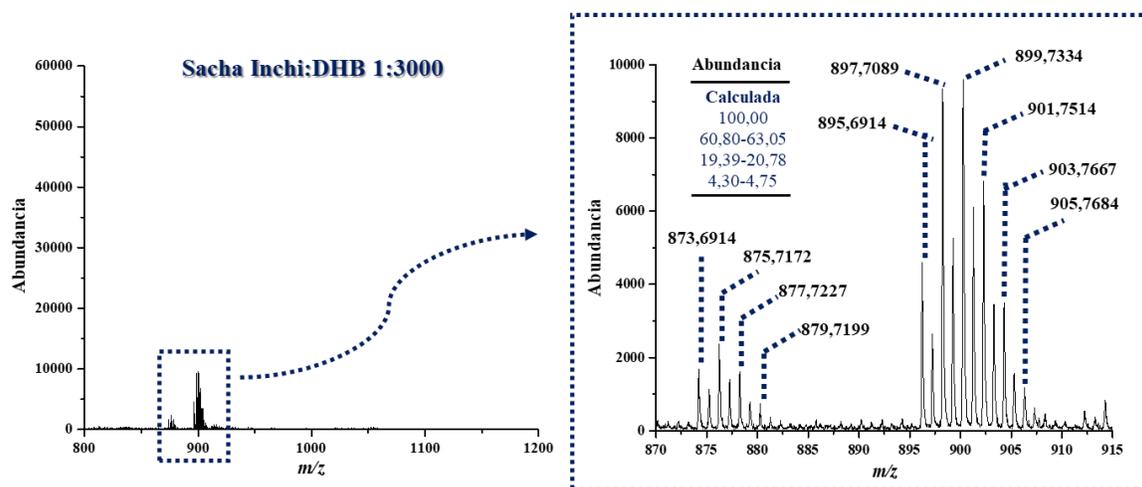
Teniendo en cuenta que *cis*-bixina tiene un rendimiento cuántico de fluorescencia muy bajo, es decir, su preferencia a relajarse es vía conversión interna debido al tiempo que permanece en el estado excitado, en este proyecto de investigación el pigmento se cataloga como una matriz de transferencia catiónica, ya que las matrices MALDI ET por lo general tienen tiempos mayores en el estado excitado (mayor FQY *i.e.*), tiempo necesario para interactuar con el analito y transferirle la carga. Asimismo, no se cataloga como matriz MALDI PT porque los resultados

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

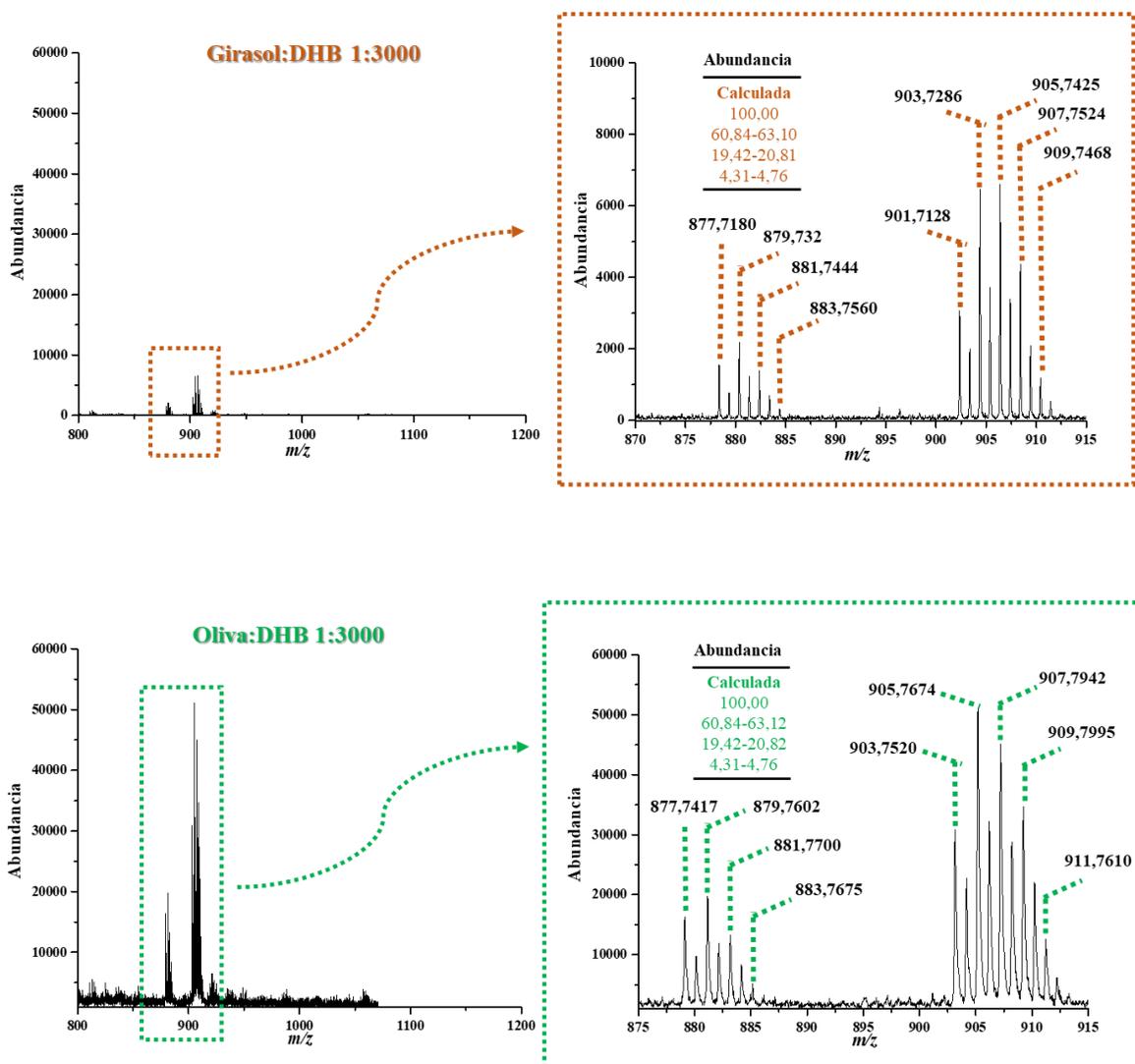
obtenidos en MS LDI demuestran que *cis*-bixina tiene una alta afinidad catiónica, pues prefiere interactuar con cationes de sodio debido a la presencia de átomos con electrones no enlazantes (como el oxígeno) en su estructura.

Con base en lo anterior, se llevaron a cabo ensayos de análisis de triacilglicéridos (TAG's) presentes en aceites comerciales (sacha inchi, girasol y oliva), los cuales son típicamente analizados como aductos de sodio en MALDI MS (Calvano et al., 2007; Fanali et al., 2011; Jergović et al., 2017; Ollivier et al., 2003; Stolyhwo et al., 1985).

Inicialmente, se empleó DHB como matriz MALDI estándar, para identificar y confirmar la presencia de TAG's en los aceites a evaluar (Ver **figura 29**). Para lo anterior, se utilizaron condiciones estándar previamente reportadas por la literatura. En total se identificaron 10 TAG's presentes en el aceite de sacha inchi, y 9 TAG's presentes en el aceite de girasol y oliva, respectivamente (Ver **tabla 5**). De manera que se identificaron 100% de los TAG reportados en la literatura para cada uno de los aceites (Calvano et al., 2007; Fanali et al., 2011; Jergović et al., 2017; Ollivier et al., 2003; Stolyhwo et al., 1985). Los TAG's presentes en cada uno de los aceites mencionados fueron analizados como se mencionó en la sección 4.2 de la metodología, usando una relación A:M 1:3000.



## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES



**Figura 29.** Espectros de masas obtenidos en modo de iones positivo para la identificación de triacilglicéridos en aceites de sachá inchi (recuadro azul), girasol (recuadro naranja) y oliva (recuadro verde), con su respectiva abundancia calculada y usando DHB 0.13M como matriz MALDI en una relación molar estándar (A:M 1:3000). El espectro se obtuvo en un rango  $m/z$  de 800 a 1200, una incidencia del láser igual a  $50 \mu\text{J}$  y un volumen igual a  $1 \mu\text{L}$  depositado sobre el target MALDI.

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

**Tabla 5.** Identificación de triacilglicéridos como aductos de sodio en aceites de sachá inchi, girasol y oliva, usando DHB como matriz, con su respectiva masa experimental, masa calculada, exactitud relativa en la masa y S/N. Donde **P:** C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>, **Ln:** C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>, **L:** C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>, **Po:** C<sub>16</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>, **O:** C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub>, **S:** C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>, **A:** C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>.

<b>Triacilglicéridos</b>		<b>Masa</b>	<b>Masa</b>		
<b>Aceite de s.</b>	<b>Fórmula</b>	<b>experimental</b>	<b>calculada</b>	<b>Δppm</b>	<b>S/N</b>
<b>inchi</b>	<b>molecular</b>	<b>[M+Na]<sup>+</sup></b>	<b>[M+Na]<sup>+</sup></b>		
PLnLn	C <sub>55</sub> H <sub>94</sub> NaO <sub>6</sub>	873,6914	873,6948	3,9	13,6
PLLn	C <sub>55</sub> H <sub>96</sub> NaO <sub>6</sub>	875,7172	875,7105	7,6	18,3
PLL	C <sub>55</sub> H <sub>98</sub> NaO <sub>6</sub>	877,7227	877,7261	3,9	13,6
PoOO	C <sub>55</sub> H <sub>100</sub> NaO <sub>6</sub>	879,7199	879,7418	24,9	5,8
LnLnLn	C <sub>57</sub> H <sub>92</sub> NaO <sub>6</sub>	895,6914	895,6792	13,6	40,6
LnLLn	C <sub>57</sub> H <sub>94</sub> NaO <sub>6</sub>	897,7089	897,6948	15,7	80,3
OLnLn	C <sub>57</sub> H <sub>96</sub> NaO <sub>6</sub>	899,7334	899,7105	25,4	82,3
SLnLn	C <sub>57</sub> H <sub>98</sub> NaO <sub>6</sub>	901,7514	901,7261	28,1	46,9
SLLn	C <sub>57</sub> H <sub>100</sub> NaO <sub>6</sub>	903,7667	903,7418	27,5	22,6
OOL	C <sub>57</sub> H <sub>102</sub> NaO <sub>6</sub>	905,7684	905,7574	12,1	10,6
<b>Triacilglicéridos</b>		<b>Masa</b>	<b>Masa</b>		
<b>Aceite de</b>	<b>Fórmula</b>	<b>experimental</b>	<b>calculada</b>	<b>Δppm</b>	<b>S/N</b>
<b>girasol</b>	<b>molecular</b>	<b>[M+Na]<sup>+</sup></b>	<b>[M+Na]<sup>+</sup></b>		
PLL	C <sub>55</sub> H <sub>98</sub> NaO <sub>6</sub>	877,7180	877,7261	9,2	8,3
POL	C <sub>55</sub> H <sub>100</sub> NaO <sub>6</sub>	879,7328	879,7418	10,2	14,8
POO	C <sub>55</sub> H <sub>102</sub> NaO <sub>6</sub>	881,7444	881,7574	14,7	8,7
PSO	C <sub>55</sub> H <sub>104</sub> NaO <sub>6</sub>	883,7560	883,7731	19,3	2,2
LLL	C <sub>57</sub> H <sub>98</sub> NaO <sub>6</sub>	901,7128	901,7261	14,7	31,6
OLL	C <sub>57</sub> H <sub>100</sub> NaO <sub>6</sub>	903,7286	903,7418	14,6	64,0
SLL	C <sub>57</sub> H <sub>102</sub> NaO <sub>6</sub>	905,7425	905,7574	16,4	66,0
OOO	C <sub>57</sub> H <sub>104</sub> NaO <sub>6</sub>	907,7524	907,7731	22,7	19,8
SOO	C <sub>57</sub> H <sub>106</sub> NaO <sub>6</sub>	909,7468	909,7887	46,1	16,7

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

Triacilglicéridos Aceite de oliva	Fórmula molecular	Masa	Masa	$\Delta$ ppm	S/N
		experimental [M+Na] <sup>+</sup>	calculada [M+Na] <sup>+</sup>		
PLL	C <sub>55</sub> H <sub>98</sub> NaO <sub>6</sub>	877,7417	877,7261	17,8	10,8
PoSL	C <sub>55</sub> H <sub>100</sub> NaO <sub>6</sub>	879,7602	879,7418	20,9	11,9
PoSO	C <sub>55</sub> H <sub>102</sub> NaO <sub>6</sub>	881,7700	881,7574	14,3	7,1
PoSS	C <sub>55</sub> H <sub>104</sub> NaO <sub>6</sub>	883,7675	883,7731	6,3	1,8
OOLn	C <sub>57</sub> H <sub>100</sub> NaO <sub>6</sub>	903,7520	903,7418	11,3	21,7
SOLn	C <sub>57</sub> H <sub>102</sub> NaO <sub>6</sub>	905,7674	905,7574	11,1	34,2
SOL	C <sub>57</sub> H <sub>104</sub> NaO <sub>6</sub>	907,7942	907,7731	23,2	27,9
PLA	C <sub>57</sub> H <sub>106</sub> NaO <sub>6</sub>	909,7995	909,7887	11,9	18,6
SSO	C <sub>57</sub> H <sub>108</sub> NaO <sub>6</sub>	911,7610	911,8043	47,5	7,0

Se observa que, en todos los casos la relación S/N supera el valor de 2,0 a excepción de la señal correspondiente al triacilglicérido PoSS en el aceite de Oliva, con un valor de S/N 1,8 (Ver **Tabla 5**). La S/N puede incrementarse variando las relaciones molares A:M, aún así, y debido a que el principal interés del proyecto de investigación es la identificación de TAG's presentes en los aceites mencionados, los valores obtenidos son aceptables. Asimismo, los valores de  $\Delta$ ppm calculados para las mediciones son bajos, por lo que también pueden ser utilizados como un criterio en la identificación de los TAG's presentes en los aceites. Además, los valores de masas exactas son reportados con cuatro cifras decimales, implicando una mayor precisión en la medición de la masa.

Cabe resaltar que, los TAG's presentes en el aceite de sachá inchi, en un principio fueron identificados por Fanali y colaboradores (Fanali et al., 2011). Los autores emplearon HPLC acoplada a MS con ionización química a presión atmosférica (HPLC-APCI-MS). Se identificaron como iones protonados [M+H]<sup>+</sup> y se encontró que LnLLn se encuentra en mayor proporción.

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

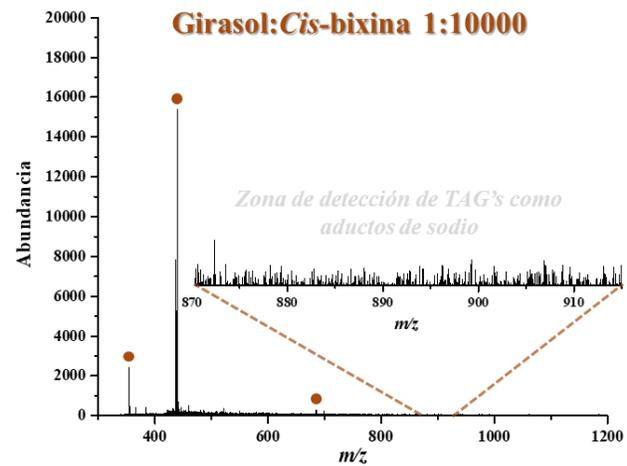
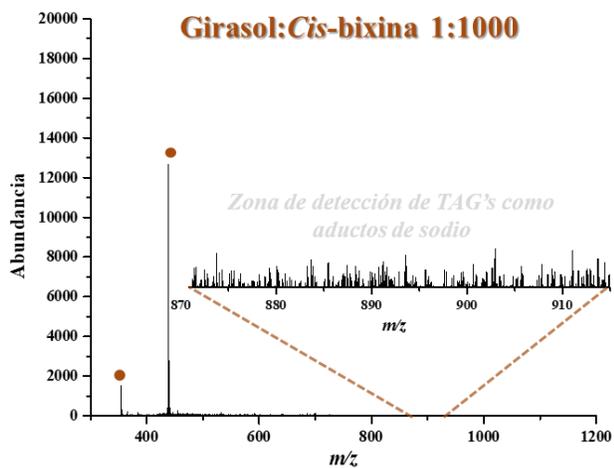
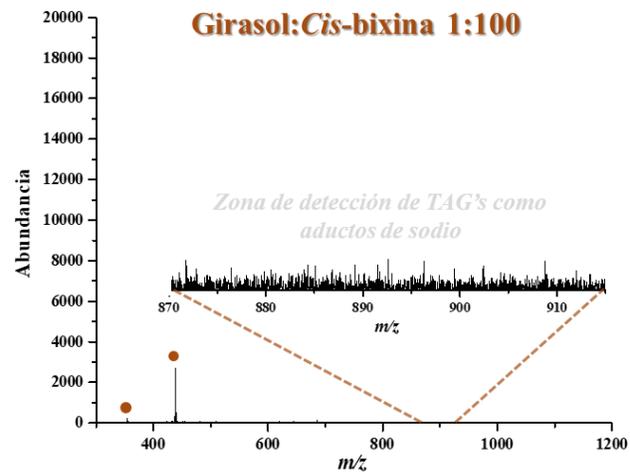
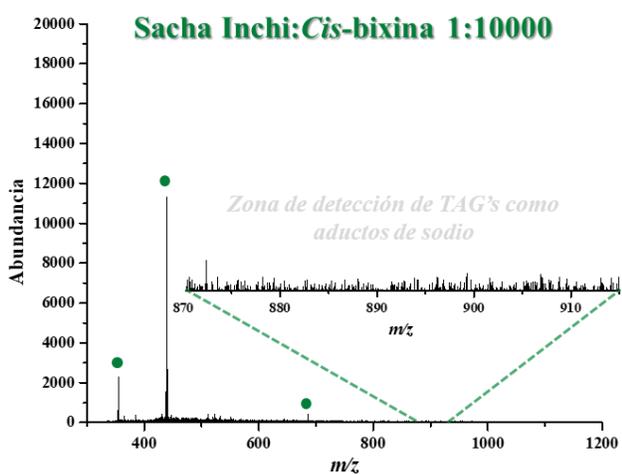
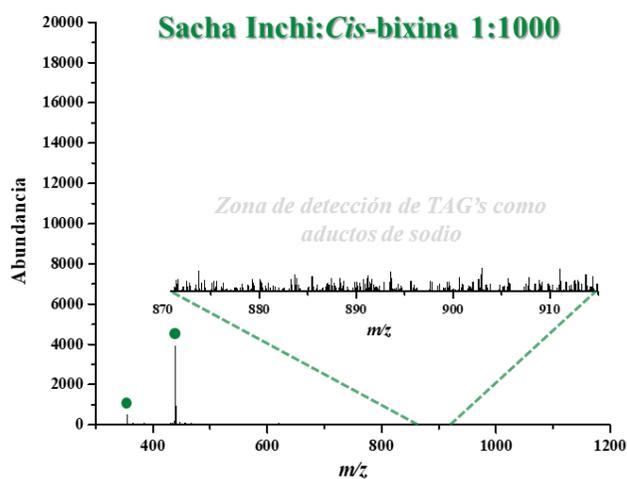
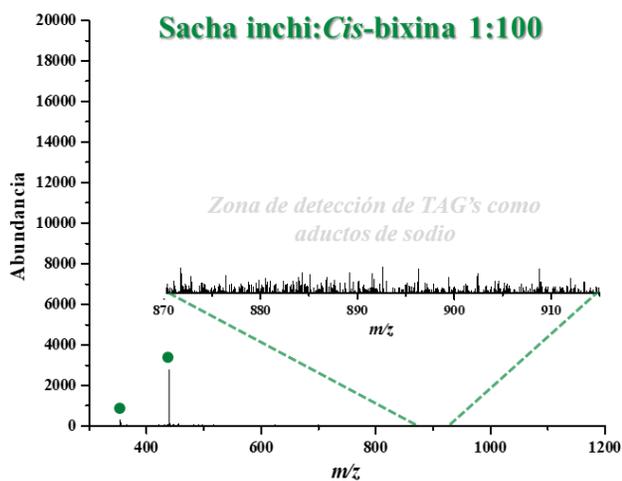
Seguidamente, Carrillo y colaboradores identificaron parte de los TAG's ya reportados, sólo que empleando cromatografía de gases (GC) acoplada a MS (Carrillo et al., 2018). Inclusive, técnicas novedosas como MS de ionización por nanoelectrospray de reacción de Paterno-Buchi (PB-nanoESI-MS) fue empleada para analizar los TAG's poliinsaturados presentes en el aceite (Li et al., 2020). Sin embargo, ninguno de ellos involucró el uso de una matriz para su respectivo análisis. Lo cual resulta curioso, ya que MALDI es una técnica relativamente simple, que en este proyecto demostró ser viable para la identificación de TAG's como aductos de sodio.

Por su parte, los TAG's presentes en aceite de girasol y oliva, si fueron identificados usando MALDI MS. Para ello, se empleó DHB como matriz (40 mg/L) usando trifluoroacetato de sodio (1 mg/mL) como agente cationizante en relación 1:2 (v/v) con el analito (10 $\mu$ L/mL), logrando identificar 8 TAG's para cada aceite (Jergović et al., 2017). De igual manera, Ayumi y colaboradores, emplearon DHB (20  $\mu$ g/ $\mu$ L) con el mismo agente cationizante (1  $\mu$ g/ $\mu$ L) en relación 1:2 (v/v) con el analito (10  $\mu$ g/ $\mu$ L) sólo que identificando menor cantidad de TAG's (4) (Kubo et al., 2013).

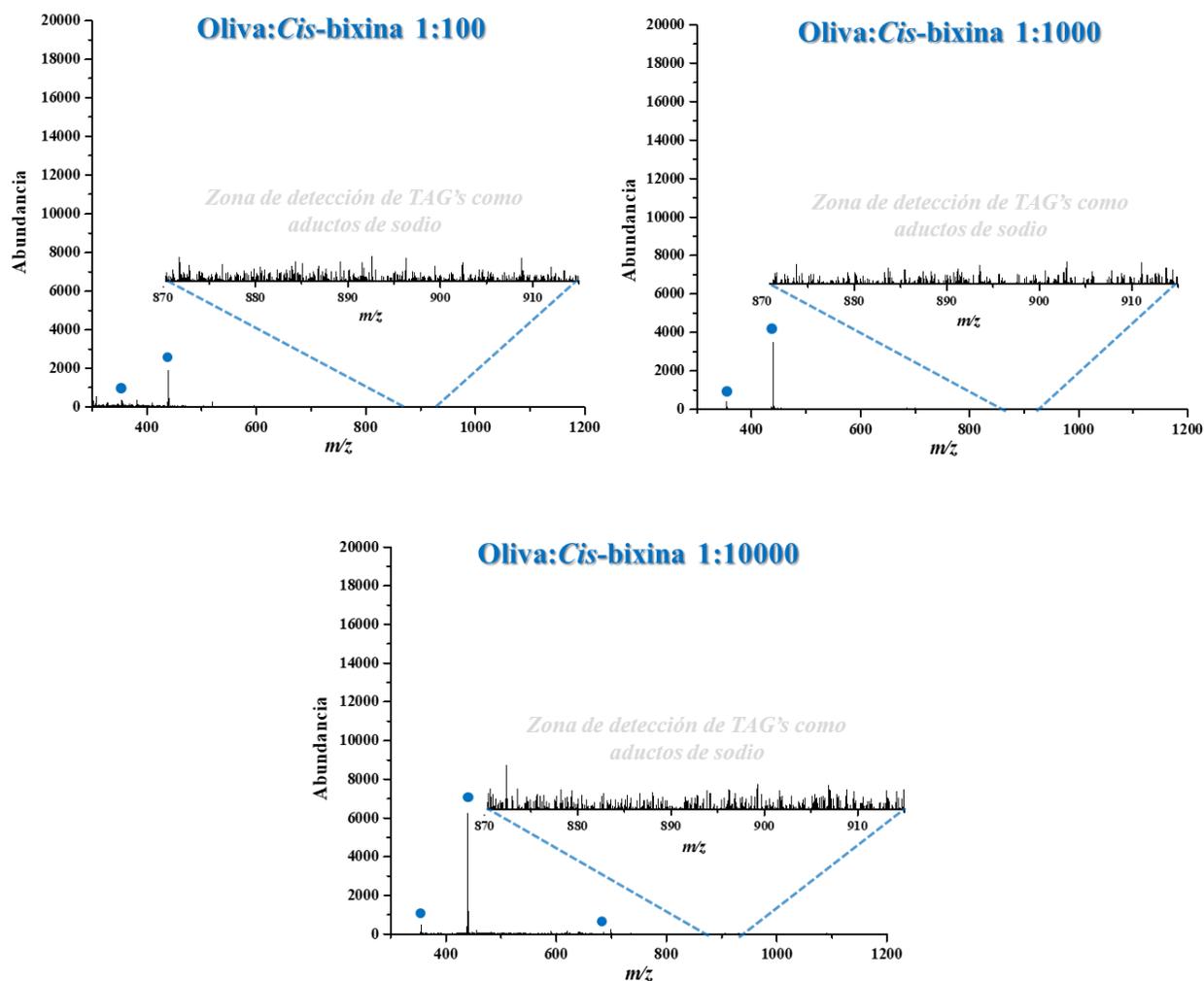
### ***5.3.2 Identificación de triacilglicéridos usando cis-bixina como matriz MALDI.***

Usando *cis*-bixina como matriz MALDI de transferencia catiónica para el análisis de TAG's presentes en los aceites, no se obtuvieron resultados prometedores bajo ninguna de las proporciones A:M evaluadas. Tal como se puede observar en la **Figura 30**, en estos espectros MALDI, no se logró identificar TAG's, se observan señales propias de la matriz *cis*-bixina, iones correspondientes a *cis*-bixina como aductos de sodio, inclusive al incrementar la relación molar analito:matriz y aumentar la energía de incidencia del láser (Ver **figura 30**).

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES



## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES



**Figura 30.** Espectros de masas obtenidos en modo de iones positivo, usando *cis*-bixina 2.5mM como matriz MALDI para la identificación de triacilglicéridos en aceites de sachá inchi (verde), girasol (naranja) y oliva (azul). Se emplearon relaciones molares A:M 1:100, 1:1000 y 1:10000 y los espectros se obtuvieron en un rango  $m/z$  de 300 a 1200, una incidencia del láser igual a 50  $\mu$ J y un volumen igual a 1 $\mu$ L depositado sobre el target MALDI.

Esto, indica que *cis*-bixina se ioniza bajo condiciones MALDI e incorpora en su estructura dos iones metálicos de sodio para la formación de iones primarios, pero no transfiere dichos sodios

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

en fase gaseosa a las moléculas del analito. Lo anterior, debido posiblemente a su muy baja presión de vapor ( $2,3 \times 10^{-9}$  Pa (PubChem, 2021)), comparada con matrices comerciales como DHB (0,15 Pa (Monte et al., 2010)) o CHCA (133,32 Pa (Chemistry, 2021)) . Razón por la cual, no se desorbe fácilmente de la superficie del portamuestras MALDI o requiere de alta energía para contrarrestar las interacciones intermoleculares en fase sólida.

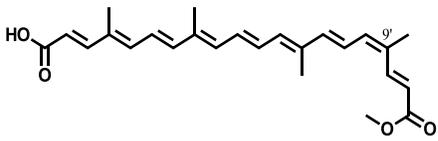
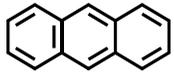
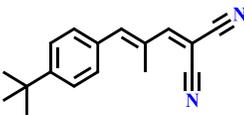
Tal como sucede en el ensayo de cationización, al evaluar *cis*-bixina como matriz MALDI, se observan señales correspondientes a aductos de sodio, iones metaestables y oligómeros propios de *cis*-bixina, los cuales incrementan su relación S/N a medida que aumenta la relación A:M (Ver **figura 30**). Por su parte, las señales correspondientes a los TAG's ya identificados previamente al utilizar la matriz comercial DHB, son “apagados” por la matriz debido a que se tratan de compuestos lábiles y termoinestables, que no se logran ver en ensayos sin matriz -LDI-.

### 5.3.3 Desorción de *cis*-bixina con ayuda de matrices MALDI ET

Con base en lo anterior, se propuso utilizar un compuesto orgánico con presión de vapor alta que no cumpla la función de matriz MALDI, solo que facilite el proceso de desorción de la mezcla *cis*-bixina:analito, el cual se denominó agente promotor de la desorción (APD). Se evaluó DCTB y antraceno como posibles APD's y sus propiedades fisicoquímicas se compararon con *cis*-bixina como se muestra a continuación (Ver **tabla 6**).

**Tabla 6.** Propiedades fisicoquímicas de los APD's comparadas con *cis*-bixina, cuyos valores fueron tomados de Goldfarb & Suuberg, 2010; Lu, 2018; PubChem, 2021b; Society, 2021 y Tokyo Chemical Industry, 2021

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

Compuesto	Punto de fusión, °C	Presión de vapor a T amb, Pa	Temperatura de sublimación, °C
<p><b>Cis-bixina</b></p> 	198	$2,33 \times 10^{-9}$	-
<p><b>Antraceno</b></p> 	215	$8,00 \times 10^{-2}$	64,35
<p><b>DCTB</b></p> 	125	-	80,00

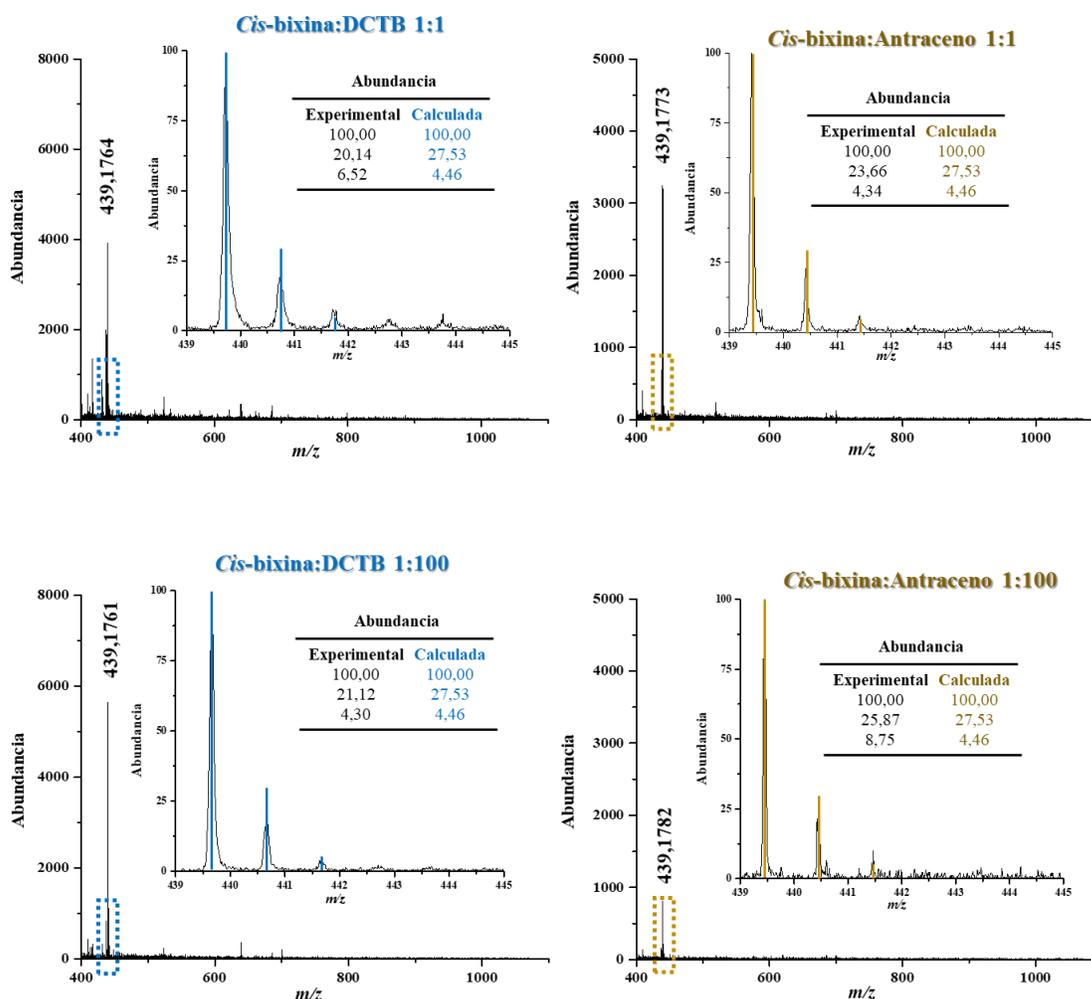
Tal como se puede observar en la **Tabla 6**, las interacciones intermoleculares en *cis*-bixina son significativas, lo que se refleja en su alto punto de fusión y baja presión de vapor. Lo anterior indica que la transición de fase sólida a gas en *cis*-bixina requiere de alta energía. Sin embargo, aunque el antraceno y el DCTB presentan puntos de fusión altos que indican interacciones intermoleculares fuertes, sus presiones de vapor son altas comparadas con *cis*-bixina, indicando que la energía requerida para desorber el compuesto y liberar las moléculas en fase gaseosa es menor. Es decir, antraceno y DCTB pueden cambiar de fase rápidamente mediante un proceso termodinámicamente favorable bajo condiciones MALDI.

El proceso de desorción en MALDI es un paso clave para garantizar que los analitos cocrystalizados junto con la matriz sean liberados “fácilmente” a fase gaseosa en la cámara de

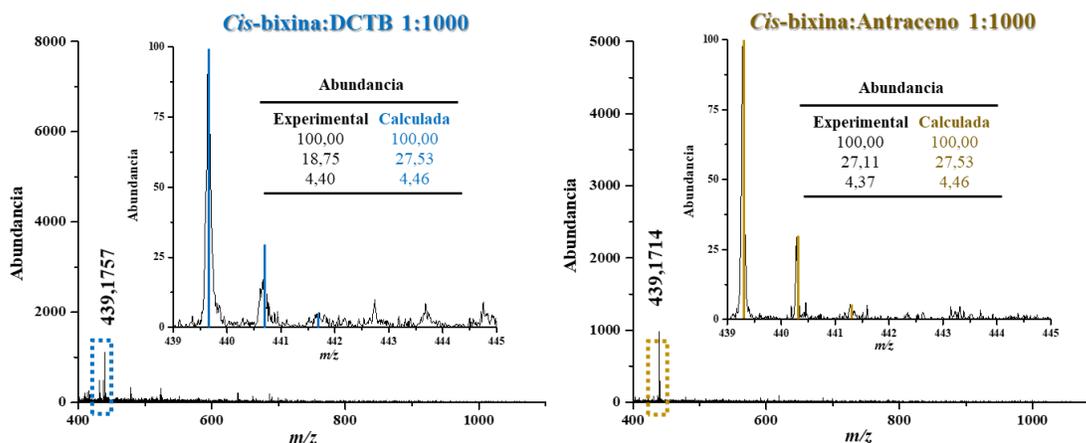
## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

ionización y se haga una transferencia de carga efectiva para la posterior detección (Dreisewerd, 2003). Por tanto, el uso de agentes promotores de la desorción (APD) permitieron facilitar dicho proceso con *cis*-bixina. Se esperaba que el uso de APD's ocasionara una disminución de las interacciones intermoleculares entre moléculas de *cis*-bixina, lo cual permitiría que se desorban de una manera más eficiente y promuevan la ionización de los TAG's. Asimismo, se esperaba que los APD's evaluados no interfirieran en el análisis de los analitos *target* - TAG's-.

A continuación, (**Figura 31**) se muestran los espectros de masas MALDI para diferentes proporciones entre *cis*-bixina y los ADP a evaluar, antraceno y DCTB. Asimismo, algunos de los descriptores analíticos se muestran en la **Tabla 7**.



## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES



**Figura 31.** Espectros de masas obtenidos en modo de iones positivo, usando *cis*-bixina 2.5mM con APD's 2,5mM en relaciones molares M:APD 1:1, 1:100 y 1:100, con el fin de evaluar el comportamiento de *cis*-bixina en el proceso de desorción bajo condiciones MALDI. Las tablas de abundancias corresponden a *cis*-bixina cationizada,  $C_{25}H_{29}Na_2O_4$ . Los espectros se obtuvieron en una rango  $m/z$  de 400 a 1100, con una incidencia del láser igual a 50  $\mu$ J y un volumen de 1 $\mu$ L depositado sobre el target MALDI.

**Tabla 7.** Evaluación del comportamiento de *cis*-bixina en el proceso de desorción bajo condiciones MALDI usando DCTB y antraceno como APD's. Los valores obtenidos corresponden a la señal de interés,  $C_{25}H_{29}Na_2O_4$ , los cuales se reportan junto a la masa calculada, exactitud relativa en la masa, S/N y patrón isotópico.

Ensayo MALDI	Masa	Masa	$\Delta$ ppm	S/N	Patrón Isotópico
	experimental	calculada			
	$[M+Na]^+$	$[M+Na]^+$			
<i>cis</i> -Bixina:DCTB (1:1)	439,1764	439,1861	22,1	57,9	439,1764; 440,1764; 441,1736
<i>cis</i> -Bixina:DCTB (1:100)	439,1761	439,1861	22,8	128,4	439,1761; 440,1754; 441,1796

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

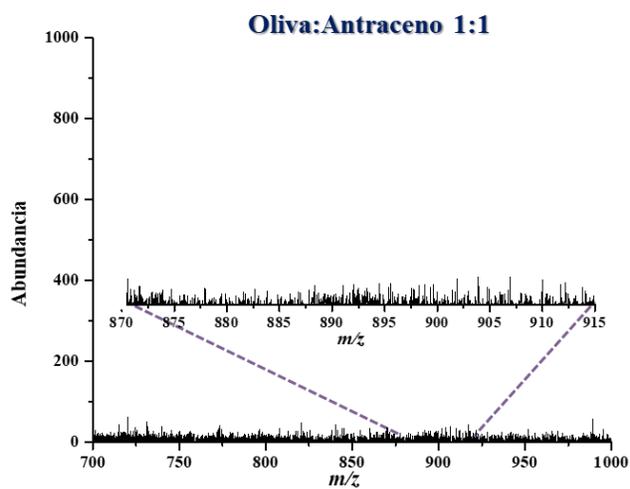
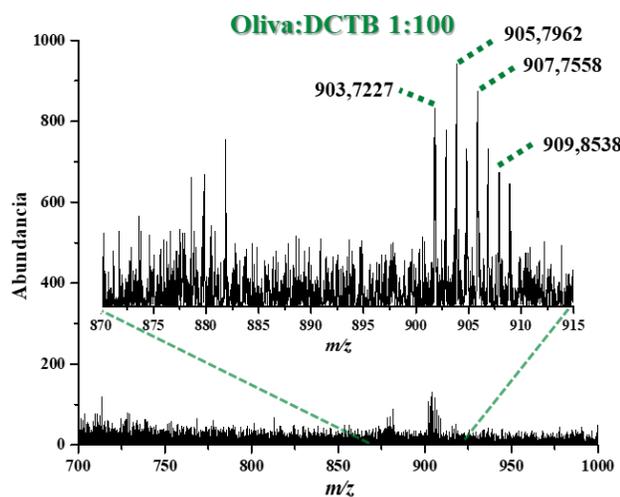
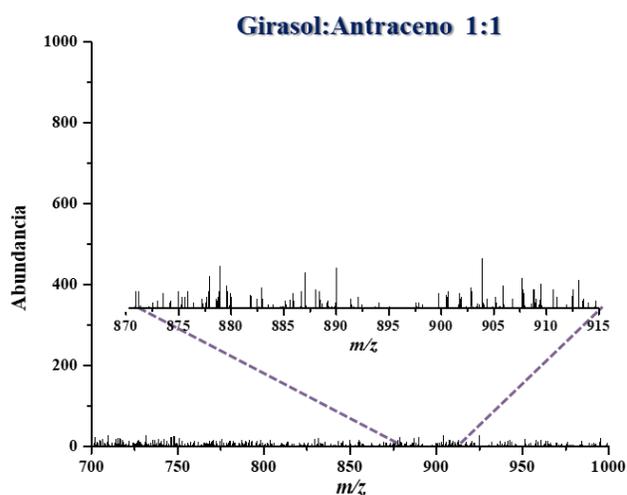
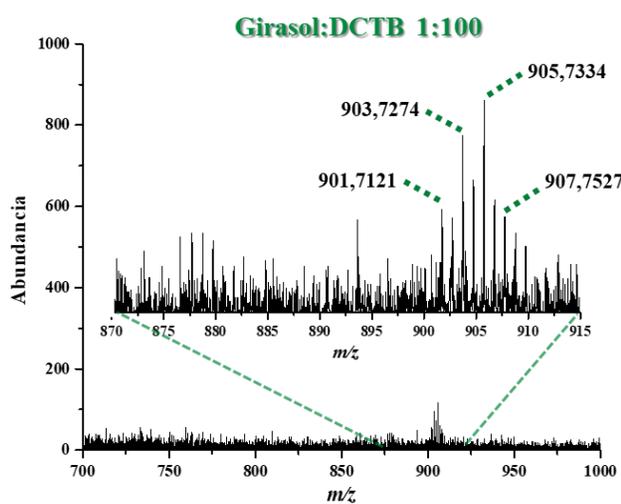
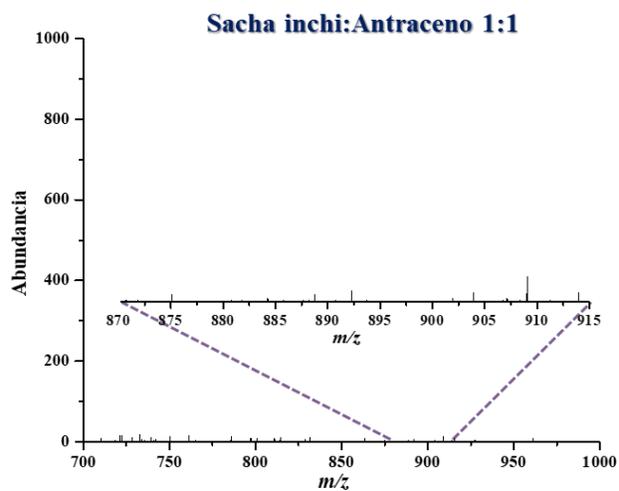
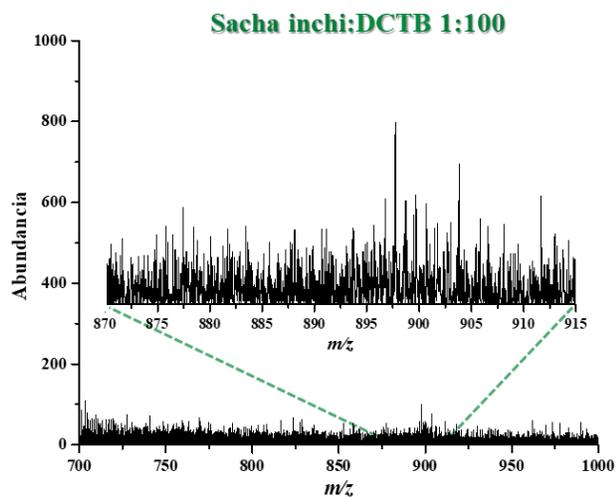
<i>cis</i> -Bixina:DCTB (1:1000)	439,1757	439,1861	23,7	27,7	439,1757; 440,1719; 441,1731
<i>cis</i> -Bixina:Antraceno (1:1)	439,1773	439,1861	20,0	88,8	439,1773; 440,1769; 441,1730
<i>cis</i> -Bixina:Antraceno (1:100)	439,1782	439,1861	18,0	51,4	439,1782; 440,1770; 441,1736
<i>cis</i> -Bixina:Antraceno (1:1000)	439,1714	439,1861	33,5	60,8	439,1714; 440,1705; 441,1721

Tal como se puede observar en la **Figura 31** y en la **Tabla 7**, para el uso de DCTB como APD se obtiene el valor de S/N más alto al utilizar una relación molar de 1:100, *cis*-bixina:APD. Por su parte, al utilizar antraceno como APD, la mejor relación molar corresponde a 1:1, *cis*-bixina:APD. Asimismo, al comparar los valores de S/N obtenidos al analizar las mezclas *cis*-bixina:APD con los espectros LDI (+) y los ensayos de cationización de *cis*-bixina, se observa que los APD ayudan en el proceso de desorción, como era de esperarse. Es decir, los valores de S/N de estos últimos experimentos son mayores comparados con los valores de S/N de los experimento LDI de *cis*-bixina. De hecho, su presencia es confirmada de acuerdo con el patrón isotópico, ya que las abundancias de las señales difieren ligeramente de los valores calculados (ver **figura 31**).

#### 5.3.4 Comportamiento de los APD en la identificación de triacilglicéridos

Asimismo, se realizaron análisis MALDI de los aceites de sachá inchi, girasol y oliva con los APD, sin el uso de *cis*-bixina como matriz. Lo anterior, teniendo en cuenta la mejor relación molar a la que *cis*-bixina desorbe, *i.e.*, 1:100 y 1:1 para DCTB y antraceno, respectivamente (Ver **figura 32**). Esto, con el fin de observar el comportamiento de dichos agentes en la identificación de los TAG's como aductos de sodio.

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES



## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

**Figura 32.** Espectros de masas obtenidos en modo de iones positivo, usando cada uno de los analitos con APD's 2,5mM en relaciones molares A:APD 1:1 y 1:100 para antraceno y DCTB, respectivamente. Los espectros se obtuvieron en una rango  $m/z$  de 800 a 1000, con una incidencia del láser igual a 50  $\mu$ J y un volumen de 1 $\mu$ L depositado sobre el target MALDI.

Tal como se puede observar en la **Figura 32**, utilizando DCTB bajo las condiciones mencionadas se logran identificar ciertos TAG's en los aceites de girasol y de oliva (Ver **tabla 8**). Esto puede deberse a que el DCTB es un compuesto que tiene en su estructura dos átomos de nitrógeno con pares de electrones libres, de modo que puede incorporar en su estructura cationes sin desestabilizarse para luego transferirlos a los analitos en estudio (Lou et al., 2010). Por su parte, usando antraceno no se logró identificar TAG's en ninguna de las muestras, lo cual era de esperarse, ya que es un hidrocarburo altamente conjugado que no tiene heteroátomos y, por tanto, no tiene la capacidad de incorporar cationes en su estructura para luego cederlos en fase gaseosa. Por tal razón, antraceno se considera mejor candidato APD comparado con DCTB, debido a que no ocurrirán reacciones de competencia en fase gaseosa entre antraceno y *cis*-bixina para la ionización vía transferencia catiónica de los TAG's. Aun así, los ensayos de identificación de TAG's se llevaron a cabo usando ambos agentes y se compararon bajo el criterio de número de compuestos identificados y los valores del descriptor analítico S/N obtenidos.

Cabe resaltar que usando DCTB como matriz MALDI, se identificaron cuatro TAG's presentes en cada uno de los aceite evaluados (36% de los reportados por Jergović et al., 2017 y Kubo et al., 2013), a excepción del aceite de sacha inchi (ver **tabla 8**). Sin embargo, las relaciones S/N de las señales identificadas fueron muy bajas.

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

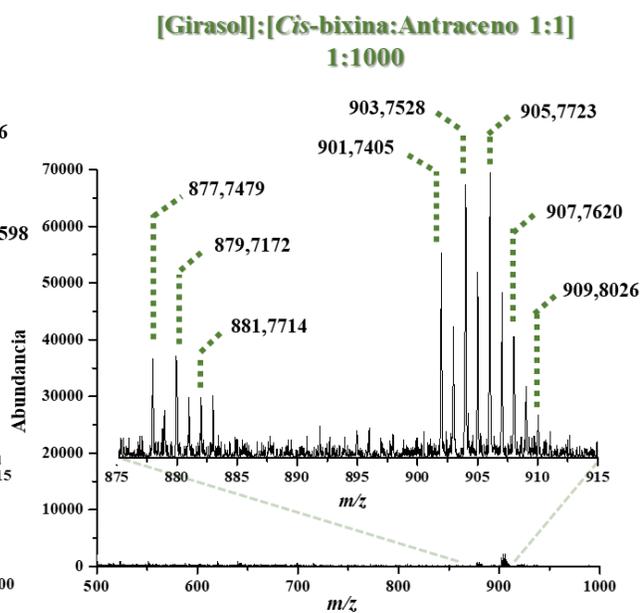
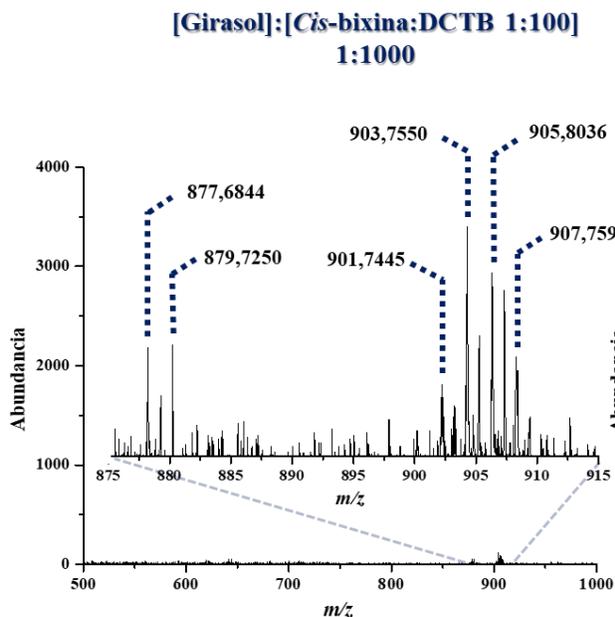
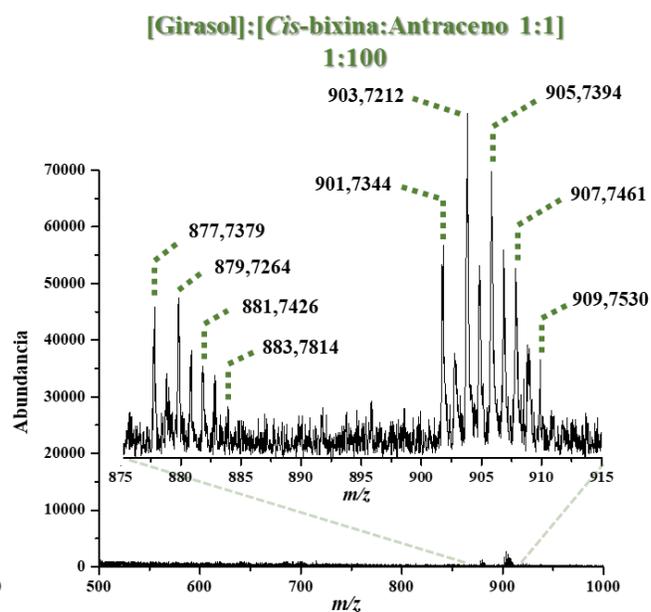
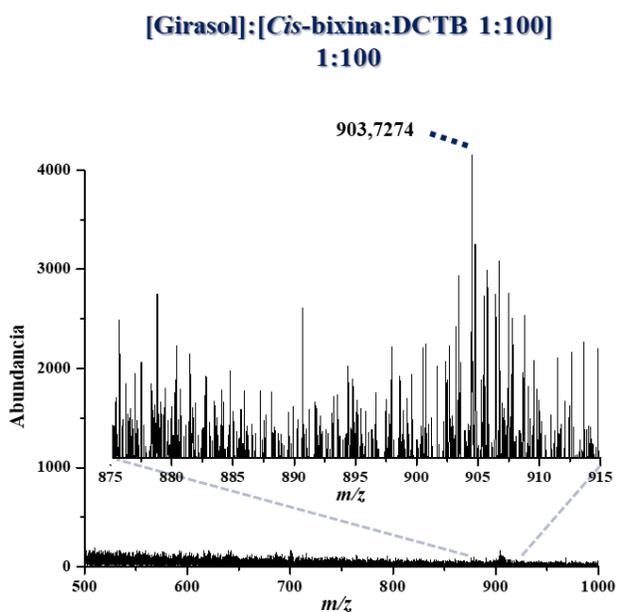
**Tabla 8.** Identificación de triacilglicéridos como aductos de sodio en aceites de girasol y oliva, usando DCTB como matriz, con su respectiva masa experimental, masa calculada, exactitud relativa en la masa y S/N.

<b>Triacilglicéridos</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Masa</b>	<b>Masa</b>	<b><math>\Delta</math>ppm</b>	<b>S/N</b>
<b>Aceite de girasol</b>	<b>molecular</b>	<b>experimental</b>	<b>calculada</b>		
		<b>[M+Na]<sup>+</sup></b>	<b>[M+Na]<sup>+</sup></b>		
LLL	C <sub>57</sub> H <sub>98</sub> NaO <sub>6</sub>	901,7121	901,7261	15,5	3,9
OLL	C <sub>57</sub> H <sub>100</sub> NaO <sub>6</sub>	903,7274	903,7418	15,9	6,6
SLL	C <sub>57</sub> H <sub>102</sub> NaO <sub>6</sub>	905,7334	905,7574	26,5	8,0
OOO	C <sub>57</sub> H <sub>104</sub> NaO <sub>6</sub>	907,7527	907,7731	22,5	3,6
<b>Triacilglicéridos</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Masa</b>	<b>Masa</b>	<b><math>\Delta</math>ppm</b>	<b>S/N</b>
<b>aceite de oliva</b>	<b>molecular</b>	<b>experimental</b>	<b>calculada</b>		
		<b>[M+Na]<sup>+</sup></b>	<b>[M+Na]<sup>+</sup></b>		
OOLn	C <sub>57</sub> H <sub>100</sub> NaO <sub>6</sub>	903,7227	903,7418	21,1	6,2
SOLn	C <sub>57</sub> H <sub>102</sub> NaO <sub>6</sub>	905,7962	905,7574	42,8	7,6
SOL	C <sub>57</sub> H <sub>104</sub> NaO <sub>6</sub>	907,7558	907,7731	19,1	6,8
PLA	C <sub>57</sub> H <sub>106</sub> NaO <sub>6</sub>	909,8538	909,7887	71,5	4,3

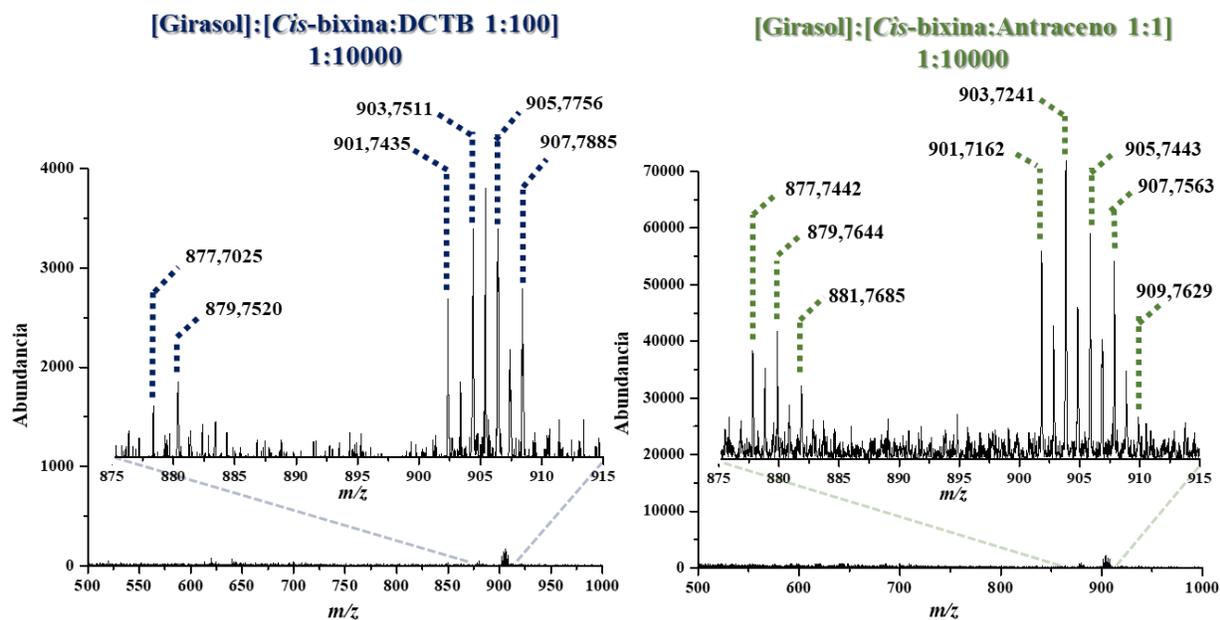
### 5.3.5 Identificación de triacilglicéridos, xantofilas y clorofilas usando *cis*-bixina:APD como matriz MALDI

**5.3.5.1 Triacilglicéridos.** Finalmente, se evaluó *cis*-bixina como matriz MALDI de transferencia catiónica para el análisis de TAG's presentes en el aceite de girasol y se utilizaron ambos APD descritos anteriormente, los ensayos se realizaron como se describió en la sección 4.2 de la metodología (Ver **figura 33** y **Tabla 9**). Se escogió únicamente el aceite de girasol debido a que los tres aceites evaluados previamente con la matriz comercial DHB presentan un comportamiento similar, de acuerdo con los ensayos hasta el momento realizados, como se puede observar a lo largo de la sección 5.3 de este proyecto.

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES



## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES



**Figura 33.** Espectros de masas obtenidos en modo de iones positivo para la identificación de triacilglicéridos como aductos de sodio en el aceite de girasol, usando *cis*-bixina:APD como matriz MALDI en una relación molar con el analito A:APD:M 1:10000:100, 1:100000:1000 y 1:100000:10000 para DCTB y 1:100:100, 1:1000:1000 y 1:10000:10000 para antraceno. El espectro se obtuvo en un rango  $m/z$  de 500 a 1000, una incidencia del láser igual a 50  $\mu$ J y un volumen de 1 $\mu$ L depositado sobre el target MALDI.

**Tabla 9.** Identificación de triacilglicéridos como aductos de sodio en aceites de girasol, usando *cis*-bixina:APD como matriz, con su respectiva masa experimental, masa calculada, exactitud relativa en la masa y S/N.

Triacilglicéridos	Fórmula molecular	APD : DCTB		$\Delta$ ppm	S/N
		Masa experimental	Masa calculada		
Aceite girasol					
A:M 1:100		[M+Na] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>		
OOLn	C <sub>57</sub> H <sub>100</sub> NaO <sub>6</sub>	903,7274	903,7418	15,9	1,1

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

<b>Triacilglicéridos</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Masa</b>	<b>Masa</b>		
<b>Aceite girasol</b>	<b>molecular</b>	<b>experimental</b>	<b>calculada</b>	<b><math>\Delta</math>ppm</b>	<b>S/N</b>
<b>A:M 1:1000</b>		<b>[M+Na]<sup>+</sup></b>	<b>[M+Na]<sup>+</sup></b>		
PLL	C <sub>55</sub> H <sub>98</sub> NaO <sub>6</sub>	877,6844	877,7261	47,5	2,7
POL	C <sub>55</sub> H <sub>100</sub> NaO <sub>6</sub>	879,7250	879,7418	19,1	2,8
LLL	C <sub>57</sub> H <sub>98</sub> NaO <sub>6</sub>	901,7445	901,7261	20,4	1,4
OLL	C <sub>57</sub> H <sub>100</sub> NaO <sub>6</sub>	903,7550	903,7418	14,6	9,5
SLL	C <sub>57</sub> H <sub>102</sub> NaO <sub>6</sub>	905,8036	905,7574	51,0	7,6
OOO	C <sub>57</sub> H <sub>104</sub> NaO <sub>6</sub>	907,7598	907,7731	14,6	3,1

<b>Triacilglicéridos</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Masa</b>	<b>Masa</b>		
<b>Aceite girasol</b>	<b>molecular</b>	<b>experimental</b>	<b>calculada</b>	<b><math>\Delta</math>ppm</b>	<b>S/N</b>
<b>A:M 1:10000</b>		<b>[M+Na]<sup>+</sup></b>	<b>[M+Na]<sup>+</sup></b>		
PLL	C <sub>55</sub> H <sub>98</sub> NaO <sub>6</sub>	877,7025	877,7261	26,8	2,0
POL	C <sub>55</sub> H <sub>100</sub> NaO <sub>6</sub>	879,7520	879,7418	11,6	2,7
LLL	C <sub>57</sub> H <sub>98</sub> NaO <sub>6</sub>	901,7435	901,7261	19,3	4,0
OLL	C <sub>57</sub> H <sub>100</sub> NaO <sub>6</sub>	903,7511	903,7418	10,3	8,9
SLL	C <sub>57</sub> H <sub>102</sub> NaO <sub>6</sub>	905,7756	905,7574	20,1	8,7
OOO	C <sub>57</sub> H <sub>104</sub> NaO <sub>6</sub>	907,7885	907,7731	16,9	5,0

**APD : Antraceno**

<b>Triacilglicéridos</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Masa</b>	<b>Masa</b>	<b><math>\Delta</math>ppm</b>	<b>S/N</b>
<b>Aceite girasol</b>	<b>molecular</b>	<b>experimental</b>	<b>calculada</b>		
<b>A:M 1:100</b>		<b>[M+Na]<sup>+</sup></b>	<b>[M+Na]<sup>+</sup></b>		
PLL	C <sub>55</sub> H <sub>98</sub> NaO <sub>6</sub>	877,7379	877,7261	13,4	5,6
POL	C <sub>55</sub> H <sub>100</sub> NaO <sub>6</sub>	879,7264	879,7418	17,5	6,0
POO	C <sub>55</sub> H <sub>102</sub> NaO <sub>6</sub>	881,7426	881,7574	16,8	3,3
PSO	C <sub>55</sub> H <sub>104</sub> NaO <sub>6</sub>	883,7814	883,7731	9,4	1,7
LLL	C <sub>57</sub> H <sub>98</sub> NaO <sub>6</sub>	901,7344	901,7261	9,2	6,5
OLL	C <sub>57</sub> H <sub>100</sub> NaO <sub>6</sub>	903,7212	903,7418	22,8	8,1
SLL	C <sub>57</sub> H <sub>102</sub> NaO <sub>6</sub>	905,7394	905,7574	19,9	7,7
OOO	C <sub>57</sub> H <sub>104</sub> NaO <sub>6</sub>	907,7461	907,7731	29,7	6,3
SOO	C <sub>57</sub> H <sub>106</sub> NaO <sub>6</sub>	909,7530	909,7887	39,2	3,8

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

<b>Triacilglicéridos</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Masa</b>	<b>Masa</b>	<b><math>\Delta</math>ppm</b>	<b>S/N</b>
<b>Aceite girasol</b>	<b>molecular</b>	<b>experimental</b>	<b>calculada</b>		
<b>A:M 1:1000</b>		<b>[M+Na]<sup>+</sup></b>	<b>[M+Na]<sup>+</sup></b>		
PLL	C <sub>55</sub> H <sub>98</sub> NaO <sub>6</sub>	877,7479	877,7261	24,8	9,0
POL	C <sub>55</sub> H <sub>100</sub> NaO <sub>6</sub>	879,7172	879,7418	28,0	8,8
POO	C <sub>55</sub> H <sub>102</sub> NaO <sub>6</sub>	881,7714	881,7574	15,9	6,9
LLL	C <sub>57</sub> H <sub>98</sub> NaO <sub>6</sub>	901,7405	901,7261	16,0	20,7
OLL	C <sub>57</sub> H <sub>100</sub> NaO <sub>6</sub>	903,7528	903,7418	12,2	26,3
SLL	C <sub>57</sub> H <sub>102</sub> NaO <sub>6</sub>	905,7723	905,7574	16,4	28,2
OOO	C <sub>57</sub> H <sub>104</sub> NaO <sub>6</sub>	907,7620	907,7731	12,2	12,9
SOO	C <sub>57</sub> H <sub>106</sub> NaO <sub>6</sub>	909,8026	909,7887	15,3	5,8
<b>Triacilglicéridos</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Masa</b>	<b>Masa</b>	<b><math>\Delta</math>ppm</b>	<b>S/N</b>
<b>Aceite girasol</b>	<b>molecular</b>	<b>experimental</b>	<b>calculada</b>		
<b>1:10000</b>		<b>[M+Na]<sup>+</sup></b>	<b>[M+Na]<sup>+</sup></b>		
PLL	C <sub>55</sub> H <sub>98</sub> NaO <sub>6</sub>	877,7442	877,7261	20,6	6,8
POL	C <sub>55</sub> H <sub>100</sub> NaO <sub>6</sub>	879,7644	879,7418	25,7	7,0
POO	C <sub>55</sub> H <sub>102</sub> NaO <sub>6</sub>	881,7685	881,7574	12,6	5,3
LLL	C <sub>57</sub> H <sub>98</sub> NaO <sub>6</sub>	901,7162	901,7261	11,0	14,4
OLL	C <sub>57</sub> H <sub>100</sub> NaO <sub>6</sub>	903,7241	903,7418	19,5	18,2
SLL	C <sub>57</sub> H <sub>102</sub> NaO <sub>6</sub>	905,7443	905,7574	14,4	12,2
OOO	C <sub>57</sub> H <sub>104</sub> NaO <sub>6</sub>	907,7563	907,7731	18,5	10,4
SOO	C <sub>57</sub> H <sub>106</sub> NaO <sub>6</sub>	909,7629	909,7887	28,3	3,4

Tal como se puede observar en la **Tabla 9**, utilizando mezclas previamente establecidas entre *cis*-bixina y un compuesto que funcione como agente promotor de la desorción, fue posible identificar todos los TAG's presentes en las muestras de aceite que ya habían sido reportados previamente al utilizar la matriz comercial DHB (es decir, 100% de los TAG's reportados en la literatura) (Calvano et al., 2007; Fanali et al., 2011; Jergović et al., 2017; Ollivier et al., 2003; Stolyhwo et al., 1985).

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

Asimismo, en la **Figura 33** y en la **Tabla 9**, se puede observar que el antraceno permite obtener mejores valores de los descriptores analíticos como la S/N comparado con los ensayos utilizando DCTB, como APD. Utilizando antraceno ( $C_{14}H_{10}$ ) se lograron identificar nueve TAG's en el aceite de girasol para la relación molar A:APD:M 1:100:100 y ocho para las restantes. Mientras que al utilizar DCTB como APD, tan sólo se logró identificar 1 compuesto para la relación molar A:APD:M 1:10000:100 (11% de los TAG's reportados), y 6 TAG's en las proporciones matriz analito, 1000:1 y 10000:1, respectivamente (67% de los TAG's reportados). Sin embargo, tal como se indicó anteriormente, en la sección 5.3.4, DCTB también puede promover la ionización de los TAG's como aductos de sodio, por lo que puede presentarse cierta competencia entre el DCTB y la *cis*-bixina como matriz MALDI.

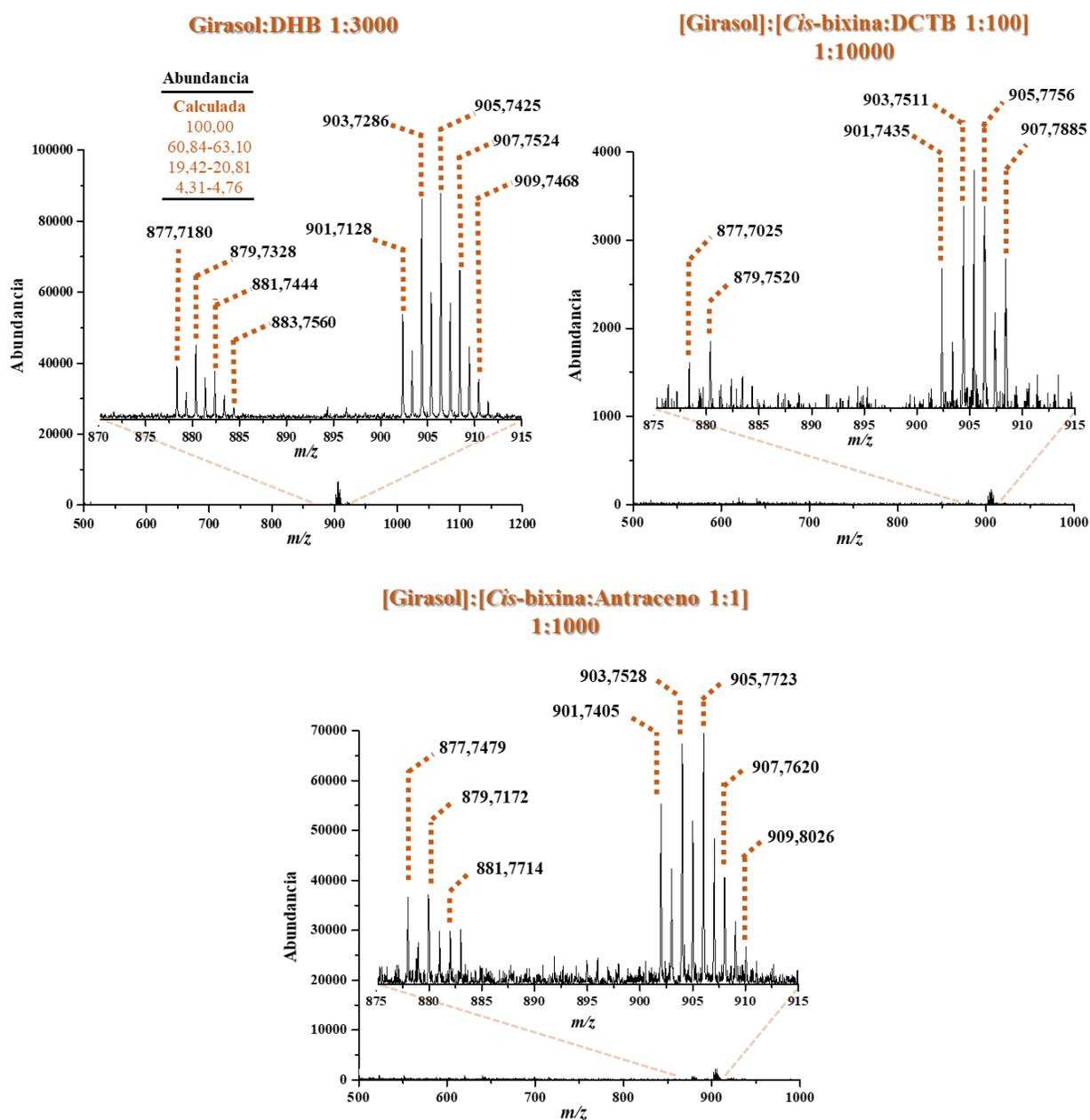
Tal como se puede evidenciar en la **Figura 33** y en la **Tabla 9**, *cis*-bixina funciona como matriz MALDI de transferencia catiónica. El uso de compuestos que ayudan en la desorción hace que disminuyan las interacciones intermoleculares entre las moléculas de *cis*-bixina, donde una vez desorbe, se cationiza como ion primario, y seguidamente transfiere dicho catión hacia analitos con afinidades catiónicas mayores.

Usando DCTB como APD en relaciones molares A:APD:M 1:100000:1000 y 1:1000000:10000 se obtienen resultados muy similares en relación S/N. Sin embargo, los valores  $\Delta$ ppm para el último caso son menores, lo cual indica que hubo una mayor exactitud en la medición de los mismos. Por otro lado, usando antraceno como APD en relaciones molares A:APD:M 1:1000:1000 se obtiene la mejor relación S/N con mayor precisión, con valores S/N mayores a los obtenidos utilizando DCTB como APD. Sin embargo, se identifica un compuesto menos que usando DHB como matriz MALDI, con la cual, se obtienen mejores resultados. Dicho compuesto corresponde al triacilglicérido LLL,  $C_{55}H_{104}NaO_6$  y su NO identificación era de esperarse, ya que

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

usando DHB se obtiene un descriptor analítico S/N igual a 2,2 (ver **tabla 5**), lo cual indica su baja presencia en el aceite comercial.

A continuación, en la **Figura 34**, se muestra un resumen del comportamiento de *cis*-bixina como matriz MALDI en la identificación de TAG's en aceite de girasol, los cuales se comparan con la matriz comercial DHB bajo las relaciones molares discutidas anteriormente.



## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

**Figura 34.** Resumen de los TAG's presentes en el aceite de girasol detectados como aductos de sodio  $[M+Na]^+$  utilizando *cis*-bixina:APD bajo la mejor proporción (A:M 1:10000 y 1:1000 para DCTB y antraceno respectivamente) y DHB, como matrices MALDI.

Tal como se indicó anteriormente, utilizando *cis*-bixina junto con antraceno como APD, es posible realizar la identificación todos los TAG's reportados en la literatura presentes en el aceite de girasol, con resultados comparables con la matriz comercial DHB. Sin embargo, DHB presenta ciertas ventajas como mejores valores de relación S/N. No obstante, DHB presenta un alto *background*, mientras que *cis*-bixina presenta pocas señales propias de la matriz en zonas de masas bajas (ver **anexo B**). Lo anterior, facilita la detección de compuestos de bajo peso molecular con afinidades catiónicas mayores al de la matriz, mediante transferencia catiónica.

**5.3.5.2 Xantófilas.** Los ensayos descritos anteriormente fueron extrapolados para el análisis de estándares de carotenoides tipo xantofila, como astaxantina ( $C_{40}H_{52}O_4$ ) y diadinoxantina ( $C_{40}H_{54}O_3$ ). Para ello, inicialmente las xantofilas se identificaron como aductos de sodio  $[M+Na]^+$  utilizando DHB como matriz MALDI, en una relación molar A:M 1:3000 (Ver **anexo C y D**). Tal como se puede observar en el **anexo D**, las relaciones S/N para ambos casos son bajas a pesar de usar una matriz comercial.

Seguidamente, se hicieron ensayos con *cis*-bixina como matriz MALDI variando tres relaciones molares A:M (1:100, 1:1000 1:10000), pero tal como sucedió con los TAG's (Véase sección 5.3.2), no fue posible identificar las xantofilas como aductos de sodio, por su muy baja presión de vapor como se discutió anteriormente. En los espectros de masas que se muestran en el

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

**Anexo E**, sólo se logran observar señales propias de la matriz, que ya fueron discutidas en los ensayos de cationización (sección 5.2.5)

Del mismo modo, se realizaron los ensayos MALDI utilizando analito:APD, tal como se describió en la sección 5.2, utilizando relaciones A:APD de 1:100 para DCTB y 1:1 para antraceno, discutidas previamente en la sección 5.3.3. Lo anterior, con el fin de evaluar el comportamiento de los APD en la identificación de xantofilas. Tal como se puede observar en las gráficas del **Anexo F**, DCTB permite identificar las xantofilas  $C_{40}H_{52}O_4$  y  $C_{40}H_{54}O_3$  como cationes radicales  $M^+$ , no como aductos de sodio, en  $m/z$  596,4866 y 582,3073 para astaxantina ( $C_{40}H_{52}O_4$ ) y diadinoxantina ( $C_{40}H_{54}O_3$ ), respectivamente. Contrariamente, utilizando antraceno no se lograron identificar los analitos como aductos de sodio, ni cationes radicales bajo las condiciones previamente establecidas (Ver **anexo F**).

Finalmente, se evaluó la *cis*-bixina como matriz MALDI para la identificación de xantofilas (Ver **anexo G**). Se variaron las relaciones molares A:M 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 y 1:1000000 (entendiéndose M como *cis*-bixina:DCTB 1:100 y *cis*-bixina:antraceno 1:1), pero los resultados obtenidos no fueron prometedores, ya que para ambos casos, no se logró observar las xantofilas como aductos de sodio. Sólo se observan señales de la matriz a  $m/z$  638 y 685, las cuales corresponden a oligómeros de *cis*-bixina con pérdidas de la función éster y parte de la cadena poliénica conjugada, como ya se discutió en la sección 5.2.5. Se observa que a medida que incrementa la relación molar, aumenta la abundancia de las señales de la matriz, lo cual es de esperarse, pues se incrementa su cantidad en la solución que se evalúa.

Lo anterior es debido a la afinidad catiónica, la cual es efectiva cuando el analito tiene mayor afinidad catiónica que la matriz. Si se comparan las estructuras químicas entre la matriz y los analitos, se observa que son muy similares. Dichos compuestos constan de una cadena

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

poliénica con más de 10 enlaces dobles conjugados con funciones éster y ácido para la matriz, y funciones alcohol, éter y cetona para los analitos. De hecho, se tratan de carotenoides que son biosintetizados de la misma forma que la bixina, por vía isoprenoide. Ahora bien, para que un catión sodio sea agregado al analito *target* para su posterior detección como aducto de sodio, se requiere que éste tenga átomos con alta densidad electrónica (oxígeno *e.g.*) en su estructura. Para este caso, tanto la matriz como los analitos tienen la misma cantidad de heteroátomos, lo cual hace pensar que su afinidad catiónica es similar o ligeramente mayor para la matriz, ya que en la función ácido y éster existe mayor densidad electrónica que en funciones cetona, éter y alcohol, de manera que el catión sodio prefiere estar adherido donde existe mayor cantidad de electrones (mayor afinidad catiónica). Por tal razón, se observan señales de la matriz *cis*-bixina en los espectros obtenidos, y no del analito evaluado. Sin embargo, valdría la pena tener los cálculos pertinentes que permitan confirmar lo dicho anteriormente.

**5.3.5.3 Clorofilas.** Así como sucede con las xantofilas, el análisis de clorofila a utilizando *cis*-bixina:APD como matriz MALDI presenta el mismo comportamiento. Usando DHB como matriz, se observa la molécula de feofitina protonada ( $C_{55}H_{75}N_4O_5$ ), cuyo patrón isotópico experimental coincide con el calculado (Patiny & Alain Borel, 2013) y cuyos valores  $\Delta ppm$  y S/N corresponden a 11,5 y 34,1 respectivamente (Ver **anexo H**). Por otra parte, los ensayos de clorofila a ( $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$ ) con DCTB como matriz, muestran señales a  $m/z$  614,2870 y 892,5220 correspondientes a clorofilida a y clorofila a, respectivamente (Ver **anexo I**), lo cual es de esperarse, ya que DCTB principalmente funciona como matriz MALDI de transferencia electrónica (ET). Asimismo, se observa una señal a  $m/z$  673,2076 correspondiente a la clorofila a con pérdida de parte de la cadena fitol. Para el caso del antraceno no se observan señales, debido a la baja relación molar empleada (Ver **anexo I**). No obstante, su relación no se varió porque el interés era descubrir

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

el comportamiento del APD bajo las mismas condiciones en las que *cis*-bixina:APD se ve con mayor S/N.

Finalmente, se evaluó la identificación de clorofila a usando *cis*-bixina en presencia de APD como matriz, pero se observó un comportamiento similar a cuando se evaluaron las xantofilas como analitos. Con ninguna de las relaciones molares fue posible identificar clorofila a como aducto de sodio (Ver **anexo J**). Usando DCTB como APD, se identifica la clorofilida a y oligómeros de *cis*-bixina con pérdida de la función éster para los tres casos. Por su parte, con antraceno solo se observan señales de matriz. De manera que, *cis*-bixina no funciona como matriz MALDI de transferencia catiónica para este tipo de analitos.

La clorofila aparentemente tiene mayor afinidad catiónica que la matriz por la cantidad de heteroátomos que posee, sin embargo, por la distribución de sus grupos funcionales, se considera medianamente polar, al igual que *cis*-bixina. Se observa que no es posible una transferencia catiónica efectiva porque la energía de unión del catión a la matriz en fase gaseosa es mayor que la unión con el analito.

Cabe resaltar que, el analito cationizado puede originarse de complejos metálicos preformados en la solución que luego desorben del target por acción del láser (caso particular), o a partir de reacciones en fase gaseosa, ya sea por transferencia de carga de la matriz o por unión de un catión libre al analito (Zhang & Zenobi, 2004). Para este caso, es posible que en fase gaseosa, *cis*-bixina tenga una mayor basicidad catiónica que la clorofila, razón por la cual, el sodio prefiere estar unido a la matriz y por ende no se transfiera al analito.

Esta situación es similar a lo reportado Liao y Allison (Liao & Allison, 1995), quienes usando ácido sinapínico (SA) no lograron ver péptidos como aductos de sodio, lo cual resulta curioso, ya que los péptidos tienen mayor cantidad de grupos funcionales, lo que hace pensar que su afinidad

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

catiónica es mayor y por tanto, puedan ser cationizados. De igual manera Zhang y Zenobi (Zhang & Zenobi, 2004), reportaron que valinomicina principalmente se ve como aducto de sodio usando THAP en vez de SA como matriz. Lo cual hace pensar que la transferencia catiónica es efectiva si la brecha de energía de basicidades cationicas entre la matriz y el analito es amplia, ya que las basicidades de sodio para SA son sustancialmente mayores que para THAP (Zhang & Zenobi, 2004).

## 6. Conclusiones

El apocarotenoide *cis*-bixina fue aislado de las semillas de *B. orellana* mediante tres técnicas analíticas: Extracción con Fluido Supercrítico (SFE), Extracción con solvente Asistida por Ultrasonido (UAE) y Extracción en Fase Sólida (SPE), donde se obtuvo un rendimiento de extracción de 8,50%.

La *cis*-Bixina fue caracterizada mediante DRS, FT-IR, LDI-MS y UV-Vis con bandas de absorción a 430, 457, 487 y 355 nm (característica de la conformación *cis*-). Asimismo se calculó la absorptividad molar y el rendimiento cuántico de fluorescencia, con valores iguales a 32818 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> y 2,0%, respectivamente.

Se estudió el uso de un agente promotor de la desorción para *cis*-bixina y se encontró que antraceno permite obtener los mejores descriptores analíticos para el uso de *cis*-bixina como matriz MALDI de transferencia catiónica en el análisis de triacilglicéridos presentes en el aceite de girasol. Se encontró que la mejor relación molar *cis*-bixina:antraceno:TAG es 1000:1000:1, con resultados similares a los de la matriz estándar DHB. En contraste, los carotenoides y clorofila no pudieron ser identificados debido a que presentan una afinidad catiónica menor que la matriz en estudio.

## 7. Recomendaciones

Teniendo en cuenta la baja presión de vapor de *cis*-bixina, se recomienda derivatizar el pigmento en lugar de emplear compuestos que ayuden con el proceso de desorción. De manera que se puedan evaluar directamente derivados de *cis*-bixina como matrices MALDI.

Teniendo en cuenta la discusión sobre analitos que no pudieron ser identificados usando *cis*-bixina en presencia de APD como matriz, se recomienda realizar cálculos teóricos de afinidades catiónicas tanto para la matriz como para los analitos, con el fin de soportar la información mencionada en este proyecto de investigación.

**Referencias Bibliográficas**

- Akshatha, V., Giridhar, P., & Ravishankar, G. A. (2011). Morphological diversity in *Bixa orellana* L. and variations in annatto pigment yield. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 86(4), 319–324.
- Akula, S., & Rao Pamidighantam, P. (2003). Fatty acid composition of new forest tree seeds View project Low calorie RTS beverages View project. *Bixa Orellana L. Article in Journal of Food Science and Technology*.
- Albuquerque, C. L. C., & Meireles, M. A. A. (2012). Defatting of annatto seeds using supercritical carbon dioxide as a pretreatment for the production of bixin: Experimental, modeling and economic evaluation of the process. *Journal of Supercritical Fluids*, 66, 86–95.
- Andersson, P. O., Takaichi, S., Cogdell, R. J., & Gillbro, T. (2001). Photophysical Characterization of Natural cis-Carotenoids. *Photochemistry and Photobiology*, 74(4), 549.
- Baker, T. C., Han, J., & Borchers, C. H. (2017). Recent advancements in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging. *Current Opinion in Biotechnology*, 43, 62–69.
- Balogun, A. M., & Fetuga, B. L. (1988). Tannin, phytin and oxalate contents of some wild under-utilized crop-seeds in Nigeria. *Food Chemistry*, 30(1), 37–43.
- Barnicoat, C. R. (1937). 151. The reactions and properties of annatto as a cheese colour, with particular reference to the chemistry of cheese discoloration. *Journal of Dairy Research*, 8(1), 61–73.
- Barros, H. L., Marques, S. M. T., & Stefani, V. (2019). Water-soluble benzazole dyes fluorescent by ES IPT: Structural characterization, photophysical properties and its application as a probe for direct staining of helminths. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 30(3), 509–521.

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

- Biosci, I. J., Akakpo, E., Badoussi, M. E., Gnacadja, C. K., Dossou, A., Gbaguidi, F., Azokpota, P., Sciences, L. De, Faculté, L. S. A., Nationale, E., Appliquées, B., Jérico, B. P., Sciences, N., Unstim, M., & Dassa-, B. P. (2020). Ethnobotanical, phytochemical and nutritional characterization of *Bixa Orellana* Linn. seeds of Benin Ecology. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 6655, 46–56.
- Biotage. (2015). *QuickStart Guide to SPE*.
- Biswas, S. J., Giri, S. K., Saha, N. C., Banerjee, P., Raha, S., & Pandey, A. (2018). Phytochemical evaluation, acute toxicity studies and antimicrobial efficacy of seed extract of *Bixa orellana* - a plant grown in wild in Purulia district. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(5), 2065–2071.
- Bittencourt, C., Felicissimo, M. P., Pireaux, J. J., & Houssiau, L. (2005). ToF-SIMS characterization of thermal modifications of bixin from *Bixa orellana* fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(16), 6195–6200.
- Calvano, C. D., Aresta, A., Palmisano, F., & Zambonin, C. G. (2007). A laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry investigation into triacylglycerols oxidation during thermal stressing of edible oils. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(7–8), 2075–2084.
- Cardarelli, C. R., Benassi, M. de T., & Mercadante, A. Z. (2008). Characterization of different annatto extracts based on antioxidant and colour properties. *LWT - Food Science and Technology*, 41(9), 1689–1693. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.10.013>
- Carmen, M., Gómez, M., & González, M. B. (2010). Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores. *Monografías de La Real Academia Nacional de Farmacia*, 113–168.
- Carrillo, W., Quinteros, M. F., Carpio, C., Morales, D., Vásquez, G., Álvarez, M., & Silva, M. (2018). Identification of fatty acids in sacha inchi oil (*Cursive plukenetia volubilis* l.) from

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

ecuador. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11(2), 379–381.

Castellanos-García, L. J., Agudelo, B. C., Rosales, H. F., Cely, M., Ochoa-Puentes, C., Blanco-Tirado, C., Sierra, C. A., & Combariza, M. Y. (2017). Oligo p-Phenylenevinylene Derivatives as Electron Transfer Matrices for UV-MALDI. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 28(12), 2548–2560.

Castellanos, L. J. (2015). *Desarrollo de una matriz para espectrometría de masas MALDI basada en sistemas tipo fenilvinileno y ácidos acrílicos (Tesis maestría)*.

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. In *Ultrasonics Sonochemistry* (Vol. 34, pp. 540–560).

Chemistry, R. S. of. (2021). *α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid* | C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub> | ChemSpider. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4485953.html>

Chisté, R. C., Yamashita, F., Gozzo, F. C., & Mercadante, A. Z. (2011). Simultaneous extraction and analysis by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detectors of bixin and phenolic compounds from annatto seeds. *Journal of Chromatography A*, 1218(1), 57–63.

de Macedo, C. S., Anderson, D. M., & Schey, K. L. (2017). MALDI (matrix assisted laser desorption ionization) Imaging Mass Spectrometry (IMS) of skin: Aspects of sample preparation. *Talanta*, 174, 325–335.

de Oliveira Júnior, R. G., Bonnet, A., Braconnier, E., Groult, H., Prunier, G., Beaugeard, L., Grougnet, R., da Silva Almeida, J. R. G., Ferraz, C. A. A., & Picot, L. (2019). Bixin, an apocarotenoid isolated from *Bixa orellana* L., sensitizes human melanoma cells to

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

- dacarbazine-induced apoptosis through ROS-mediated cytotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 125(November 2018), 549–561.
- Dhami, S., Mello, A. J. D., Rumbles, G., Bishop, S. M., Phillips, D., & Beeby, A. (1995). PHTHALOCYANINE FLUORESCENCE AT HIGH CONCENTRATION: DIMERS OR REABSORPTION EFFECT? *Photochemistry and Photobiology*, 61(4), 341–346.
- Dias, V. M., Pilla, V., Alves, L. P., Oliveira, H. P. M., & Munin, E. (2011). Optical characterization in annatto and commercial colorific. *Journal of Fluorescence*, 21(1), 415–421. <https://doi.org/10.1007/s10895-010-0730-1>
- Dreisewerd, K. (2003). The desorption process in MALDI. *Chemical Reviews*, 103(2), 395–425.
- Dressler, S., & Schmidt, M. (2014). *African plants - a photo guide: Croton haumanianus*. [http://www.africanplants.senckenberg.de/root/index.php?page\\_id=78&id=5737](http://www.africanplants.senckenberg.de/root/index.php?page_id=78&id=5737)
- Erdawati, E., Allanas, E., & Wesnina, W. (2021). Extraction of bixin from annatto seeds with microwave. *Journal of Physics: Conference Series*, 1869(1), 12016.
- Fanali, C., Dugo, L., Cacciola, F., Beccaria, M., Grasso, S., Dachà, M., Dugo, P., & Mondello, L. (2011). Chemical characterization of Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(24), 13043–13049.
- FAO, J., & Additives, W. E. C. on F. (2006). *Compendium of food additive specifications*.
- Faria, D. V., Correia, L. N. de F., Souza, M. V. C., Ríos-Ríos, A. M., Vital, C. E., Batista, D. S., Costa, M. G. C., & Otoni, W. C. (2019). Irradiance and light quality affect two annatto (*Bixa orellana* L.) cultivars with contrasting bixin production. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 197.
- Fiedor, L., Dudkowiak, A., & Pilch, M. (2019). The origin of the dark S1 state in carotenoids: A comprehensive model. *Journal of the Royal Society Interface*, 16(158).

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

- Fiedor, L., Heriyanto, Fiedor, J., & Pilch, M. (2016). Effects of Molecular Symmetry on the Electronic Transitions in Carotenoids. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 7(10), 1821–1829.
- Flores, E. M., Biología, E. De, Rica, U. D. C., & Rica, C. (1988). Morfología floral del achiote, *Bixa orellana* L. (Bixaceae). *Revista de Biología Tropical*, 36(2), 499–509.
- Francese, S, Bradshaw, R., & Denison, N. (2017). An update on MALDI mass spectrometry based technology for the analysis of fingerprints-stepping into operational deployment. In *Analyst* (Vol. 142, Issue 14, pp. 2518–2546).
- Francese, S, Bradshaw, R., Flinders, B., Mitchell, C., Bleay, S., Cicero, L., & Clench, M. R. (2013). Curcumin: A multipurpose matrix for MALDI mass spectrometry imaging applications. *Analytical Chemistry*, 85(10), 5240–5248.
- Francese, Simona. (2015). Techniques for fingerprint analysis using MALDI MS: A practical overview. In *Advances in MALDI and Laser-Induced Soft Ionization Mass Spectrometry* (pp. 93–128). Springer, Cham.
- Fukuyama, Y. (2015). MALDI Matrix Research for Biopolymers. *Mass Spectrometry*, 4(1), A0037–A0037.
- Giorgi, A., De Marinis, P., Granelli, G., Chiesa, L. M., & Panseri, S. (2013). Secondary metabolite profile, antioxidant capacity, and mosquito repellent activity of *Bixa orellana* from Brazilian Amazon region. *Journal of Chemistry*, 2013.
- Giraldo-Dávila, D., Chacón-Patiño, M. L., Ramirez-Pradilla, J. S., Blanco-Tirado, C., & Combariza, M. Y. (2018). Selective ionization by electron-transfer MALDI-MS of vanadyl porphyrins from crude oils. *Fuel*, 103–111.
- Giridhar, P. (2014). A Review on Annatto Dye Extraction, Analysis and Processing – A Food

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

- Technology Perspective. *Journal of Scientific Research and Reports*, 3(2), 327–348.
- Godoy, D. S. (2019). *Reactividad en fase gaseosa de alpha-cianofenilenvinilenos como matrices MALDI de transferencia electrónica (Tesis pregrado)*.
- Gross, J. H. (2017). *Mass Spectrometry*. Springer International Publishing.
- Guaratini, T., Vessecchi, R. L., Lavarda, F. C., Maia Campos, P. M. B. G., Naal, Z., Gates, P. J., & Lopes, N. P. (2004). New chemical evidence for the ability to generate radical molecular ions of polyenes from ESI and HR-MALDI mass spectrometry. *Analyst*, 129(12), 1223–1226.
- Hashimoto, H., Uragami, C., Yukihiro, N., Gardiner, A. T., & Cogdell, R. J. (2018). Understanding/unravelling carotenoid excited singlet states. In *Journal of the Royal Society Interface* (Vol. 15, Issue 141).
- Hecht, H. G. (1976). The interpretation of diffuse reflectance spectra. *Journal of Research of the National Bureau of Standards Section A: Physics and Chemistry*, 80A(4), 17.
- Heller, A. (1964). *Organic Liquid Scintillators. VI. Substituted Distyrylbenzenes: Scintillation Properties and Spectra of Absorption and Fluorescence*. 2839(40).
- Hillenkamp, F., Karas, M., Beavis, R. C., & Chait, B. T. (1991). Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers. *Analytical Chemistry*, 63(24), 1193 A-1202 A.
- Hotelling, A. J., Nichols, W. F., Giesen, D. J., Lenhard, J. R., & Knochenmuss, R. (2006). Electron transfer reactions in laser desorption/ionization and matrix-assisted laser desorption/ionization: Factors influencing matrix and analyte ion intensities. *European Journal of Mass Spectrometry*, 12(6), 345–358.
- Isaza Jiménez, I., Jaramillo Valencia, T., Posada Uribe, L. F., & González Palacio, G. L. (2019). Evaluación del proceso de extracción alcalina de bixina de semillas de achiote (Bixa

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

orellana). *Ingeniería de Procesos*, 1–19.

*ITIS* - Report: *Bixa orellana*. (2021).

[https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=22251#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=22251#null)

Jergović, A. M., Peršurić, Ž., Saftić, L., & Kraljević Pavelić, S. (2017). Evaluation of MALDI-TOF/MS Technology in Olive Oil Adulteration. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 94(6), 749–757.

Kampmeier, J., Dreisewerd, K., Schürenberg, M., & Strupat, K. (1997). Investigations of 2,5-DHB and succinic acid as matrices for IR and UV MALDI. Part: I UV and IR laser ablation in the MALDI process. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 169–170, 31–41.

Kesan, G. (2016). *Excited States of Carotenoids and Their Roles in Light Harvesting Systems (Ph.D. Thesis)*.

Knochenmuss, R. (2016). The Coupled Chemical and Physical Dynamics Model of MALDI. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 365–385.

Kubo, A., Satoh, T., Itoh, Y., Hashimoto, M., Tamura, J., & Cody, R. B. (2013). Structural analysis of triacylglycerols by using a MALDI-TOF/TOF system with monoisotopic precursor selection. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 24(5), 684–689.

Kumar Panigrahi, S., & Kumar Mishra, A. (2019). Inner filter effect in fluorescence spectroscopy: As a problem and as a solution. In *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* (Vol. 41, p. 100318). Elsevier.

Li, P., Deng, J., Xiao, N., Cai, X., Wu, Q., Lu, Z., Yang, Y., & Du, B. (2020). Identification of polyunsaturated triacylglycerols and C=C location isomers in sacha inchi oil by

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

- photochemical reaction mass spectrometry combined with nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Food Chemistry*, 307(April 2019), 125568.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125568>
- Liao, P., & Allison, J. (1995). Ionization Processes in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry: Matrix-dependent Formation of [M+H]<sup>+</sup> vs [M+Na]<sup>+</sup> Ions of Small Peptides and Some Mechanistic Comments. *Journal of Mass Spectrometry*, 30(November 1994), 408–423.
- Limited, H. U. K. (2011). *A Guide to Recording Fluorescence Quantum Yields*.
- Lin, W., & Oliver, D. J. (2008). Role of triacylglycerols in leaves. *Plant Science*, 175(3), 233–237.
- Llansola-Portoles, M. J., Pascal, A. A., & Robert, B. (2017). Electronic and vibrational properties of carotenoids: From in vitro to in vivo. In *Journal of the Royal Society Interface* (Vol. 14, Issue 135).
- López, S. E., Caicedo, M., Gil, A., López, A., & Pazos, A. E. (2018). Morphometry of fruit and seed of *Bixa orellana* L. “achiote.” *Sciéndo*, 21(2), 213–216.
- Lou, X., De Waal, B. F. M., Van Dongen, J. L. J., Vekemans, J. A. J. M., & Meijer, E. W. (2010). A pitfall of using 2-[(2E)-3-(4-tert-butylphenyl)-2-methylprop-2-enylidene]malononitrile as a matrix in MALDI TOF MS: Chemical adduction of matrix to analyte amino groups. *Journal of Mass Spectrometry*, 45(10), 1195–1202.
- Mathews-Roth, M. M., Wilson, T., Fujimori, E., & Krinsky, N. I. (1974). Carotenoid chromophore length and protection against photosensitization. *Photochemistry and Photobiology*, 19(3), 217–222.
- McCarley, T. D., McCarley, R. L., & Limbach, P. A. (1998). Electron-Transfer Ionization in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*,

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

70(20), 4376–4379.

Misra, R. (2018). *Brief History of ICT Molecules*.

Monte, M. J. S., Gonçalves, M. V., & Ribeiro Da Silva, M. D. M. C. (2010). Vapor pressures and enthalpies of combustion of the dihydroxybenzoic acid isomers. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 55(6), 2246–2251.

Oliveira, L. F. C., Tega, D. U., Eberlin, M. N., & Sussulini, A. (2022). Liquid chromatography coupled to Venturi easy ambient sonic spray ionization mass spectrometry. *Talanta*, 238.

Ollivier, D., Artaud, J., Pinatel, C., Durbec, J. P., & Guérère, M. (2003). Triacylglycerol and fatty acid compositions of French virgin olive oils. Characterization by chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(19), 5723–5731.

Patiny, L., & Alain Borel. (2013). *ChemCalc: molecular formula information*. Journal of Chemical Information and Modeling. <https://www.chemcalc.org/?ionizations=&mf=C55H75N4O5>

Pérez-Urria Carril, E., & Ávalos García, A. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA*, 2(3), 119–145.

Polívka, Tomáš, & Sundström, V. (2004). Ultrafast dynamics of carotenoid excited states-from solution to natural and artificial systems. *Chemical Reviews*, 104(4), 2021–2071.

Polívka, Tomáš, & Sundström, V. (2009). Dark excited states of carotenoids: Consensus and controversy. *Chemical Physics Letters*, 477(1–3), 1–11.

Prabhakara Rao, P., Narsing Rao, G., Jyothirmayi, T., Satyanarayana, A., Karuna, M. S. L., & Prasad, R. B. N. (2015). Characterisation of Seed Lipids from *Bixa orellana* and *Trachyspermum copticum*. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92(10), 1483–1490.

PubChem. (2021). *Annatto* / *C24H28O4* - PubChem. PubChem.

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6537492>

- Raddatz-Mota, D., Pérez-Flores, L. J., Carrari, F., Mendoza-Espinoza, J. A., de León-Sánchez, F. D., Pinzón-López, L. L., Godoy-Hernández, G., & Rivera-Cabrera, F. (2017). Achiote (Bixa orellana L.): a natural source of pigment and vitamin E. *Journal of Food Science and Technology*, *54*(6), 1729–1741.
- Ragnoni, E., Di Donato, M., Iagatti, A., Lapini, A., & Righini, R. (2015). Mechanism of the intramolecular charge transfer state formation in all-trans - $\beta$ -Apo-8'-carotenal: Influence of Solvent Polarity and Polarizability. *Journal of Physical Chemistry B*, *119*(2), 420–432.
- Rahmalia, W., Fabre, J.-F., & Mouloungui, Z. (2015). Effects of Cyclohexane/Acetone Ratio on Bixin Extraction Yield by Accelerated Solvent Extraction Method. *Procedia Chemistry*, *14*, 455–464.
- Rahmalia, W., Fabre, J. F., Usman, T., & Mouloungui, Z. (2014). Aprotic solvents effect on the UV-visible absorption spectra of bixin. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *131*, 455–460.
- Ramírez-Pradilla, J. S., Blanco-Tirado, C., & Combariza, M. Y. (2019). Electron-Transfer Ionization of Nanoparticles, Polymers, Porphyrins, and Fullerenes Using Synthetically Tunable  $\alpha$ -Cyanophenylenevinylenes as UV MALDI-MS Matrices. *ACS Applied Materials and Interfaces*, *11*(11), 10975–10987.
- Rehbein, J., Dietrich, B., Grynbaum, M. D., Hentschel, P., Holtin, K., Kuehnle, M., Schuler, P., Bayer, M., & Albert, K. (2007). Characterization of bixin by LC-MS and LC-NMR. *Journal of Separation Science*, *30*(15), 2382–2390.
- Rhys Williams, A. T., Winfield, S. A., & Miller, J. N. (1983). Relative fluorescence quantum yields using a Computer-controlled luminescence spectrometer. *The Analyst*, *108*(1290),

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

1067–1071.

Ribeiro, J. A., Oliveira, D. T., Passos, M. L., & Barrozo, M. A. S. (2005). The use of nonlinearity measures to discriminate the equilibrium moisture equations for *Bixa orellana* seeds. *Journal of Food Engineering*, 66(1), 63–68.

Rodrigues, L. M., Alcázar-Alay, S. C., Petenate, A. J., & Meireles, M. A. A. (2014). Bixin extraction from defatted annatto seeds. *Comptes Rendus Chimie*, 17(3), 268–283.

Rodriguez-Amaya, D. B. (2015). Carotenes and xanthophylls as antioxidants. In *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*.

Romero-López, N., Luna-Martínez, F., Gallegos-Brito, C., Escobar-Turriza, P., Aguilar-Espinosa, M., Valdez-Ojeda, R., Simpson, J., & Rivera-Madrid, R. (2019). An integrated genetic linkage map of *Bixa orellana* L. *Tree Genetics and Genomes*, 15(4), 1–11.

Rurack, K., & Spieles, M. (2011). Fluorescence quantum yields of a series of red and near-infrared dyes emitting at 600-1000 nm. *Analytical Chemistry*, 83(4), 1232–1242.

Sánchez, A., Flores-Cotera, L. B., Langley, E., Martín, R., Maldonado, G., & Sánchez, S. (1999). Carotenoides: Estructura, Función, Biosíntesis, Regulación y Aplicaciones. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 41, 175–191.

Scotter, M. (2009). The chemistry and analysis of annatto food colouring: A review. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 26(8), 1123–1145.

Shahid-ul-Islam, Rather, L. J., & Mohammad, F. (2016). Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications - A review. *Journal of Advanced Research*, 7(3), 499–514.

Silva, G. F., Gamarra, F. M. C., Oliveira, A. L., & Cabral, F. A. (2008). Extraction of bixin from

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

- annatto seeds using supercritical carbon dioxide. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 25(2), 419–426.
- Siva, R., Doss, F. P., Kundu, K., Satyanarayana, V. S. V., & Kumar, V. (2010). Molecular characterization of bixin-An important industrial product. *Industrial Crops and Products*, 32(1), 48–53.
- Srivastava, S., & Srivastava, A. K. (2015). Lycopene; chemistry, biosynthesis, metabolism and degradation under various abiotic parameters. In *Journal of Food Science and Technology* (Vol. 52, Issue 1, pp. 41–53). Springer. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0918-2>
- Stashenko, E. E., & Martínez, J. R. (2009). Aspectos prácticos de la ionización con electrones en la obtención de espectros de masas y su interpretación. *Scientia Chromatographica*, 1(4), 19–36.
- Stolyhwo, A., Colin, H., & Guiochon, G. (1985). Analysis of Triglycerides in Oils and Fats by Liquid Chromatography with the Laser Light Scattering Detector. *Analytical Chemistry*, 57(7), 1342–1354.
- Streletskii, A. V, Ioffe, I. N., Kotsiris, S. G., Barrow, M. P., Drewello, T., Strauss, S. H., & Boltalina, O. V. (2005). In-Plume Thermodynamics of the MALDI Generation of Fluorofullerene Anions. *The Journal of Physical Chemistry A*, 109(4), 714–719.
- Streletskiy, A. V., Goldt, I. V., Kuvychko, I. V., Ioffe, I. N., Sidorov, L. N., Drewello, T., Strauss, S. H., & Boltalina, O. V. (2004). Application of 9-nitroanthracene as a matrix for laser desorption/ionization analysis of fluorinated fullerenes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18(3), 360–362.
- Stringheta, P. C., Silva, P. I., & Costa, A. G. V. (2018). Annatto/Urucum— Bixa orellana. *Exotic Fruits*, 23–30.

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

- Taham, T., Cabral, F. A., & Barrozo, M. A. S. (2015). Extraction of bixin from annatto seeds using combined technologies. *Journal of Supercritical Fluids*, 100, 175–183.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). Plant physiology. In *Estimates* (Issue Volumen I).  
<http://www.unaids.org/en/regionscountries/countries/vietnam>
- Tanaka, A., & Tanaka, R. (2006). Chlorophyll metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(3), 248–255.
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T., & Matsuo, T. (1988). Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2(8), 151–153.
- Tao, B. Y. (2007). Industrial Applications for Plant Oils and Lipids. In *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources* (pp. 611–627). Elsevier.
- Tay-Agbozo, S. (2018). CHARACTERIZATION OF THE CAROTENOID CIS-BIXIN (Ph.D. Thesis). In *Nuevos sistemas de comunicación e información*.
- Ulmer, L., Mattay, J., Torres-Garcia, H. G., & Luftmann, H. (2000). Letter: The use of 2-[(2E)-3-(4-tert-butylphenyl)-2-methylprop-2-enylidene]malononitrile as a matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *European Journal of Mass Spectrometry*, 49–52.
- Vats, S. (2017). Nutraceuticals From Lignocellulosic Wastes and Their Health Application. In *Ingredients Extraction by Physico-Chemical Methods in Food*. Elsevier Inc.
- Vilar, D. D. A., Vilar, M. S. D. A., Moura, T. F. A. D. L. E., Raffin, F. N., Oliveira, M. R. De, Franco, C. F. D. O., De Athayde-Filho, P. F., Diniz, M. D. F. F. M., & Barbosa-Filho, J. M. (2014). Traditional Uses, chemical constituents, and biological activities of *Bixa Orellana* L.: A review. *Scientific World Journal*, 2014.

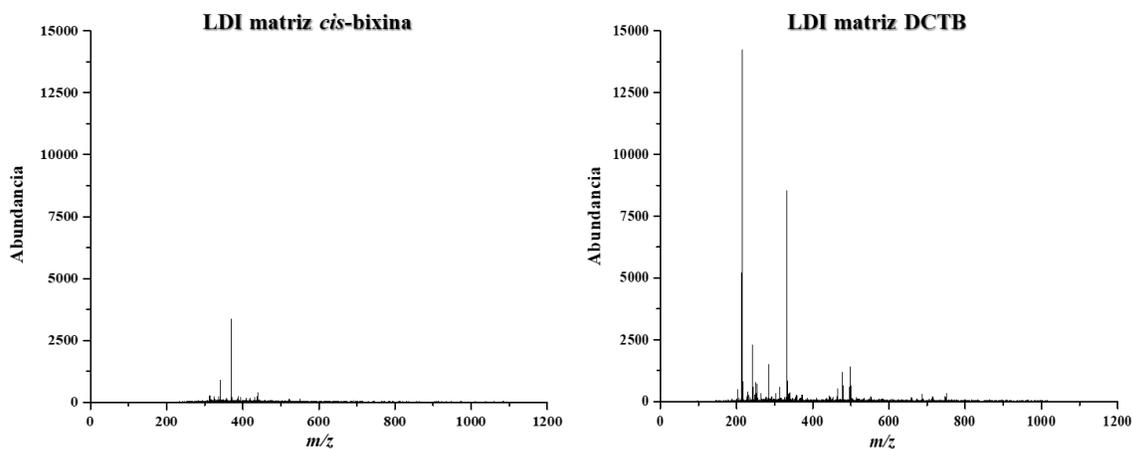
## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

- Vilar, D., Vilar, M., Moura, T., Raffin, F. N., Oliveira, M. R. De, Franco, C. F. D. O., De Athayde-Filho, P. F., Diniz, M. D. F. F. M., & Barbosa-Filho, J. M. (2014). Traditional Uses, chemical constituents, and biological activities of Bixa Orellana L.: A review. *Scientific World Journal*, 2014, 1–11.
- Wong, D. W. S. (1989). *Mechanism and Theory in Food Chemistry Second Edition*.
- Wyatt, M. F., Ding, S., Stein, B. K., Brenton, A. G., & Daniels, R. H. (2010). Analysis of various organic and organometallic compounds using nanostructure-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (NALDI-TOFMS). *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 21(7), 1256–1259.
- Yang, Y., & Benning, C. (2018). Functions of triacylglycerols during plant development and stress. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 49, pp. 191–198). Elsevier Current Trends.
- Yilmaz, C., & Gökmen, V. (2015). Chlorophyll. In *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 37–41). Elsevier.
- Yusa Marco, D., Domenech Carbo, M., Vaccarella, I., Batista Dos Santos, A., Vicente Palomino, S., & Fuster López, L. (2008). Characterization of colouring compounds in annatto (Bixa Orellana L.) Used in historic textiles by means of uv-vis spectrophotometry and ft-ir spectroscopy. *Arché*, 3, 153–158.
- Zagorevskii, D. (2016). Mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 367–380.
- Zenobi, R., & Knochenmuss, R. (1998). Ion formation in maldi mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 17(5), 337–366.
- Zhang, J., & Zenobi, R. (2004). Matrix-dependent cationization in MALDI mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(7), 808–816. <https://doi.org/10.1002/jms.657>

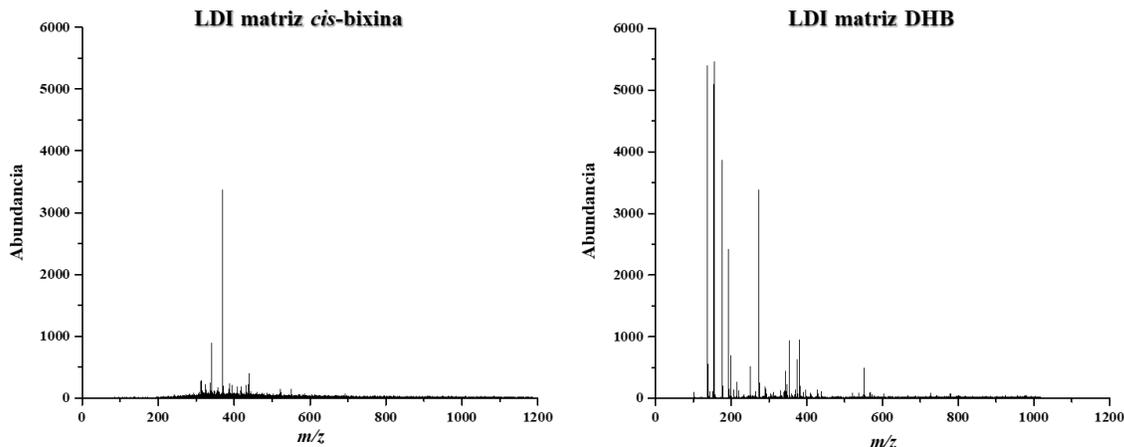
## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

## Anexos

**Anexo A.** Comparación entre espectros LDI de *cis*-bixina y DCTB 2,5 Mm con el fin de identificar señales de la matriz a zonas de masas bajas. Los espectros se obtuvieron en modo *full scan*, una incidencia del láser igual a 50  $\mu$ J y un volumen de 1  $\mu$ L depositado sobre el target MALDI.

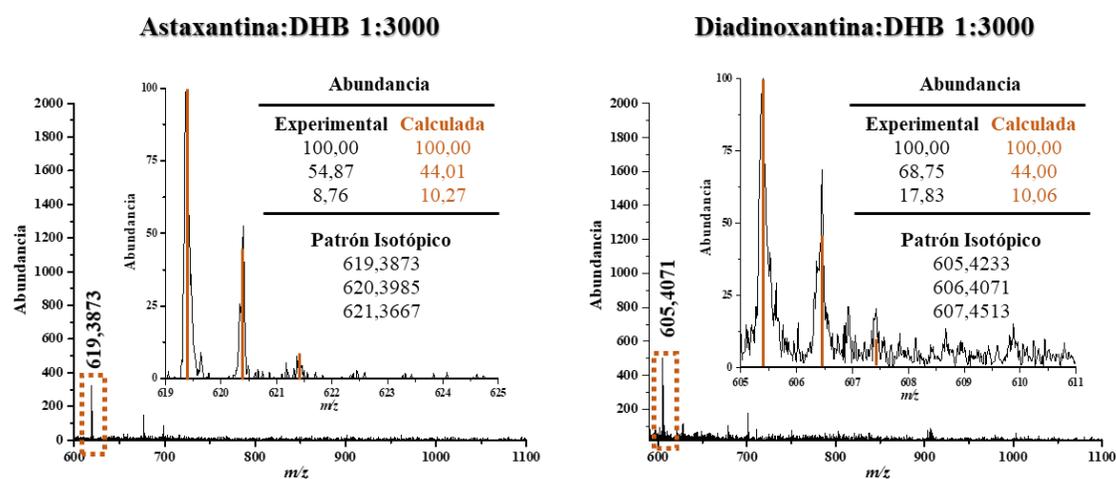


**Anexo B.** Comparación entre espectros LDI de *cis*-bixina y DHB 2,5 mM con el fin de identificar señales de la matriz a zonas de masas bajas. Los espectros se obtuvieron en modo *full scan*, una incidencia del láser igual a 50  $\mu$ J y un volumen de 1  $\mu$ L depositado sobre el target MALDI.



## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

**Anexo C.** Identificación de xantofilas como aductos de sodio usando DHB como matriz en una relación molar A:M 1:3000. El espectro se obtuvo en modo de iones positivo, en un rango  $m/z$  de 600 a 1100, con una incidencia del láser igual a 50  $\mu\text{J}$  y un volumen de 1  $\mu\text{L}$  depositado sobre el target MALDI.

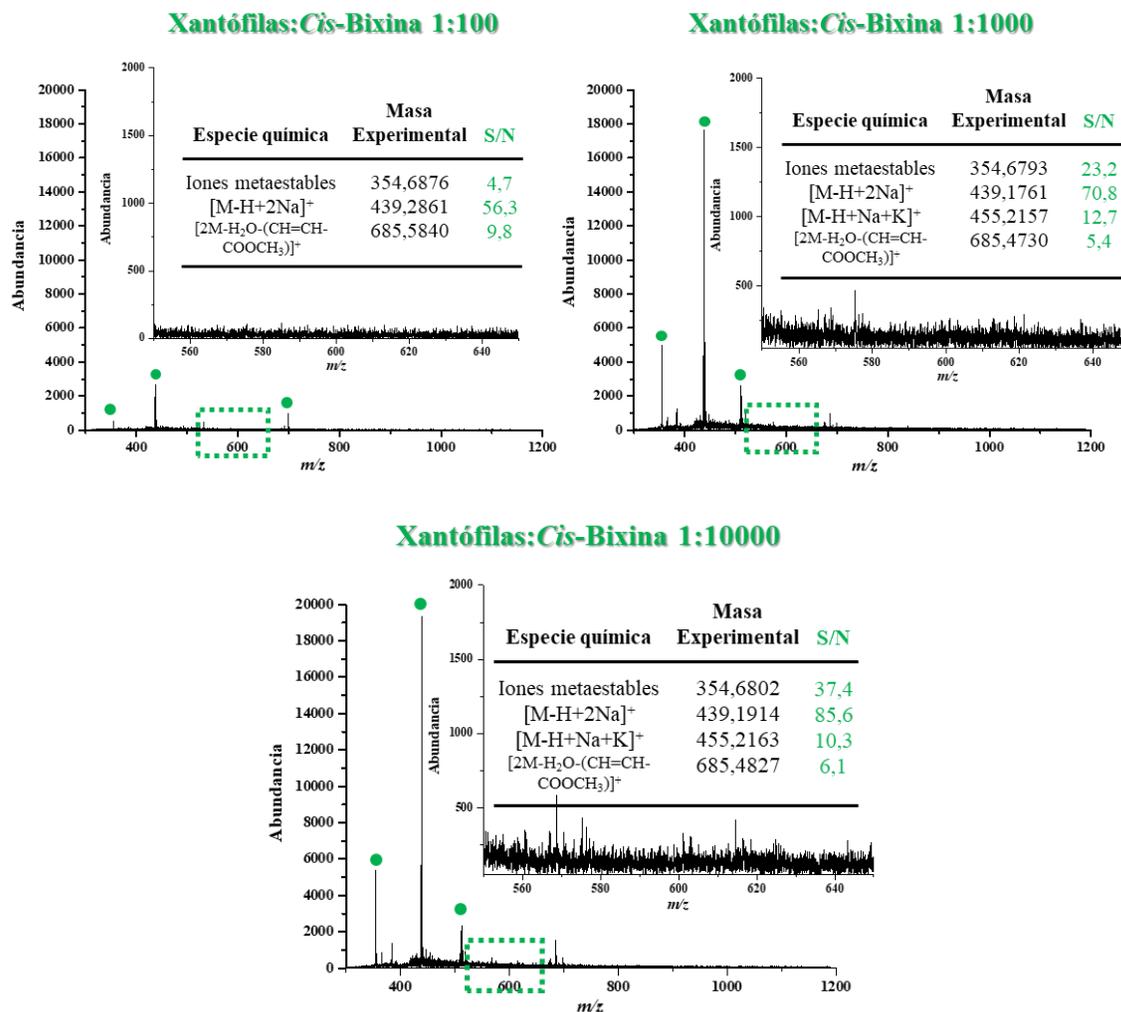


**Anexo D.** Identificación de xantofilas como aductos de sodio usando DHB como matriz, con su respectiva masa experimental, masa calculada, exactitud relativa en la masa y S/N.

Xantofila	Fórmula molecular	Masa	Masa	$\Delta\text{ppm}$	S/N
		experimental	calculada		
		$[\text{M}+\text{Na}]^+$	$[\text{M}+\text{Na}]^+$		
Astaxantina	$\text{C}_{40}\text{H}_{52}\text{NaO}_4$	619.3873	619.3763	17.7	21.9
Diadinoxantina	$\text{C}_{40}\text{H}_{54}\text{NaO}_3$	605.4071	605.3971	16.5	13.7

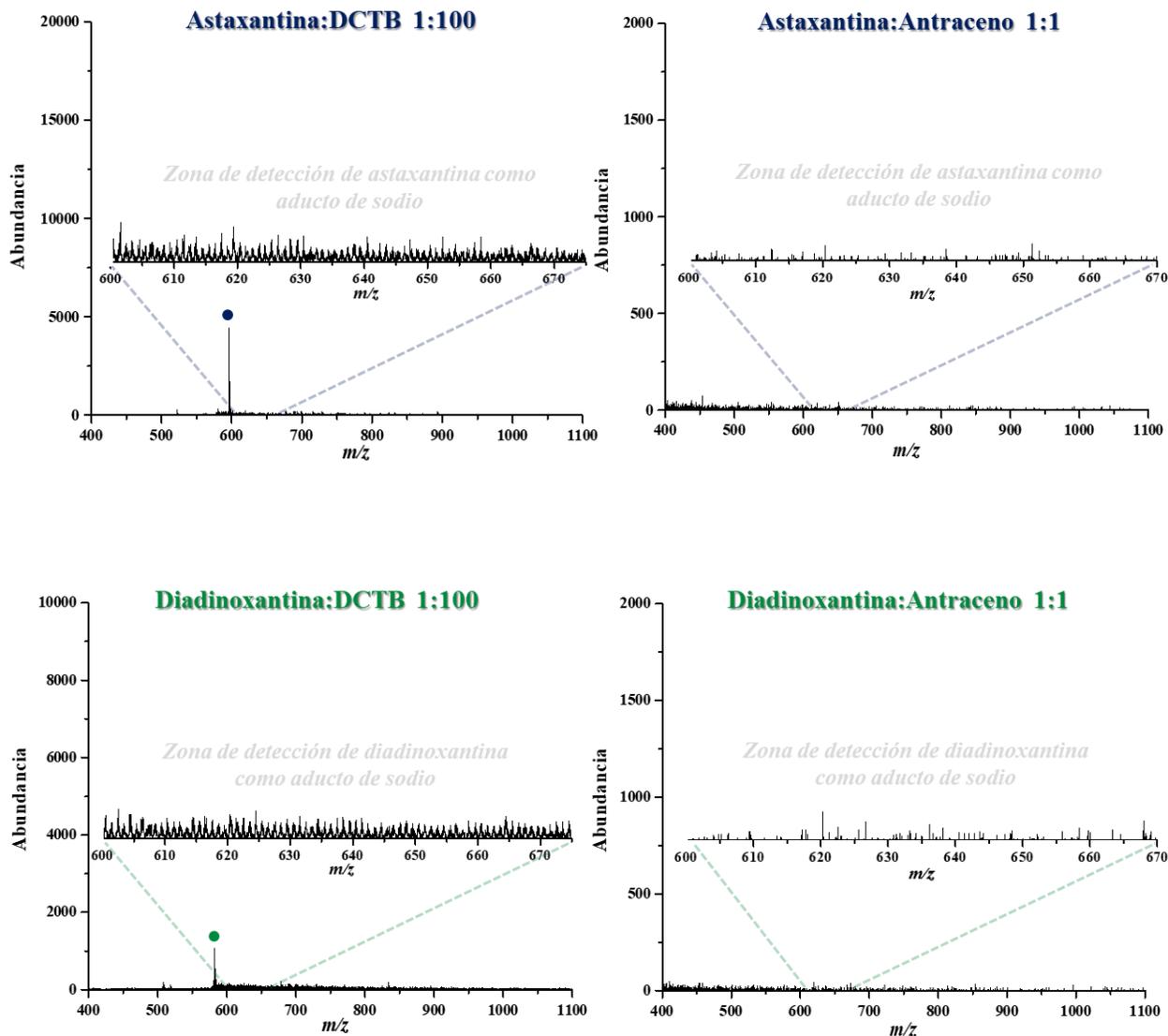
## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

**Anexo E.** Espectros de masas obtenidos en modo de iones positivo, usando *cis*-bixina 2.5mM como matriz MALDI para la identificación de xantófilas. Se emplearon relaciones molares A:M 1:100, 1:1000 y 1:10000 y los espectros se obtuvieron en una rango  $m/z$  de 300 a 1200, una incidencia del láser igual a 50  $\mu$ J y un volumen de 1 $\mu$ L depositado sobre el target MALDI.



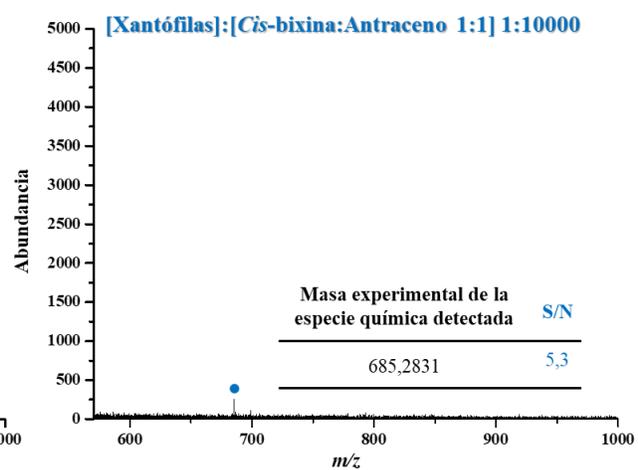
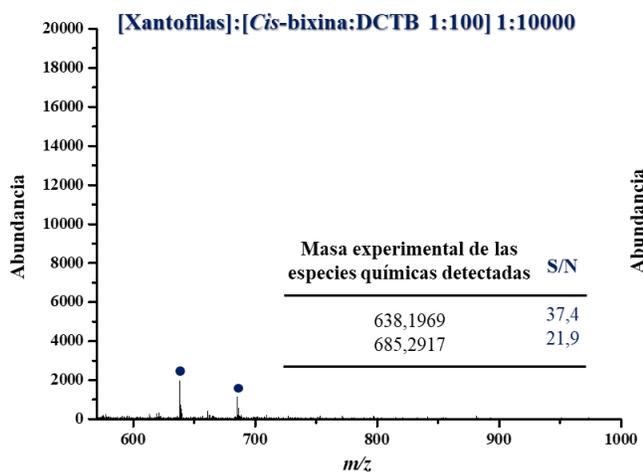
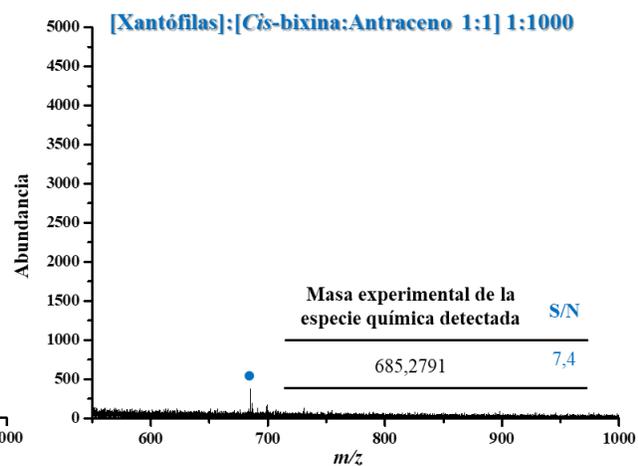
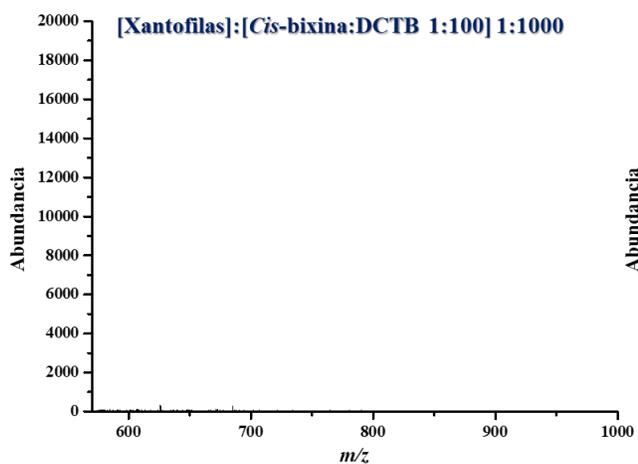
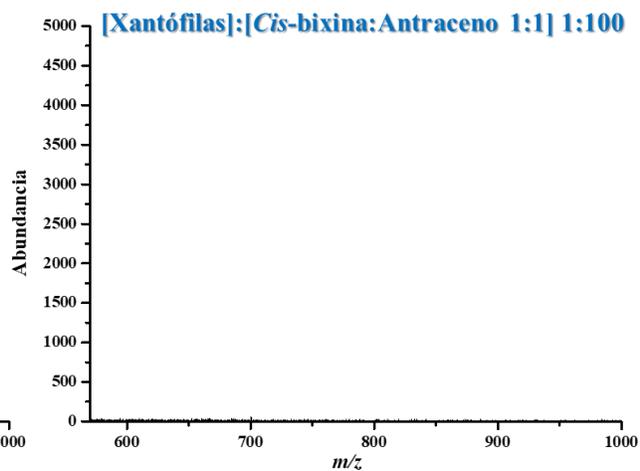
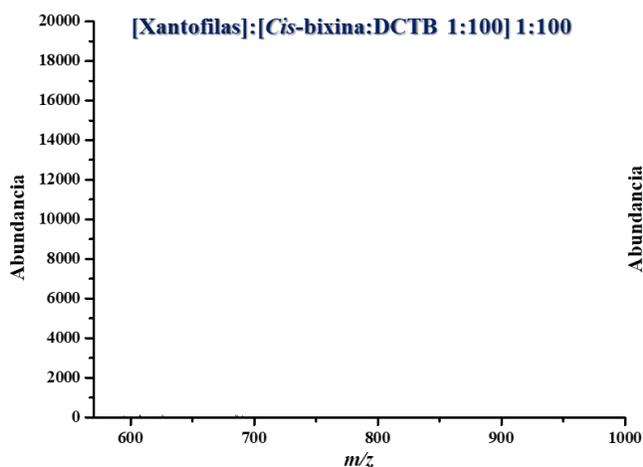
**Anexo F.** Espectros de masas obtenidos en modo de iones positivo para el análisis de xantófilas con APD's 2,5mM en relaciones molares A:APD 1:100 y 1:1 para DCTB y antraceno, respectivamente. Los espectros se obtuvieron con una incidencia del láser igual a 50  $\mu$ J y un volumen de 1 $\mu$ L depositado sobre el target MALDI.

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

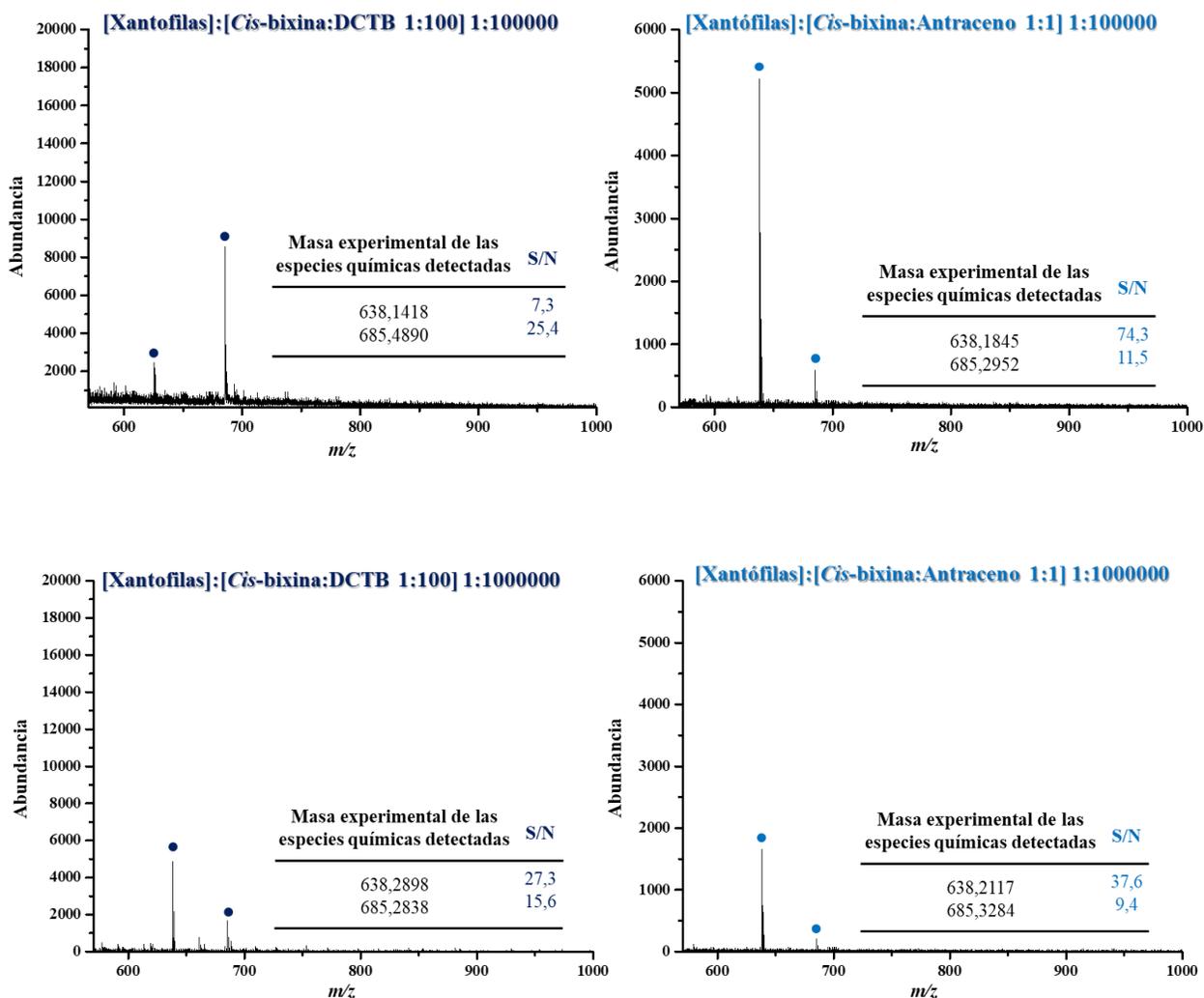
**Anexo G.** Evaluación de *cis*-bixina:APD como matriz MALDI para la identificación de xantofilas.

Los espectros se obtuvieron en modo de ionización positiva, con diferentes relaciones molares A:APD:M, en un rango  $m/z$  de 500 a 1000, con una incidencia del láser igual a 50  $\mu$ J y un volumen de 1  $\mu$ L depositado sobre el target MALDI.

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

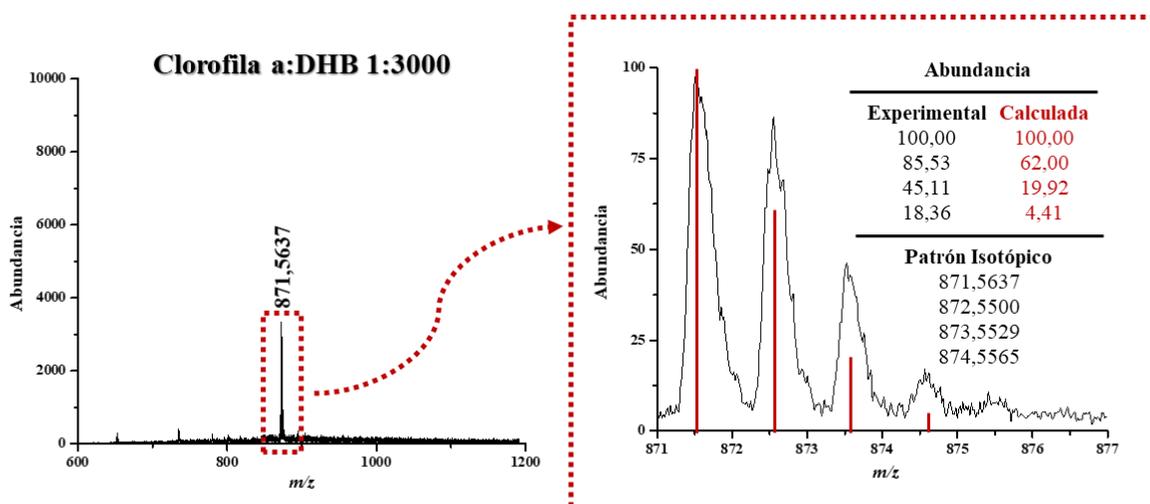


## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

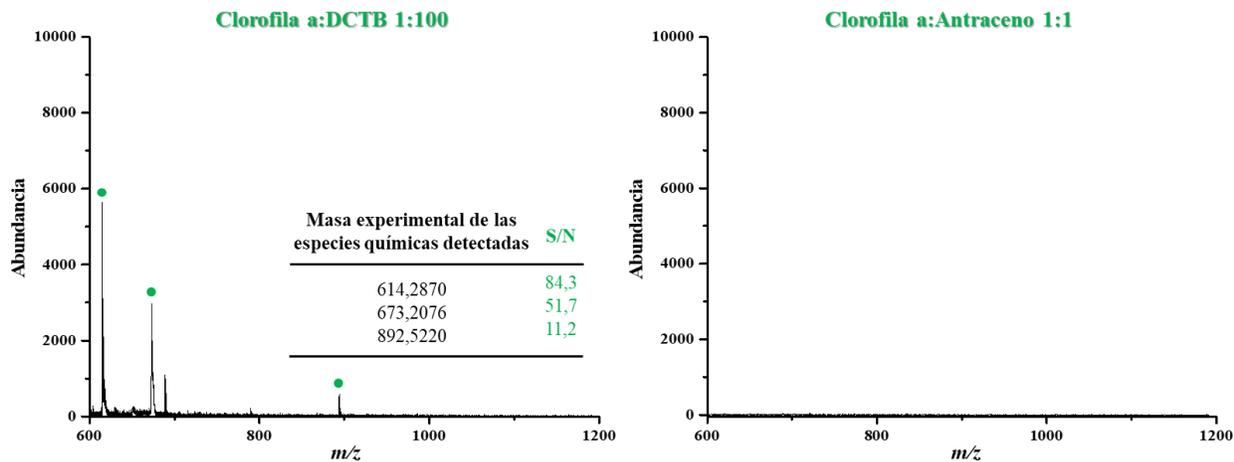


**Anexo H.** Identificación de clorofila a como ion protonada usando DHB como matriz. . El espectro se obtuvo en modo de iones positivo, en un rango  $m/z$  de 600 a 1200, con una incidencia del láser igual a  $50 \mu\text{J}$  y un volumen de  $1 \mu\text{L}$  depositado sobre el target MALDI.

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES



**Anexo I.** Comportamiento de los APD para la identificación de clorofila a. Los espectros de masas fueron obtenidos en modo de iones positivo para el análisis de clorofila con APD's 2,5mM en relaciones molares A:APD 1:100 y 1:1 para DCTB y antraceno, respectivamente.



**Anexo J.** Evaluación de *cis*-bixina:APD como matriz MALDI para la identificación de clorofila a. Los espectros se obtuvieron en modo de ionización positiva, con diferentes relaciones molares M:APD, en un rango  $m/z$  de 600 a 1200, con una incidencia del láser igual a 50  $\mu$ J y un volumen de 1 $\mu$ L depositado sobre el target MALDI.

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PIGMENTOS NATURALES

