

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FLAVONOIDES POR  
ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN MELAZAS RESIDUALES DE UN INGENIO  
AZUCARERO

JULIANA MARÍA MONEDERO PASIMINIO

UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES,  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS  
SANTIAGO DE CALI  
2016

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FLAVONOIDES POR  
ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN MELAZAS RESIDUALES DE UN INGENIO  
AZUCARERO

JULIANA MARÍA MONEDERO PASIMINIO

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE PREGADO EN QUÍMICA  
FARMACÉUTA

Tutor

Guillermo León Montoya Ph.D.

Cotutor

Giovanni Rojas Ph,D

UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES,  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS  
SANTIAGO DE CALI  
2015

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero quiero agradecer a mi familia, principalmente a mis padres y hermano por el apoyo incondicional brindado durante todo el desarrollo de mi carrera universitaria.

A mi tutor, Guillermo León Montoya por tener la paciencia y dedicación para guiarme durante el desarrollo de mi proyecto de grado y a mi cotutor Giovanni Rojas por el tiempo y acompañamiento durante el proyecto.

Gracias también al grupo de investigación del área de productos naturales por su colaboración, y en especial a Catalina Mosquera y Kelly Borrero que me brindaron su apoyo y ayuda durante el trabajo en el laboratorio.

## TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN .....	9
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO .....	10
2.1. Planteamiento del problema .....	10
2.2. Marco teórico .....	11
2.2.1. Caña de azúcar .....	11
2.2.2. Caña de azúcar en Colombia .....	11
2.2.3. Obtención de la melaza a partir del proceso productivo del azúcar .....	12
2.2.4. Flavonoides .....	12
2.2.5. Flavonoides presentes en la caña de azúcar .....	15
2.2.5. Técnica de extracción en fase sólida (SPE) .....	17
2.2.6. Cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) .....	18
2.3. Objetivos.....	20
2.3.1. Objetivo general .....	20
2.3.2. Objetivos específicos.....	20
2.3.3. Indicadores.....	20
2.4 Metodología .....	21
2.4.1 Matriz de marco lógico .....	21
2.4.2. Metodología propuesta.....	23
2.5 Resultados.....	27
2.6. Discusión .....	29
3. REFERENCIAS .....	43
8. ANEXOS .....	46

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de los flavonoides según sus características estructurales. ....	14
<b>Tabla 2.</b> Estructura de los flavonoides encontrados en la especie <i>Officinarum</i> .....	16
<b>Tabla 3.</b> Máximos de absorción UV de los flavonoides reportados en la especie <i>officinarum</i> de la caña de azúcar .....	17
<b>Tabla 4.</b> Nombres asignados a los extractos obtenidos .....	25
<b>Tabla 5.</b> Solventes, condiciones de presión y tiempo de corrida.....	26
<b>Tabla 6.</b> Proporción de la fase móvil en el tiempo .....	26

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Figura 1. Estructura básica de los flavonoides a) cadena de tres carbonos abierta b) anillo central heterocíclico ( $\gamma$ -pironas). (Martínez, 2005) (Martínez Flórez , Gónzales Gallego, Culbras , & Tuñón , 2002).....	13
<b>Figura 2.</b> Bandas características de los flavonoides en los espectros UV. (Colombo, Yariwake, Queiroz, Ndjoko, & Hostettmann, 2005) .....	13
<b>Figura 3.</b> Etapas de la técnica SPE(Cromlab S.L., 2014). .....	18
<b>Figura 4.</b> Composición de cartuchos Oasis.....	18
<b>Figura 5.</b> Extracción líquido-líquido de los flavonoides. ....	24
<b>Figura 6.</b> Montaje de la técnica de extracción en fase sólida (SPE). ....	25
<b>Figura 7.</b> Resultado positivo de la prueba de Shinoda, para el extracto obtenido mediante el Isolera Flash-One.....	27
<b>Figura 8.</b> Resultado negativo de la prube de Shinoda, para loes extractos Isolera A, Juliana A y Juliana B. ....	28
<b>Figura 9.</b> TLC de los extractos Isolera A y Juliana A,B,C,D,E,F.....	28

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Estructura general de las Gramíneas (Universidad Politécnica de Valencia, 2006).....	47
<b>Anexo 2.</b> Proceso de obtención de la melaza (Fajardo Castillo & Sarmiento Forero, 2007) .....	47
<b>Anexo 3.</b> Obtención del bioetanol a partir de la melaza. En esta imagen también se muestran de donde provienen el bagazo y la vinaza. ....	48
<b>Anexo 4.</b> Fragmentación de la disomina R1 = OH ; R2= OCH3; R3 = H (Colombo, Yariwake, & McCullagh, 2008).....	48
<b>Anexo 5.</b> Fragmentación de la tricín-7-glucosido R1 = OCH3 ; R2= OH; R3 = OCH3 (Colombo, Yariwake, & McCullagh, 2008). ....	48
<b>Anexo 6.</b> Espectros UV correspondientes al cromatograma del extracto Isolera A. ....	49
<b>Anexo 7.</b> Espectros UV correspondientes al cromatograma del extracto B. ....	49
<b>Anexo 8.</b> Espectros UV correspondientes al cromatograma del extracto C. ....	50
<b>Anexo 9.</b> Espectros UV correspondientes al cromatograma del extracto D. ....	52
<b>Anexo 10.</b> Espectros UV correspondientes al cromatograma del extracto E. ....	53
<b>Anexo 11.</b> Espectros UV correspondientes al cromatograma del extracto F. ....	54
<b>Anexo 12.</b> Espectro de masas correspondiente a la Diosmetina-8-C-glucosido en modo negativo. ....	56
<b>Anexo 13.</b> Espectro de masas correspondiente al schaftosido-C-glicósido en modo negativo. ....	56
<b>Anexo 14.</b> Espectro de masas correspondiente a tricína-8-C-glucósido en negativo. ....	56

## RESUMEN

En la actualidad, Colombia ha ganado cada vez más importancia dentro del sector azucarero gracias a que es uno de los principales productores y exportadores de este producto. Esto ha impactado de manera positiva la economía nacional, y además gracias a que los cultivos se encuentran concentrados principalmente en el Valle del Cauca también contribuyen a la economía local.

Durante el proceso productivo, además de la obtención del azúcar también se obtienen algunos subproductos tales como la melaza, en la que algunos estudios han identificado la presencia de compuestos fenólicos como los flavonoides, los cuales hacen parte de los metabolitos secundarios de las plantas y a los que se les ha atribuido propiedades antioxidantes. A pesar de que ya existen algunos estudios sobre estos compuestos en la caña de azúcar, la información sigue siendo escasa. Es por esto que el objetivo principal de este proyecto es determinar e identificar la presencia de flavonoides en la melaza residual de un ingenio azucarero, utilizando técnicas cromatográficas y espectrométricas, para así darle valor agregado a este subproducto y aumentar la rentabilidad del sector.

Para lograr este objetivo fue necesario realizar un proceso de extracción, en el cual se utilizaron diferentes condiciones en cuanto a los solventes y pH. Al final se obtuvieron siete extractos, en los cuales fue posible detectar por medio de cromatografía de alta eficiencia con un detector de fotodiodos (PDA) y por medio de espectroscopia UV, la presencia de vitexina, 4',5'-Dimetil-luteolin-8-C-glucosido, tricina-7-O-glicosido, tricina-4-O-(treo or eritro guaiacilgliceril) eter- 7-O-glucopiranoside, Schaftosido y tricina-7-O-neohesperidoside.

En cuanto a los resultados obtenidos mediante la técnica de espectrometría de masas, fue posible establecer con certeza tres flavonoides presentes en el extracto de licor de las torres de decoloración los cuales fueron: Schaftoside-C-glucósido, Diosmetina-8-C-glucósido y tricina-8-C-glucósido.

**Palabras claves:** Caña de azúcar, melaza, flavonoides, técnicas cromatográficas y espectrométricas

## ABSTRACT

Colombia has gained importance in the sugar sector because it is one of the leading producers and exporters of this product in the world. This has impacted positively the national economy, and also because the crops are concentrated mainly in Valle del Cauca also contribute to the local economy.

During the productive process, besides of obtaining sugar also other by products like the melaza are present, some studies have identified the presence of phenolic compounds such flavonoids, which are part of secondary metabolites of the plants and that has been attributed to them antioxidant properties. Although there are some studies in the field, the information remains very poor. The main objective of this project it is to qualify and identify the presence of flavonoids in the molasses from a sugar mill, using chromatographic and spectrometric techniques, and ultimate adding value to this byproduct and increasing the rentability of the sector.

To achieve this goal was necessary an extraction process in which different conditions were used as solvents and pH. Finally seven extracts were obtained, in which it was possible to identify by high efficiency chromatography the presence of vitexina, 4',5'-Dimetil-luteolin-8-C-glycoside, tricina-7-O-glycoside, tricin-4\_-O-(threo or erithro guiacylglycerl) ether- 7-O-glycopiranoside, Schaftoside y tricin-7-O-neohesperidoside.

It was possible to identify tree flavonoids present in the licor extractor of the bleaching towers by mass spec, the flavonoids: Schaftoside-C-glycoside, Diosmetin-8-C-glycoside y tricin-8-C-glycoside.

**Key Words:** Sugar cane, melaza, flavonoids, chromatographic and spectrometric techniques



## 1. INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es una Gramínea procedente de las regiones tropicales y subtropicales del sudeste asiático (Díaz Montejo & Protocarrero Rivera , 2002). Actualmente, en Colombia se encuentra concentrada en el Valle geográfico del río Cauca y debido a que en su tallo tiene un alto contenido de sacarosa, es posible producir azúcar a partir de esta, logrando contribuir de manera positiva tanto a la economía local como a la nacional (Asocaña, 2009).

Durante el proceso productivo del azúcar se obtienen algunos subproductos tales como el bagazo, melaza, vinaza entre otras; los cuales se han aprovechado para obtener otros productos útiles para los seres humanos, como el bioetanol a partir de la fermentación de la melaza y energía a partir de la combustión del bagazo. Además, algunos estudios recientes han demostrado que tanto en la caña de azúcar como en estos subproductos existen compuestos aromáticos como los flavonoides (Colombo, Yariwake, Queiroz, Ndjoko, & Hostettmann, 2005), los cuales hacen parte de los metabolitos secundarios de la caña de azúcar y se sintetizan a partir de una ruta biosintética mixta proveniente del ácido shikímico y la ruta de los policétidos. Estos son pigmentos naturales presentes en los vegetales y gracias a que en su estructura presentan algunos grupos hidroxilo, tienen la capacidad de quelar algunos metales de transición confiriéndoles una capacidad antioxidante (Martínez, 2005).

La importancia atribuida a estos compuestos extraídos de la melaza, se basa principalmente en un posible uso como agentes protectores frente a fenómenos de daño oxidativo. Esto le otorgaría otro valor agregado a este producto de desecho y por lo tanto, también aumentaría la rentabilidad del sector azucarero.

La finalidad de este proyecto es determinar los flavonoides presentes en la melaza residual proveniente del Ingenio Carmelita S.A. Para esto se desarrolló una metodología de extracción utilizando solventes afines con las moléculas de estudio y posteriormente se utilizó la técnica de extracción en fase sólida (SPE). Para la separación e identificación se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y por último para la caracterización se llevó a cabo la técnica de espectrometría de masas.

## 2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

### 2.1. Planteamiento del problema

Actualmente, Colombia es un país de gran importancia a nivel mundial en el mercado azucarero, ubicándose como el décimo tercer productor entre 120 países, además también es uno de los principales exportadores de este producto. Esto se evidenció según estudios realizados en el 2007 por la organización internacional del azúcar (OIA) (Arbelaéz, Estacio, & Olivera, 2010).

A parte de ser de gran importancia a nivel mundial, el sector azucarero tiene un impacto positivo sobre la economía nacional, influyendo de manera directa en el empleo, en el pago de los impuestos y en el producto interno bruto (PIB) del país (Asocaña, 2009). Se puede decir que los cultivos de caña de azúcar se encuentran concentrados principalmente en el Valle del Cauca desempeñando un papel importante y significativo en la economía local.

Durante el proceso de fabricación del azúcar, se generan diferentes productos de desecho tales como las hojas, el bagazo, melaza, vinaza, entre otras (Procaña (Asociación Colombiana de productores y proveedores de caña de azúcar)). Estos subproductos han cobrado cada día más importancia debido a que actualmente a partir de ellos se pueden obtener productos utilizados por los seres humanos, por ejemplo el bioetanol que se obtiene a partir de la fermentación de la melaza y la energía a partir de la combustión del bagazo, los cuales logran aumentar la rentabilidad de este sector.

Además de esto, en la caña de azúcar y en los productos derivados se han encontrado compuestos aromáticos. Por ejemplo, en la melaza que se obtiene durante el proceso de cristalización del azúcar, se encuentran gran variedad de compuestos que proveen el color característico de este residuo. Algunos de estos son los flavonoides (Colombo, Yariwake, Queiroz, Ndjoko, & Hostettmann, 2005), los cuales son pigmentos vegetales no nitrogenados que gracias a que en su estructura química poseen grupos hidroxilo, tienen la capacidad de quelar algunos metales de transición, lo que les confiere una capacidad antioxidante (Martínez, 2005).

La importancia de lo anterior radica en que se puede pensar que en un futuro los compuestos extraídos de la melaza se podrían utilizar para proporcionar protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, lo cual le daría otro valor agregado a este subproducto.

Es por esto que la finalidad de este proyecto se basa en la identificación y caracterización de algunos de los flavonoides presentes en la melaza residual, para así dar una aproximación de la estructura química de estos compuestos mediante la técnica de espectrometría de masas.

## **2.2. Marco teórico**

### **2.2.1. Caña de azúcar**

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es una Gramínea procedente de las regiones tropicales y subtropicales del sudeste asiático. Poco a poco se fue expandiendo por todo el continente africano y por la Europa meridional hasta que a finales del siglo XV llegó a América (Díaz Montejo & Protocarrero Rivera, 2002) y así iniciaron las primeras plantaciones en este continente.

Entre los constituyentes de la planta de caña de azúcar se encuentra la raíz, la cual es de tipo fibroso y se extiende hasta 80 cm de profundidad en los suelos. Esta es una parte esencial en la planta, ya que además de proveer el anclaje, también permite la absorción de nutrientes y agua para su supervivencia. Otro constituyente es el tallo, el cual es rico en sacarosa y por lo tanto es una parte crucial para la producción de azúcar. La sacarosa es sintetizada por la caña mediante la energía tomada por el sol durante la fotosíntesis. El tallo está dividido en dos: nudos y entrenudos (anexo 1), estos últimos constan de dos partes, una sólida llamada fibra (11-16%) la cual compone el bagazo una vez la caña es molida y una líquida que contiene sacarosa (8-15%) y agua (73%). Entre otros componentes, se encuentran las hojas cuya función principal es proteger la yema.

### **2.2.2. Caña de azúcar en Colombia**

Hoy en día los cultivos de caña de azúcar se encuentran concentrados en el Valle del Cauca, siendo fuente de obtención de mieles, panela y azúcar como productos de consumo. Anteriormente, solo se contaba con 3 ingenios en el Valle: Manuelita, Ríopaila y Providencia, actualmente son 13 plantas productoras en la región (Cabaña, Carmelita, Manuelita, María Luisa, Mayagüez, Pichichí, Risaralda, Sancarlos, Tumaco, Ríopaila-Castilla, Incauca y Providencia) (Asocaña, 2012).

En Colombia existen algunas entidades que se encargan de regular las políticas del sector azucarero adecuándolas a las nuevas tendencias. Entre estas entidades se encuentra: ASOCAÑA (asociación de cultivadores de caña de azúcar colombiana), PROCAÑA (asociación de proveedores y de caña de azúcar de Colombia), TECNICAÑA (asociación colombiana de técnicos de la caña de azúcar) CIAMSA (la Comercializadora Internacional de Azúcares y Mieles S.A.) y CENICAÑA (Asocaña s. a., 2009).

### **2.2.3. Obtención de la melaza a partir del proceso productivo del azúcar**

La melaza es un subproducto del proceso de cristalización final del azúcar. Según la Norma ICONTEC 587 de 1994, es un líquido denso y viscoso del cual no se puede cristalizar más azúcar por los métodos usuales.

Este residuo está compuesto por una mezcla compleja que contiene sacarosa, azúcar invertido (sacarosa hidrolizada), sales y otros compuestos solubles en álcali, además de los producidos durante la fabricación del azúcar.

La melaza se obtiene por una serie de pasos los cuales comienzan con la extracción del jugo, en el cual se utilizan unos molinos por los que pasa la caña para extraer más del 90% del azúcar, seguidamente se realiza el proceso de clarificación en donde se utiliza cal para neutralizar su acidez y calor hasta ebullición. Después de la extracción, el jugo resultante se somete a un proceso de cristalización en donde se forma una masa densa y finalmente se realiza el proceso de centrifugación en el cual los cristales de azúcar son retenidos (Fajardo Castillo & Sarmiento Forero, 2007) Anexo 2.

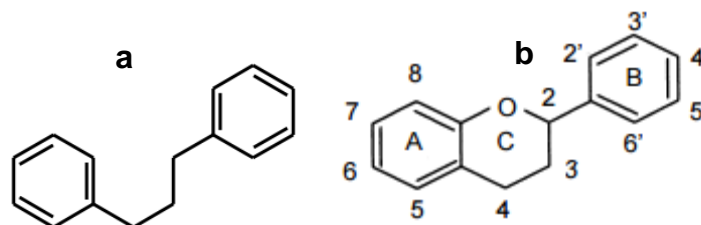
### **2.2.4. Flavonoides**

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales, fueron descubiertos por el Nobel en Fisiología y Medicina Dr. Albert Szent-Gyorgi, quien los denominó como “vitamina P” por permeabilidad. Poco tiempo después, este nombre fue descartado debido a que no se confirmó que estos compuestos hicieran parte de las vitaminas. Szent-Gyorgi también descubrió que estas sustancias potenciaban la acción de la vitamina C, mejorando su absorción y protegiéndola del daño oxidativo (Martínez Flórez , Gónzales Gallego, Culbras , & Tuñón , 2002).

Los flavonoides hacen parte de los metabolitos secundarios de algunas plantas y se sintetizan a partir de una ruta biosintética mixta, en este caso particular son provenientes de la ruta del ácido shikímico (porción cinamoílo) y la ruta de los policétidos (porción benzoílo) (Luengo, 2002). Estos compuestos le confieren colores amarillos, naranja, rojo, violeta y azul a muchas flores, hojas y frutos; con el fin de proteger a la planta frente a los rayos solares dañinos y también filtran algunas radiaciones para que con ayuda de la clorofila puedan ser útiles en el proceso de la fotosíntesis.

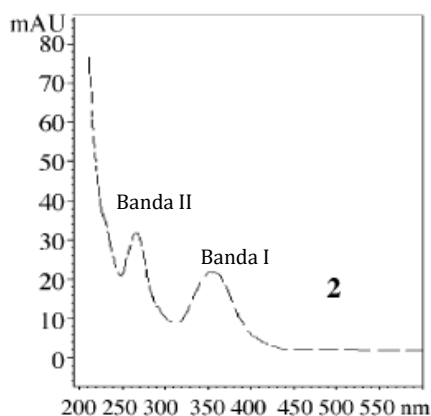
La estructura química de estos compuestos consta de dos anillos aromáticos (bencénicos), unidos a través de una cadena de tres carbonos que puede encontrarse como un anillo central heterocíclico ( $\gamma$ -pironas) que es el más común, o también con la cadena de tres carbonos abierta (Chalcona),  $C_6C_3C_6$  (Martínez, 2005) (Figura 1). También, contienen un número variable de grupos hidroxilo que les confiere la propiedad de quelación de hierro y otros metales de transición.

Gracias a esto, tienen un papel importante en la protección frente al daño oxidativo, influyendo positivamente en la mejora de algunas patologías tales como la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer (Trease & Evans, 2009).



**Figura 1.** Figura 1. Estructura básica de los flavonoides a) cadena de tres carbonos abierta b) anillo central heterocíclico ( $\gamma$ -pironas). (Martínez, 2005) (Martínez Flórez , Gónzales Gallego, Culbras , & Tuñón , 2002)

Además, gracias a los anillos bencénicos que poseen en su estructura, son capaces de absorber radiación ultravioleta. Esto sumado con la ruta biosintética de la cuál provienen, le confieren a la molécula sus características espectrales. La banda II que se encuentra en el rango de 240 a 285 nm, corresponde a la porción benzoílo, y La banda I que se encuentra en el rango de 300-400nm, es decir de mayor longitud de onda, corresponde a la porción cinamoílo, la cual puede variar de acuerdo al patrón de sustitución y la conjugación del anillo C (Ugaz, 1997)(Figura 2).

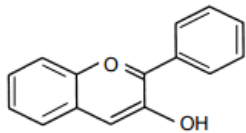
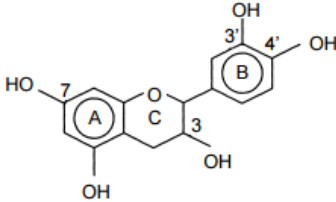
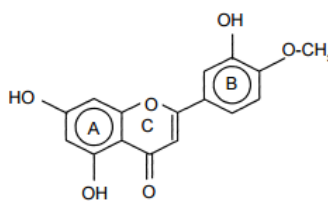
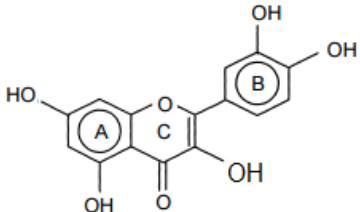


**Figura 2.** Bandas características de los flavonoides en los espectros UV. (Colombo, Yariwake, Queiroz, Ndjoko, & Hostettmann, 2005)

La estructura básica de los flavonoides permite gran variedad de reacciones de sustitución y variaciones en el anillo C. La capacidad antioxidante de estos va a depender de las propiedades redox de los grupos hidroxilos sustituyentes y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química. Con base en esto, en la tabla 1 se puede observar su clasificación (Escamilla Jiménez, Cuevas Martínez, & Guevara Fonseca , 2009).

Existen tres características principales que van a determinar la función antioxidante de los flavonoides: la primera es la presencia de la estructura catecol u Orto-hidroxil en el anillo B, la segunda es la presencia de un doble enlace en la posición 2,3 y por último la presencia de grupos hidroxilo en la posición 3 y 5. Como se puede observar en la tabla 1, la catequina solo presenta una de las tres características al igual que la diosmetina, mientras que la quercetina que es uno de los flavonoides más comunes presenta las tres características (Martínez Flórez , Gónzales Gallego, Culbras , & Tuñón , 2002).

**Tabla 1.** Clasificación de los flavonoides según sus características estructurales.

Nombre	Descripción	Ejemplo	Estructura
Antocianidinas	Tiene un grupo –OH unido en posición 3, pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.	Antocianidina	
Flavanos	Con un grupo –OH en posición 3 del anillo C.	Catequina	
Flavonas	Poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.	Diosmetina	
Flavonoles	Grupo carbonilo en posición 4 y un grupo –OH en posición 3 del anillo C.	Quercetina	

(Escamilla Jimenéz, Cuevas Martínéz, & Guevara Fonseca , 2009)

Existen varias formas en las que se pueden encontrar los flavonoides en las plantas: como agliconas que son los flavonoides en su forma libre, o como glicósidos que son a los que se les une un azúcar en la posición C3 (en mayor grado) o en la posición C7 (menor grado) en el caso de los flavonoles y las flavonas. Adicionalmente, de los glicósidos se derivan los O-glicósidos en los que el azúcar se une a través de átomos de oxígeno (enlace hemiacetal) y los C-

glicósidos en los que el azúcar se une a través de enlace C-C. Los glicósidos son solubles en agua caliente, alcohol y disolventes orgánicos polares, mientras que las agliconas son solubles en disolventes orgánicos ligeramente oxigenados dependiendo de su polaridad. Esto es de gran importancia a la hora de realizar la extracción de estas sustancias (Rijke, Out, & Niessen, 2006)

Existen algunos métodos de identificación que son netamente cualitativos, entre los cuales se encuentran los ensayos de color, que permiten el reconocimiento de flavonoides por un cambio en la coloración (Martínez, 2005). Entre estos se encuentran:

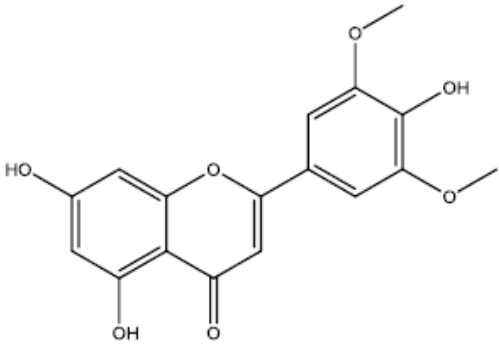
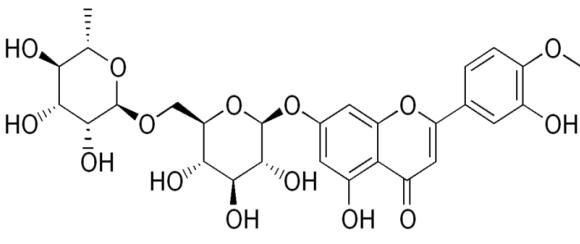
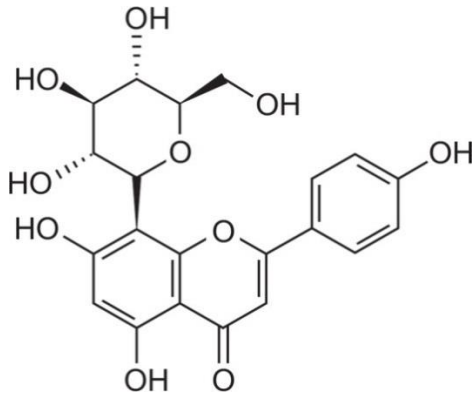
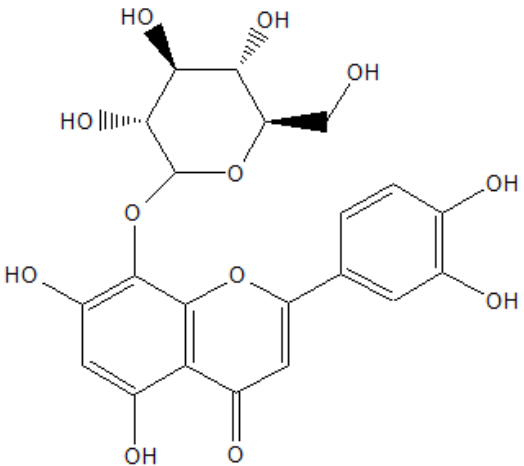
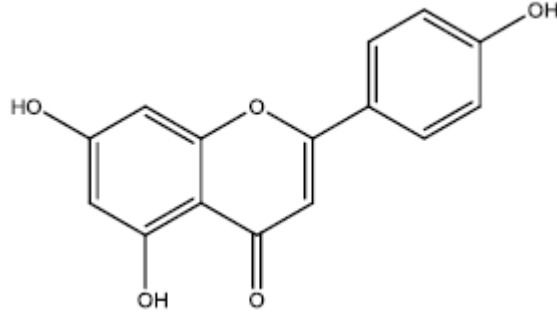
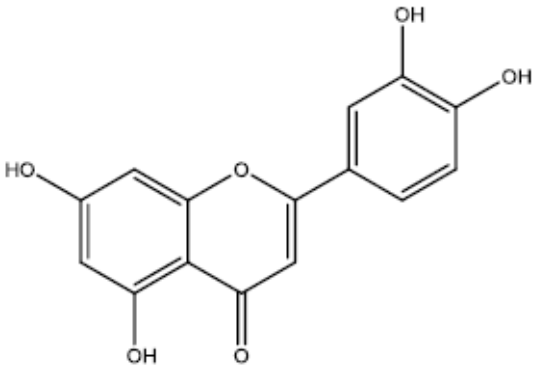
- Ensayo de Shinoda: este se utiliza para flavonoides con tengan es su estructura un núcleo benzopirona como las flavonas, flavonoles, flavanonas, etc. producen coloraciones rojizas cuando a sus disoluciones acuosas o alcohólicas. Se adiciona magnesio seguido de ácido clorhídrico (HCL) concentrado.
- Ensayo Zn/HCL: flavonoles producen coloraciones rojo-violetas. Mientras que las flavanonas y flavanoles no producen color o producen coloraciones rosadas débiles.
- Ensayo de Pacheco: Los flavonoles producen un color rojo característico mientras que las flavonas, chalconas, auronas, flavonoles y flavanonas dan una respuesta negativa. El extracto sólido que contiene flavonoides se calienta con cristales de AcONa Y 0,1mL de anhídrido acético seguido de dos gotas de HCL concentrado.

### **2.2.5. Flavonoides presentes en la caña de azúcar**

Algunos estudios han evidenciado la presencia de compuestos fenólicos, especialmente de flavonoides en la caña de azúcar y en diferentes productos provenientes de esta, tales como el azúcar blanco, azúcar morena, panela y miel de caña (melaza); haciendo énfasis en que los que conservan en mayor grado estos compuestos que tienen actividad antioxidante y que le dan el color característico a estos productos son la panela y la miel de caña (Universidad politécnica de Valencia, 2013).

En el género *Saccharum* se han reportado cinco clases de flavonoides entre los cuales se encuentran las antocianinas, catequinas, chalconas, flavonoles y flavonas (Larrahondo, 1995). Y en la especie *Officinarum* se han encontrado especialmente flavonas tales como la, diosmina, vitexina, orientina, derivados de la tricina, apigenina entre otras (Colombo, Yariwake, & McCullagh, 2008). Además de identificar la presencia de estos flavonoides, en sus estudios Renata Colombo, también ha establecido algunos de los máximos de absorción de estos compuestos correspondientes a las dos bandas que los caracterizan (Tabla 3).

**Tabla 2.** Estructura de los flavonoides encontrados en la especie *Officinatum*

Tricina	Diosmina
	
Vitexina	Orientina
	
Apigenina	Luteolina
	



**Tabla 3.** Máximos de absorción UV de los flavonoides reportados en la especie *officinarum* de la caña de azúcar

Flavonoide	Espectro UV (nm)	
	Banda I	Banda II
Diosmetin-8- <i>C</i> -glycoside-arabinoside	321	270
Diosmetin-8- <i>C</i> -glicoside	350	260
Tricin-7- <i>O</i> -rhamnosilgalactoronide	328	270
Tricin-4- <i>O</i> -( <i>threo</i> or <i>erythro</i> guaiacylglyceryl) ether-7- <i>O</i> -glucopyranoside	340	270
Tricin-4- <i>O</i> -( <i>threo</i> or <i>erythro</i> guaiacylglyceryl) ether	348	260
Tricin-7- <i>O</i> -neohesperidoside	351	265
Luteolin-8- <i>C</i> -(rhamnosylglucoside)	348	260
Vitexin	334	270
Orientin	324	242
Tricin-7- <i>O</i> -glycoside	346	253
Schaftoside/isochaftoside	330	269
4',5'-Dimethyl-luteolin-8- <i>C</i> -glucoside	351	270

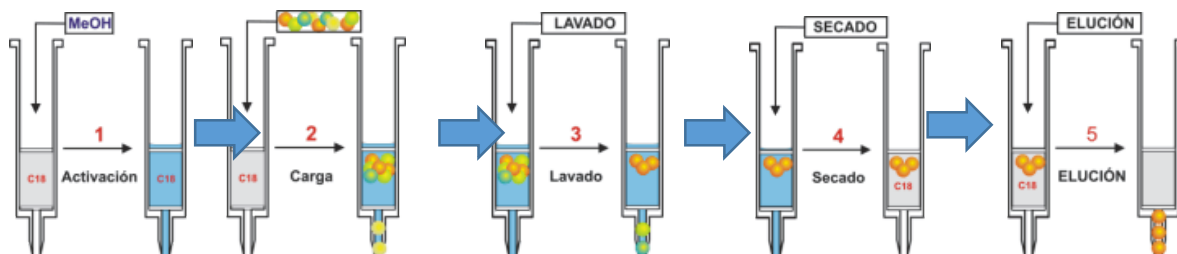
(Colombo, 2006) (Colombo, Yariwake, Queiroz, Ndjoko, & Hostettmann, 2005)

### 2.2.5. Técnica de extracción en fase sólida (SPE)

Esta técnica se basa en la retención del analito de interés que se encuentra en una muestra líquida, sobre un adsorbente el cual se está en una matriz sólida. Es una técnica sencilla y rápida, emplea poco disolvente lo que hace que el impacto sobre el medio ambiente y los costos sean menores. Existen diferentes tipos de adsorbentes que se acoplan de acuerdo al analito que se desea extraer (Rodríguez, 2008).

El éxito de esta técnica depende de seguir adecuadamente las siguientes etapas, primero se encuentra la etapa de acondicionamiento del cartucho, en donde ocurre la activación del adsorbente y de los grupos funcionales, para activar los adsorbentes hidrofóbicos se usa generalmente metanol o acetonitrilo, mientras que para los hidrofílicos se utiliza hexano o cloruro de metileno. Posteriormente se realiza la carga de la muestra, seguida de la etapa de lavado en la cual se da la eliminación de los compuestos de interferencia manteniendo los analitos en el lecho del adsorbente, otro paso que permite mejorar el rendimiento de la extracción, es el secado, en donde se hace circular aire por un determinado tiempo a través del cartucho para eliminar trazas del solvente utilizado en la etapa de lavado. Por último se encuentra la etapa de elución, en donde se utiliza un

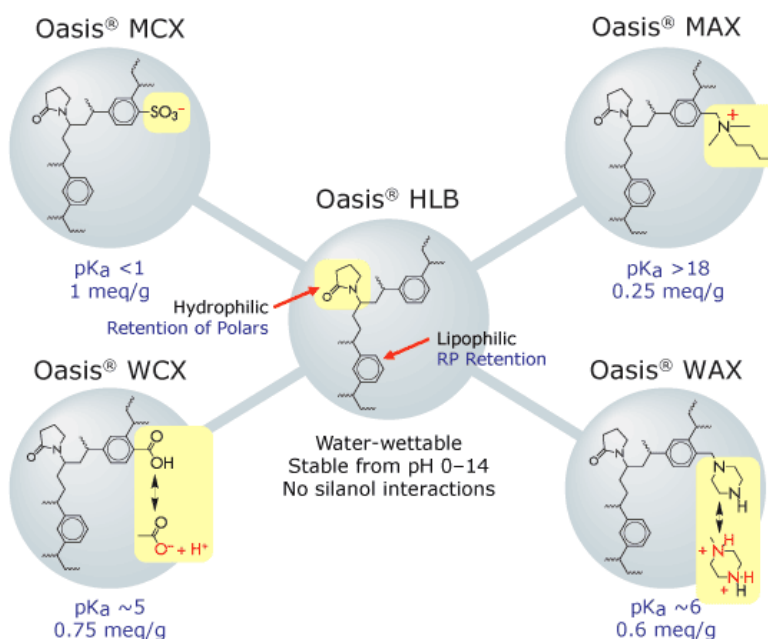
solvente con alta afinidad por los analitos, para así obtener la mayor cantidad de compuestos de interés (Cromlab S.L., 2014)(Figura 3).



**Figura 3.** Etapas de la técnica SPE(Cromlab S.L., 2014).

### Cartuchos Oasis® HLB

Oasis HLB es un polímero versátil, muy hidrofílico, y fácilmente humectable. Tienen una capacidad de retención elevada, incluso si se seca después de acondicionamiento, es un adsorbente de fase reversa ideal para analitos neutros, básicos y ácidos.



**Figura 4.** Composición de cartuchos Oasis.

### 2.2.6. Cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS)

Esta técnica se fundamenta en la separación de iones moleculares por su diferencia de masa, permite determinar la masa molecular y la fórmula de un compuesto así como también algunas de sus características estructurales (Skoog, Holler, & Crouch, 2001).

Se utiliza para el análisis de muestras que contienen analitos poco volátiles. Cuenta con unos sistemas de ionización especiales (ionización a presión atmosférica) para lograr el desarrollo la técnica. Gracias a esto, es posible analizar compuestos de alto peso molecular, con un rango de polaridades que va desde analitos no polares hasta los muy polares. Los espectros que se obtienen a partir de esta técnica, son más sencillos que los obtenidos mediante la cromatografía de gases acoplada a masas, debido a que el nivel de fragmentación es menor. La desventaja de esta técnica es que los espectros dependen en cierta medida, de los parámetros de ionización por lo que no se pueden considerar como “huellas dactilares” del compuesto (Guzmán, 2011). Cabe resaltar que para esta técnica la influencia del pH toma gran relevancia.

En los anexo 4 y 5, se mostrará la forma en que generalmente se fragmentarían algunas flavonas de la especie *Officinarum*.

## **2.3. Objetivos**

### **2.3.1. Objetivo general**

Determinar los flavonoides presentes en la melaza residual proveniente de un ingenio azucarero por medio de la técnica de espectrometría de masas.

### **2.3.2. Objetivos específicos**

- Estandarizar una metodología para la extracción e identificación de algunos flavonoides, utilizando técnicas cromatográficas.
- Establecer una estructura aproximada de algunos de los flavonoides presentes en la melaza residual utilizando la técnica de espectrometría de masas.
- Identificar potenciales aplicaciones de los flavonoides encontrados de acuerdo a la estructura química.

### **2.3.3. Indicadores**

- Protocolo en el cual se definan las condiciones de obtención de los flavonoides utilizando como punto de partida la melaza.
- Tiempo de retención obtenido en el cromatograma.
- Pico base de la estructura básica de los flavonoides.
- Encontrar una referencia bibliográfica relevante en la que asocien la presencia de grupos funcionales en los flavonoides con aplicaciones terapéuticas.

## 2.4 Metodología

### 2.4.1 Matriz de marco lógico

<p><b>Objetivo general:</b> Determinar los flavonoides presentes en la melaza residual proveniente de un ingenio azucarero por medio de la técnica de espectrometría de masas.</p>			
Objetivos específicos	Actividades	Indicadores	Supuestos
<p>Estandarizar una metodología para la extracción e identificación de algunos flavonoides, utilizando técnicas cromatográficas.</p>	<p>Obtención de la melaza proveniente del proceso de producción de azúcar del ingenio Carmelita S.A.</p> <p>Preparación de la muestra: tomar en dos recipientes diferentes dos muestras con melaza y llevar una de estas a pH=2 utilizando ácido fosfórico.</p> <p>Extracción de los flavonoides utilizando como solvente el acetonitrilo o acetato de etilo:metanol en ambos recipientes.</p> <p>Llevar las muestras al sonicador y refrigerar</p>	<p>Protocolo en el cual se definan las condiciones de obtención de los flavonoides utilizando como punto de partida la melaza.</p> <p>Tiempo de retención obtenido en el cromatograma.</p>	<p>Disponibilidad de solventes y demás reactivos utilizados en el proceso de extracción e identificación.</p> <p>Disponibilidad y estado del liofilizador.</p> <p>Disponibilidad y estado del equipo Isolera Flash-One.</p>

	<p>Concentración de la muestra utilizando el rotaevaporador.</p> <p>Liofilizar para retirar residuos de agua.</p> <p>Separación e identificación de los flavonoides utilizando cromatografía Líquida de alta eficiencia (HPLC) y TLC.</p>		
<p>Establecer una estructura aproximada de algunos de los flavonoides presentes en la melaza residual utilizando la técnica de espectrometría de masas.</p>	<p>Llevar la muestra al espectrómetro de masas.</p> <p>Tomar el espectro</p> <p>Elucidación de una estructura aproximada de algunos flavonoides presentes después del proceso de separación por medio del software MestReNova.</p>	<p>Pico base de la estructura básica de los flavonoides.</p>	<p>Disponibilidad y estado del espectrómetro de masas.</p>
<p>Identificar potenciales aplicaciones de los flavonoides encontrados de</p>	<p>Realizar búsquedas bibliográficas en donde asocien la presencia de</p>	<p>Encontrar al menos una referencia bibliográfica</p>	<p>No encontrar referencias en las cuales asocien de</p>

acuerdo a la estructura química	algunos grupos funcionales presentes en los flavonoides y la estructura como tal con aplicaciones terapéuticas.	relevante en la que asocien la presencia de grupos funcionales en los flavonoides con aplicaciones terapéuticas.	alguna manera la estructura química con la actividad terapéutica de los flavonoides.
---------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------

## 2.4.2. Metodología propuesta

### 2.4.2.1. Obtención de la muestra

El material de partida para realizar los análisis respectivos es la melaza, la cual será suministrada por el ingenio Carmelita S.A.

### 2.4.2.2. Extracción y purificación de los flavonoides

#### *Extracción*

Para la extracción de los flavonoides presentes en la melaza residual, se tomó como referencia el procedimiento realizado por Renata Colombo (Colombo, Yariwake, & McCullagh, 2008), en el cual proponen utilizar una mezcla de solventes polares debido a que la mayoría de flavonoides se encuentran en su estado glicosilado, haciendo que estos sean solubles en dichos solventes.

Para este procedimiento se tomaron aproximadamente 300mL de la muestra, se le adicionaron alrededor de 600 mL de la mezcla acetato de etilo:metanol 1:1 y posteriormente se llevó al sonicador por 30 minutos para mejorar la solubilidad de la muestra con el solvente, por último se rotaevaporó para su concentración. Este procedimiento se realizó por duplicado ajustando una de las muestras a pH ácido (pH = 2,4) utilizando ácido fosfórico y la otra se dejó con las condiciones estándares (pH = 6,2), esto se realizó con el fin observar el comportamiento de la muestra a diferentes condiciones. Con este mismo objetivo se repitió este procedimiento pero esta vez utilizando como solvente acetonitrilo, el cual es un solvente aprótico que no dona ni acepta protones y por lo tanto mantiene la identidad de los compuestos que se van a extraer.



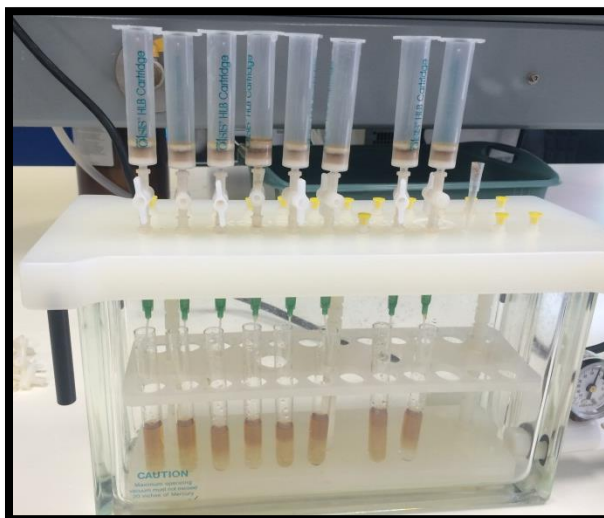
**Figura 5.** Extracción líquido-líquido de los flavonoides.

Con motivo de tener otra muestra para realizar la comparación, se utilizó el equipo Isolera Flash-One para retener la mayor cantidad de azúcar posible y así obtener un extracto libre de compuestos que no eran objetivo de estudio. Para este procedimiento se tomó 1 kg de melaza diluida en 4500 mL de agua con 500mL de metanol, se pasaron a través de una columna C18 y posteriormente para extraer los analitos de interés se utilizó metanol grado HPLC el cuál es un solvente afín con dichas moléculas. A este extracto se le realizó la prueba de Shinoda. Para esta prueba se utilizaron 2 tubos de ensayo, a los cuales se les adicionó la misma cantidad del extracto (aproximadamente 2mL). A uno de los tubos se le agregó una lámina de magnesio y posteriormente de 3 a 4 gotas de ácido clorhídrico (HCL) concentrado.

Después de realizar estos procedimientos de extracción, las muestras aún conservaban cantidades considerables de agua y de azúcar, por lo que fue necesario utilizar métodos alternos para eliminarlas.

La muestra tratada por el equipo Isolera Flash-One, al igual que a las extraídas con acetato de etilo:metanol 1:1, se les implementó la técnica de extracción en fase sólida (SPE). Esta técnica permite la concentración y purificación de los analitos en solución por adsorción de estos en una fase sólida (Rodríguez, 2008). En este procedimiento se utilizaron ocho cartuchos Oasis® HLB con capacidad de 6 cm<sup>3</sup>, los cuales se activaron con 3mL de metanol, posteriormente se hicieron dos enjuagues con agua y por último se cargaron los cartuchos con 1,5 mL de muestra cada uno. Los compuestos que no son objeto de estudio, es decir los azúcares presentes, se eluyeron con dos enjuagues de 3mL de agua cada uno y se dejó secar al vacío por una hora para eliminar toda el agua restante. Para recuperar los flavonoides que quedaron retenidos en la fase sólida se utilizó 3mL de metanol y se llevó a rotaevaporador para concentrar. Cabe resaltar que este procedimiento se realizó con cada una de las muestras extraídas anteriormente.





**Figura 6.** Montaje de la técnica de extracción en fase sólida (SPE).

Al residuo obtenido después de lavar con agua los cartuchos cargados con la muestra se le realizó la prueba de Shinoda.

Las muestras extraídas con acetonitrilo y con acetato de etilo:metanol 1:1 se llevaron a refrigerar a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  por 24 horas y posteriormente se liofilizaron.

Para facilitar la escritura, a cada muestra se le asignó un nombre (Tabla 4).

**Tabla 4.** Nombres asignados a los extractos obtenidos

Muestra	Nombre asignado al extracto
Muestra tratada con Isolera Flash-One	Isolera A
Muestra acetato de etilo:metanol 1:1 SPE pH = 6,2	A'
Muestra acetato de etilo:metanol 1:1 SPE pH = 2,4	B
Muestra acetato de etilo:metanol 1:1 Liofilizada pH = 6,2	C
Muestra acetato de etilo:metanol 1:1 liofilizada pH = 2,4	D
Muestra acetonitrilo liofilizada pH = 6,2	E
Muestra acetonitrilo liofilizada pH = 2,4	F

### *Detección e identificación de flavonoides en la melaza residual de un ingenio azucarero*

Para la identificación y detección, se llevó a cabo la técnica de cromatografía en capa delgada (TLC) y cromatografía de alta eficiencia (HPLC).

Para la TLC, se sembraron aproximadamente 5 µL de las muestras extraídas, las cuales se corrieron en una fase móvil que estaba constituida por una mezcla de acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua 100:11:11:26 de la cual se prepararon 20 mL, y como fase estacionaria se utilizó una placa de sílica gel. Para revelar las placas después de haberlas sembrado, se utilizó una solución al 1% de difenilboriloxietilamina seguida de una solución al 5% de polietilenglicol-4000 (PEG-4000) etanólico y su detección se realizó en una longitud de onda 365 nm (Wagner & Bladt, 2001).

En cuanto a la técnica de HPLC, se utilizó una columna ACQUITY UPLC® HSS T3 1,8 µm 2.1 x 100mm y un detector de fotodiodos (PDA), el cual permite la detección y cuantificación de bajas concentraciones de analitos y también, permite comparar los espectros a distintas longitudes de onda en un amplio intervalo de concentraciones (Waters, 2016). Las condiciones durante este procedimiento fueron las siguientes:

**Tabla 5.** Solventes, condiciones de presión y tiempo de corrida

	<b>Solventes</b>	<b>Límites de presión</b>	<b>Tiempo de corrida</b>
A	Agua + 0,05% Ac. Fórmico	15000 lb	15.00 minutos
B	Acetonitrilo		

**Tabla 6.** Proporción de la fase móvil en el tiempo

<b>Tiempo</b>	<b>Flujo (mL/min)</b>	<b>%A</b>	<b>%B</b>	<b>Curva</b>
Inicial	0,400	99,0	1,0	Inicial
0,50	0,400	99,0	1,0	6
7,00	0,400	80,0	20,0	6
11,00	0,400	65,0	35,0	6
11,10	0,400	99,0	1,0	6
15,00	0,400	99,0	1,0	6

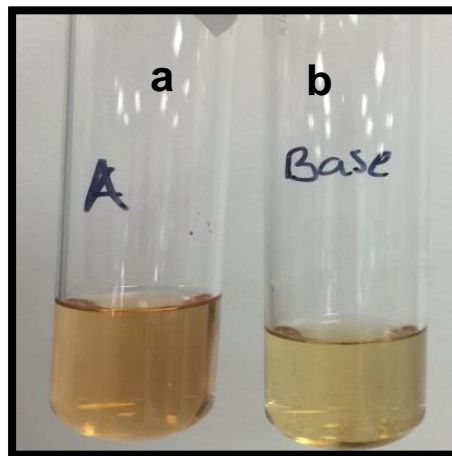
#### **2.4.2.3. Caracterización de flavonoides por Cromatografía Líquida/espectrometría de masas (LC-MS)**

El espectrómetro de masas utilizado durante el proceso de caracterización de flavonoides, se encuentra acoplado al UPLC. Para esta técnica se utilizó un

detector PDA, con un rango de longitud de onda de 210 nm a 400 nm a una resolución de 1,2 nm y con una tasa de muestreo de 20 puntos/seg. El tiempo de corrida fue de 0 a 14,99 minutos con una fuente de voltaje de 1,50 KV, con una tensión capilar de 30V y la temperatura de desolvatación fue de 600°C. Los espectros de masas se recogieron en un intervalo de 250 a 850  $m/z$ , con un voltaje de ionización de 70V y 20V. Este procedimiento se realizó en modo positivo utilizando hidróxido de amonio el cual además de ayudar a ajustar el pH también mejora la ionización y en modo negativo.

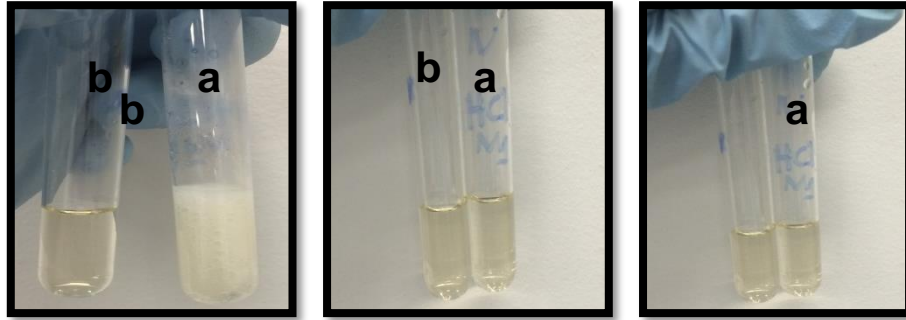
## 2.5 Resultados

A partir de la melaza residual del ingenio Carmelita S.A. se realizó la extracción de flavonoides con acetonitrilo y una mezcla de acetato de etilo: metanol 1:1. Además también se trató una muestra con una mezcla que constaba de 90% agua y 10% metanol, la cual se pasó por el equipo Isolera flash One para obtener un extracto con la menor cantidad de azúcar posible. Al extracto resultante, se le realizó la prueba de Shinoda, que consiste en la identificación de flavonoides por un cambio en la coloración. En la figura 7 se puede observar el cambio de coloración del tubo de ensayo A, con respecto al tubo de ensayo base.



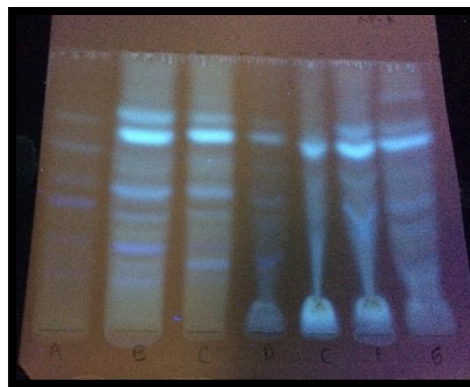
**Figura 7.** Resultado positivo de la prueba de Shinoda, para el extracto obtenido mediante el Isolera Flash-One. a) extracto con la prueba de Shinoday b) testigo.

Al observar que los extractos aún contenían cantidades considerables de agua y azúcar, se optó por utilizar la técnica de SPE con la cuál fue posible eliminar los compuestos de interferencia. A los extractos obtenidos a partir de este procedimiento también se les realizó la prueba de Shinoda para conocer la presencia o ausencia de flavonoides. Cabe resaltar que esta es una prueba netamente cualitativa (ver Figura 8).



**Figura 8.** Resultado negativo de la prueba de Shinoda, para los extractos provenientes de la muestra Isolera A, y los tratados con acetato de etilo:metanol 1:1 a los cuales se les aplico la técnica de SPE. a) extractos con la prueba de Shinoday b) testigos.

Los extractos Isolera A, A', B, C, D, E y F; se sembraron en una placa de sílica gel y se corrieron en la fase móvil nombrada anteriormente en la metodología, con el fin de identificar los posibles flavonoides presentes. En la Figura 9 se puede observar unas bandas de color verde azulado las cuales, según la literatura pueden corresponder a flavonoides luteolin-C-glicosidos.



**Figura 9.** TLC de los extractos Isolera A y extractos A',B,C,D,E,F utilizando como fase móvil una mezcla de acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua 100:11:11:26 y cómo agente derivatizante una solución al 1% de difenilboriloxietilamina seguida de una solución al 5% de polietilenglicol-4000 (PEG-4000) etanólico

Aplicando las condiciones descritas en la metodología para el análisis por HPLC, se obtuvieron los respectivos cromatogramas con los espectros UV correspondientes a cada a cada señal característica los cuales se muestran en su totalidad en anexos, mientras que los más relevantes se van describiendo durante la discusión. En cuanto a los espectros de masas, se encuentran a lo largo de la discusión.

## 2.6. Discusión

La prueba de Shinoda, es una prueba cualitativa que permite el reconocimiento de flavonoides que contienen en su estructura un núcleo benzopirona. En soluciones acuosas o alcohólicas esta prueba toma un color rojizo, indicando la presencia de flavonoides (Martínez, 2005). Como se puede observar en la Figura 7, hubo un cambio de coloración con respecto al tubo de ensayo que se tomó como testigo; esto es una buena señal debido que confirma la presencia de dichos compuestos en la muestra tratada en el equipo Isolera Flash One. Al analizar las características organolépticas de la muestra, se observó que aun contenía cantidades considerables de agua y además su olor aún era dulce, revelando que también contenía azúcar. Esto mismo sucedió con los extractos obtenidos a partir de la mezcla de acetato de etilo: metanol y por eso se tomó la decisión de someterlas a la técnica de extracción en fase sólida.

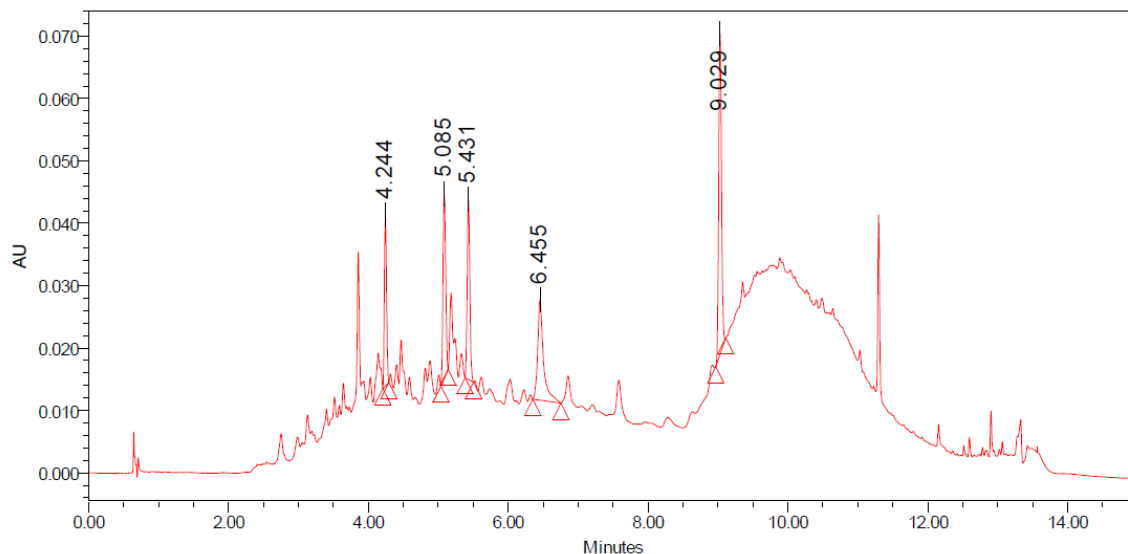
Durante la etapa de lavado, se tomó el residuo resultante al cual también se le realizó la prueba de Shinoda. En este caso el resultado arrojado fue negativo, que era lo esperado debido a que los analitos de interés es decir, los flavonoides, debían quedar retenidos en el adsorbente.

En la cromatografía planar, se sembraron los siete extractos resultantes y se corrieron en la fase móvil descrita en la metodología. Los resultados obtenidos, también fueron de gran ayuda para confirmar la presencia de flavonoides dado a que después de la derivatización, se observaron las bandas características de los derivados de luteolin-C-glicosidos y de apigenina-8-C-glucosidos. En donde los primeros cuentan con bandas de color verde azulado con alta fluorescencia, y un  $R_f$  de 0,70 y los segundos tienen bandas del mismo color pero fluorescen con menor intensidad y tienen un  $R_f$  de 0,77 (Wagner & Bladt, 2001) (ver Figura 9). Entre los derivados de luteolin-C-glicosidos se encuentra la orientina con un  $R_f$  obtenido de 0,71 y entre los derivados de apigenina-8-C-glucosidos está la vitexina con un  $R_f$  de 0,76.

En cuanto a los análisis de HPCL, se obtuvieron los cromatogramas correspondientes a cada muestra y los respectivos espectros UV de las señales más características de acuerdo al tiempo de retención. Debido a que no todos los espectros se encontraron relevantes, se organizaron en la sección de anexos.

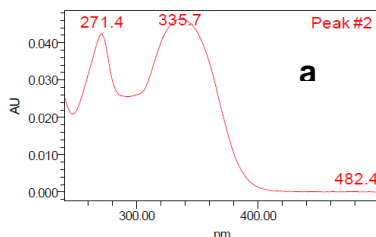
### *Flavonoides identificados en el extracto Isolera A (muestra tratada con el equipo Isolera Flas-One agua:metanol 90:10 extraídos mediante SPE)*

En los espectros UV correspondientes a las señales más características del cromatograma del extracto Isolera A, se encontraron algunas similitudes con respecto a lo reportado por la literatura en los experimentos realizados por Renata Colombo, por lo cual se pudieron realizar algunas identificaciones de flavonoides.

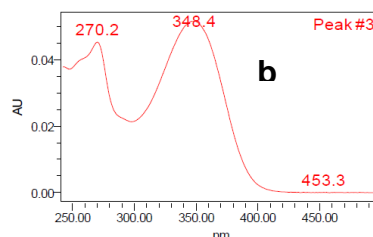


**Gráfica 1.** Cromatograma correspondiente al extracto Isolera A.

Según lo reportado en (Colombo, 2006), los flavonoides correspondientes a estos máximos de absorción, serían la vitexina a) y al 4',5'-Dimetil-luteolin-8-C-glucosido b). Es posible hacer esta aproximación, ya que según la teoría los máximos de absorción de estos son de 334nm - 270 nm y de 351nm - 270 nm respectivamente. A pesar de que los valores no son exactamente los mismos, se puede hacer esta equivalencia debido a que las condiciones de experimentación fueron diferentes (Gráfica 2).



SampleName: Isolera A Injection: 1 Name:  
Retention Time 5.085

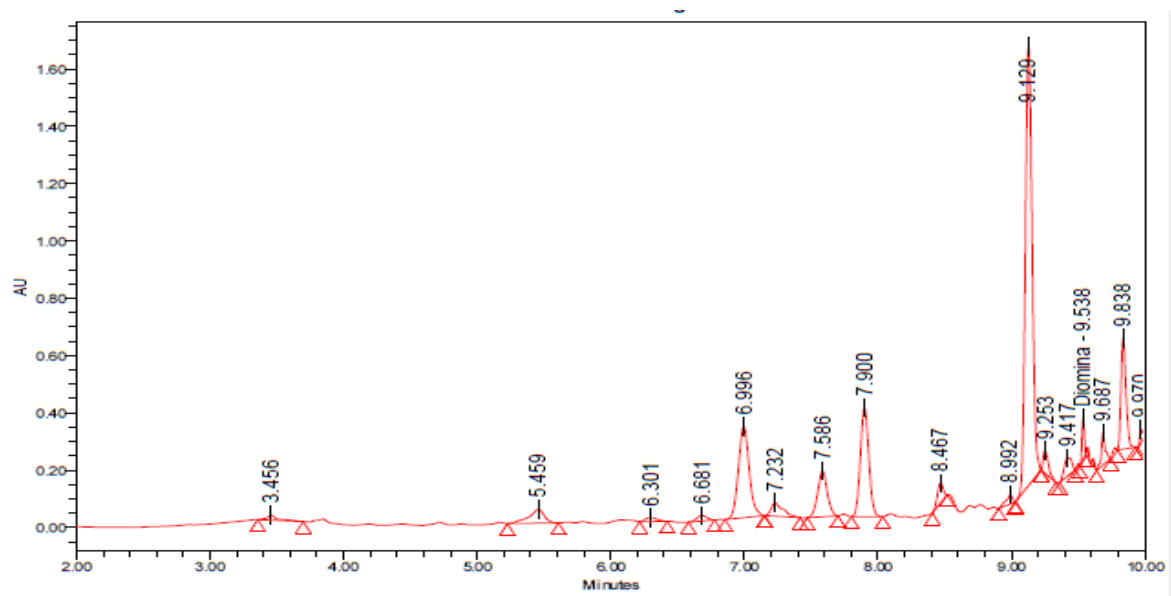


SampleName: Isolera A Injection: 1 Name:  
Retention Time 5.431

**Gráfica 2.** Flavonoides identificados en el extracto Isolera A. a) vitexina, b) 4',5'-Dimetil-luteolin-8-C-glucosido y c) Tricina-7-O-glicosido

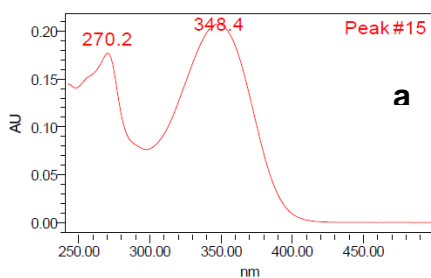
*Flavonoides identificados en el extracto B (Muestra tratada con acetato de etilo:metanol 1:1 extraídos mediante SPE pH=2,4)*

En cuanto a los espectros UV correspondientes al extracto B, también se encontraron algunas similitudes con las reportadas en la literatura que permiten la identificación de algunos de los flavonoides presentes en la muestra.

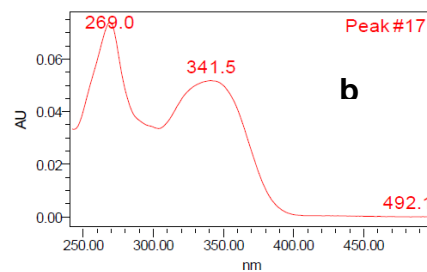


**Gráfica 3.** Cromatograma correspondiente al extracto B.

En la gráfica 4 se puede observar que los máximos de absorción corresponden con 4',5'-Dimethyl-luteolin-8-C-glucoside a) y la tricina-4\_-O-(*threo* or *erythro* guaiacylglyceril) ether- 7-O-glucopyranoside b) ya que son similares a los reportados en (Colombo, 2006) que son 351 nm – 270 nm y 340 nm -270nm.



SampleName: Juliana B Injection: 1 Name:  
Retention Time 9.687



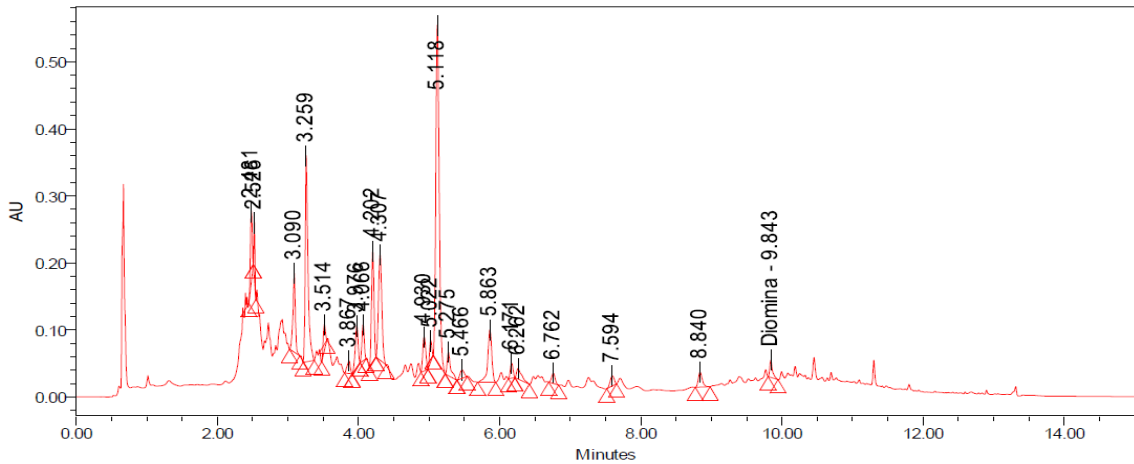
SampleName: Juliana B Injection: 1 Name:  
Retention Time 9.970

**Gráfica 4.** Flavonoides identificados en el extracto B. a) 4',5'-Dimethyl-luteolin-8-C-glucoside y b) Tricina-4\_-O-(*threo* o *erythro* guaiacilgliceril) eter- 7-O-glucopiranoside

A pesar de que en el cromatograma se apreciaron un gran número de señales, las únicas que se pudieron establecer como posibles flavonoides fueron dos, ya que los otros espectros no poseían las bandas características y además tampoco poseían un máximo de absorción similar con el cual se pudiera establecer relación.

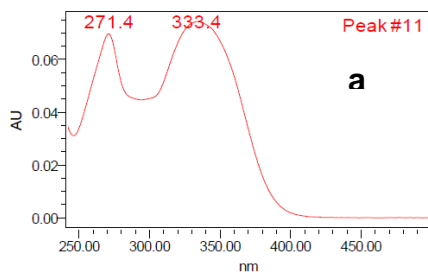
Flavonoides identificados en el extracto C (Muestra tratada con acetato de etilo:metanol 1:1 liofilizada pH=6,2)

En el extracto C, fue posible establecer una relación con respecto a lo reportado en la literatura, dado a que los máximos de absorción reportados se asemejaban en gran medida con los obtenidos experimentalmente.

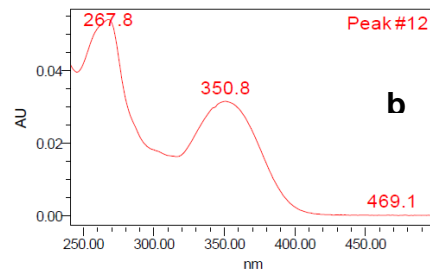


**Gráfica 5.** Cromatograma correspondiente al extracto C.

Los máximos reportados correspondientes a la vitexina y al 4',5'-Dimetil-luteolin-8-C-glucosido, son 334 nm -270 nm y 351nm -270 nm respectivamente.



SampleName: Juliana C Injection: 1 Name:  
Retention Time 4.930



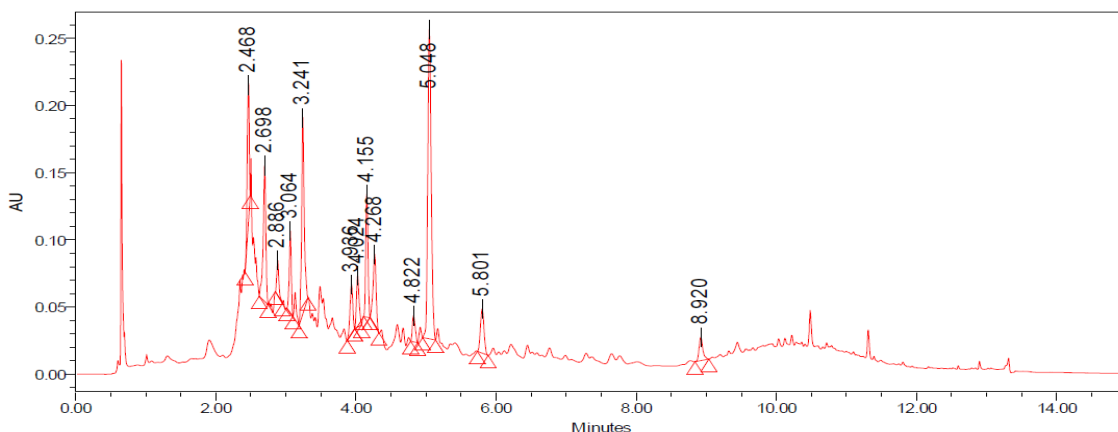
SampleName: Juliana C Injection: 1 Name:  
Retention Time 5.022

**Gráfica 6.** Flavonoides identificados en el Extracto C. a) Vitexina y b) 4',5'-Dimetil-luteolin-8-C-glucosido

Flavonoides identificados en el extracto D (Muestra tratada con acetato de etilo:metanol 1:1 liofilizada pH=2,4)

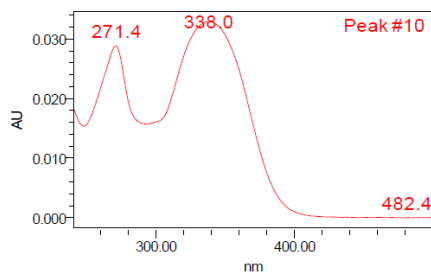
En el extracto D, sólo fue posible establecer una relación respecto a la literatura, ya que las otras bandas no tenían mucha similitud a las reportadas.





**Gráfica 7.** Cromatograma correspondiente al extracto D.

El flavonoide que se pudo identificar fue la Tricina-4\_-O-(*threo* o *eritro* guaiacilgliceril) eter- 7-O-glucopiranoside (ver gráfica 8), el cual tiene máximos de absorción ya reportados de 340nm y 270 nm.

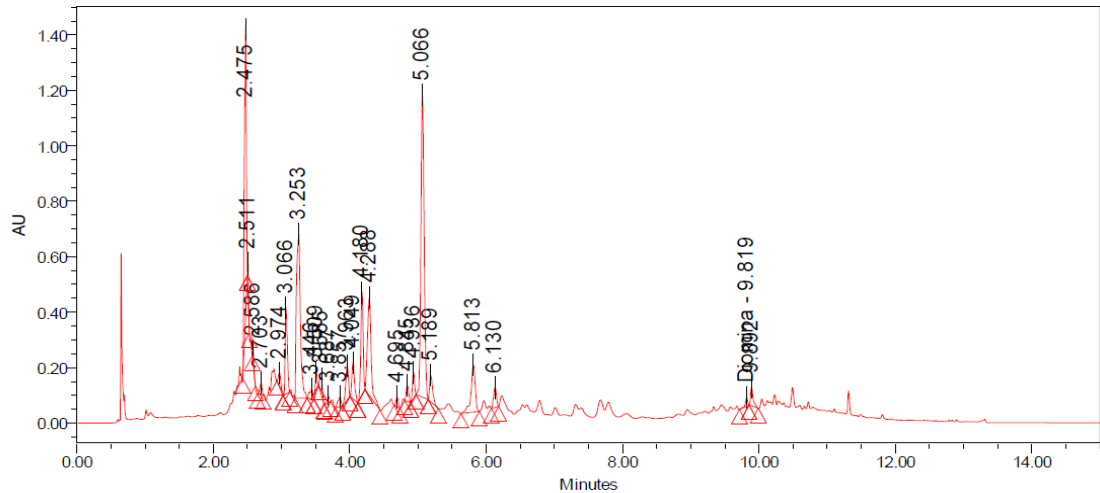


SampleName: Juliana D Injection: 1 Name:  
Retention Time 4.822

**Gráfica 8.** Flavonoide identificado en el extracto D. Tricin-4\_-O-(*threo* or *erythro* guaiacylglyceril) ether- 7-O-glucopyranoside.

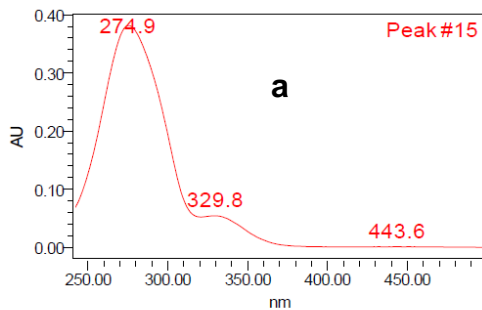
*Flavonoides identificados en el extracto E (Muestra tratada con acetonitrilo liofilizada pH=6,2)*

Por otra parte, en el extracto E fue posible identificar la presencia de Schaftosido/isochaftosido, Tricina-4\_-O-(*threo* o *eritro* guaiacilgliceril) eter- 7-O-glucopiranoside, 4',5'-Dimetil-luteolin-8-C-glucosido y Tricin-7-O-neohesperidoside.

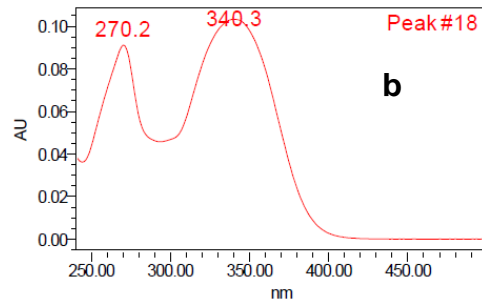


**Gráfica 9.** Cromatograma correspondiente al extracto E.

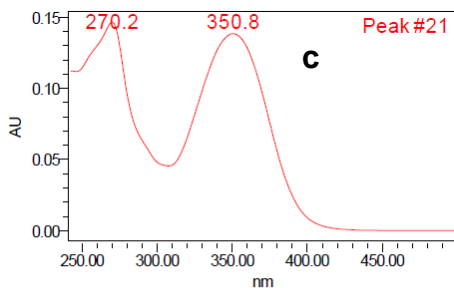
Fue posible identificar estos cuatro flavonoides gracias a que en estudios anteriores, han establecido los máximos de absorción de estos compuestos que corresponden a 330 - 369 nm, 340 - 270 nm, 351 - 270 nm; y a 351 - 265nm respectivamente.



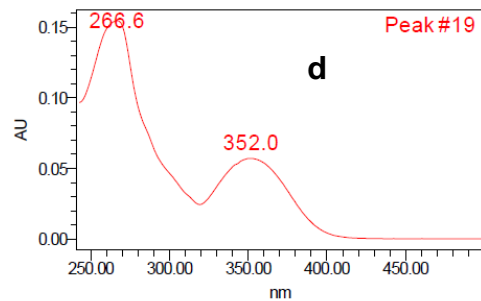
SampleName: Juliana E Injection: 1 Name:  
Retention Time 4.180



SampleName: Juliana E Injection: 1 Name:  
Retention Time 4.845



SampleName: Juliana E Injection: 1 Name:  
Retention Time 5.189

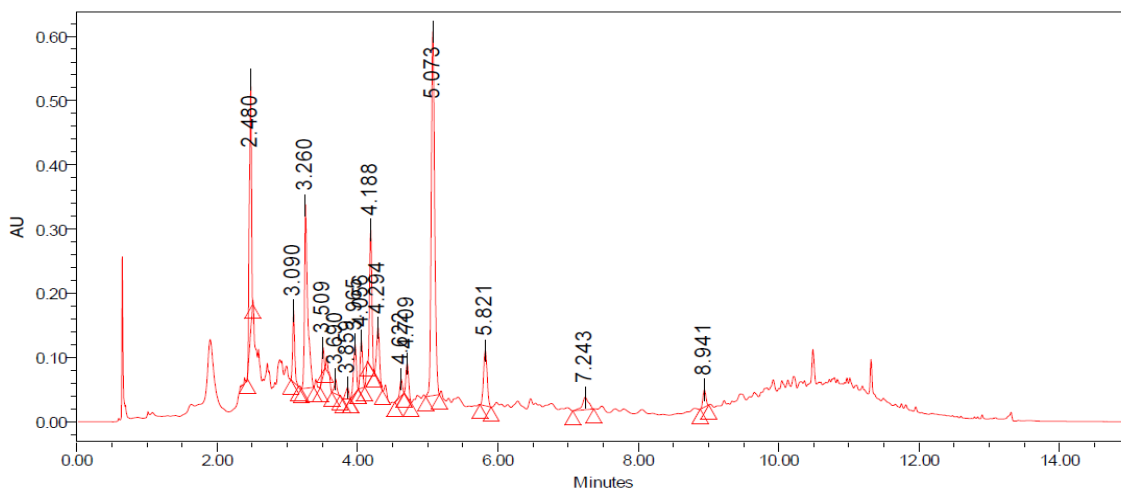


SampleName: Juliana E Injection: 1 Name:  
Retention Time 4.936

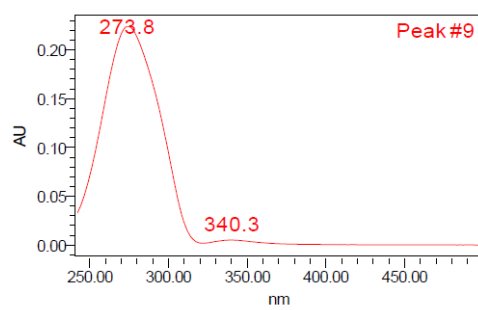
**Gráfica 10.** Flavonoides identificados en el extracto E. a) Schaftosido/isochaftosido, b) Tricina-4\_*-O-(treo o eritro* guaiacilgliceril) eter- 7-O-glucopiranoside, c) 4',5'-Dimetil-luteolin-8-C-glucosido y d) Tricina-7-O-neohesperidoside

Flavonoides identificados en el extracto F (Muestra tratada con acetonitrilo liofilizada pH=2,4)

Por último en el Extracto F, fue posible identificar a la Tricina-4\_-O-(*treo* o *eritro* guaiacilgliceril) eter- 7-O-glucopiranoside correspondiente a máximos de absorción reportados de 340 nm – 370 nm.



**Gráfica 11.** Cromatograma correspondiente al extracto F.



SampleName: Juliana F Injection: 1 Name:  
Retention Time 4.188

**Gráfica 12.** Flavonoide identificado en el extracto F. Tricina-4\_-O-(*treo* o *eritro* guaiacilgliceril) eter- 7-O-glucopiranoside.

Como se puede observar, no se pudo identificar la misma cantidad de flavonoides en cada una de las muestras, debido a que las condiciones de extracción fueron diferentes. A pesar de esto, sí se encontraron flavonoides en común entre ellas. Por ejemplo el 4',5'-Dimetil-luteolin-8-C-glucosido y la Tricina-4\_-O-(*treo* o *eritro* guaiacilgliceril) eter- 7-O-glucopiranoside se encontraron en 4 de las siete muestras estudiadas, lo que puede ser un indicador de que estos compuestos se encuentran en mayor concentración y que además, son menos susceptibles a los cambios de condiciones. Otro flavonoide identificado fue la vitexina, que aunque no se encontró en la mayoría de muestras, si se logró identificar al menos en dos de ellas. Mientras que algunos derivados de la tricina como la Tricina-7-O-

neohesperidoside se encuentran en menor concentración, al igual que el Schaftosido/isochaftosido.

Además de establecer la relación por medio de los máximos de absorción, también hay que tener en cuenta el tiempo de retención, el cual debe ser similar en los diferentes espectros. Es decir, en el caso del 4',5'-Dimetil-luteolin-8-C-glucosido el tiempo de retención se encuentra entre 5 y 5,5 min en todos los espectros en los cuales se identificó, a excepción del extracto B en el cual se encontró 9,687 min. Esto puede poner en duda que este espectro corresponda a dicho compuesto a pesar que los máximos de absorción sean muy similares a los reportados. Esto mismo sucedió con la tricina-4\_-O-(*treo* o *eritro* guaiacilgliceril) eter- 7-O-glucopiranoside, que se encontró en 3 espectros con un tiempo de retención entre 4,1 – 4,9 min pero en el extracto Juliana B el tiempo de retención fue de 9,970 min.

Por cada cromatograma, se obtuvo aproximadamente entre 5 y 25 espectros UV y de estos, solo se pudo identificar máximo 4 flavonoides por muestra. Esto no quiere decir que no exista la presencia de más flavonoides en ellas, si no que tal vez aún no han sido estudiados o reportados en la literatura. Por ejemplo, en los extractos B, C, D, E y F se encontró una banda con un máximo de absorción de 322,6 nm en un tiempo de retención de aproximadamente 5,8 minutos. Aunque este espectro solo cuenta con una banda, podría corresponder a un flavonoide que contenga una sustitución, una conjugación en el anillo C o un estado de glicosilación que haga que las características espectrales cambien. Al igual que este, en los extractos C, D, E y F también se observó una banda con un máximo de absorción en 284,5 y con un tiempo de retención de aproximado de 4,30 min, el cual también podría corresponder a un flavonoide que aún no se encuentre reportado. La posibilidad de que este último corresponda a un flavonoide es alta ya que en los extractos obtenidos de la torre de decoloración del Ingenio Manuelita, también se observó este mismo máximo de absorbancia.

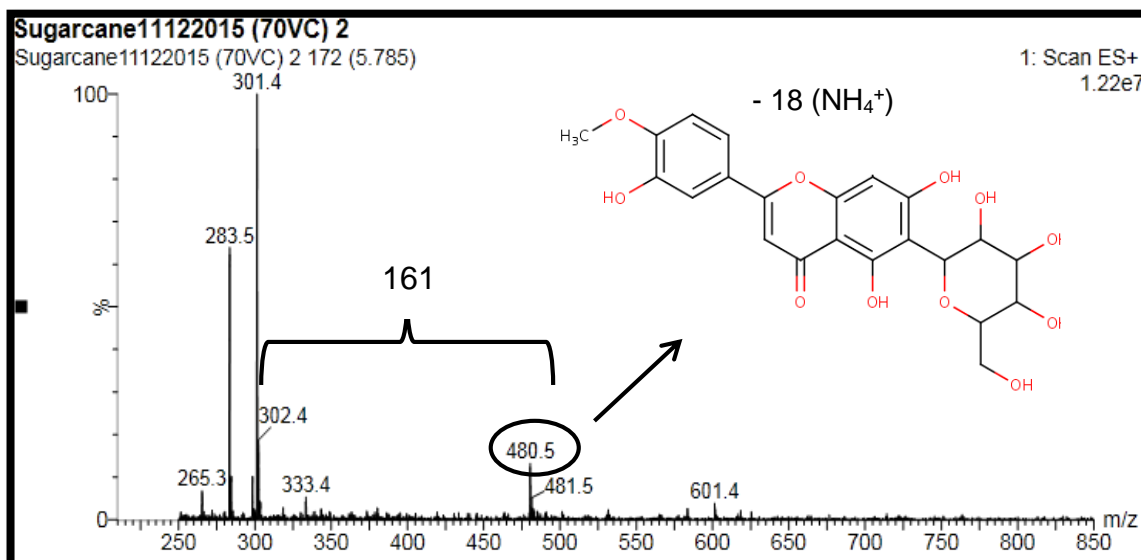
Entre las actividades farmacológicas que se le han asociado a los flavonoides, la vitexina, uno de los flavonoides identificados anteriormente cuenta con capacidad antiinflamatoria siendo capaz de reducir la migración de neutrófilos al foco inflamatorio por vía de mediadores pro-inflamatorios a través de inhibición de los factores de transcripción p-p38 (Rosa, Rios, Bagolun, & Martins, 2016). En cuanto a la tricina, se le han asociado propiedades como agente quimiopreventivo en el cáncer, debido a que se ha encontrado que puede interferir de forma potente con el crecimiento de células mamarias humanas y células de cáncer de colon in vitro (Hudson, Dinh, Kokubon, Simmonds, & Gescher, 2000). Se puede decir que en general los flavonoides C-glicósidos se han asociado con actividades antitumorales.

### Flavonoides identificados empleando la técnica de espectrometría de masas

Con el fin de obtener información estructural más detallada y de conocer los pesos moleculares de algunos flavonoides presentes en un extracto de licor de las torres de decoloración del Ingenio Manuelita, se llevó a cabo la técnica de APCI (ionización química a presión atmosférica) -LC-MS. Esta es una técnica de ionización suave, que permite la obtención de los iones moleculares  $[M + H]^+$ , lo que es de mucha importancia para la información estructural.

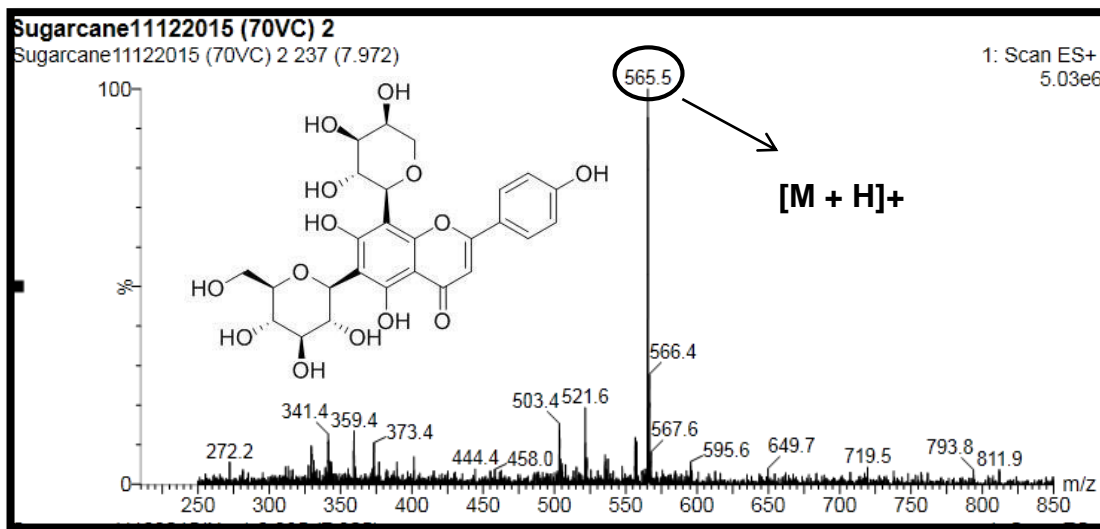
De los espectros obtenidos, fue posible identificar con certeza 3 flavonoides glicosilados, los cuales se analizaron en modo positivo y negativo. Al pico base que aparece en los espectros realizados en modo positivo se les restó el peso del ion  $NH_4^+$  que es 18 g/mol, ya que estos fueron tratados con hidróxido de amonio con el fin de ajustar pH y de mejorar los parámetros de ionización.

Uno de los flavonoides encontrados, fue la diosmetina-8-C-glucosido, el cual fue posible identificar gracias a que en el espectro se observó la presencia de un ion molecular  $[M + H]^+$  de 480,5 m/z que restándole los 18 u correspondientes al ion de amonio queda en 462,5 que es el peso de dicho compuesto. También se observó un pico base de 301,4 m/z el cual fue asignado al peso de la aglicona  $[M + H - 161]$ , la pérdida del 161 puede pertenecer a un azúcar, que según la literatura podría corresponder a un resto de hexosa (Gráfica13) (Colombo, 2006). En cuando al espectro en modo negativo solo se observó la presencia del ion molecular es decir del glucósido más no de la aglicona (anexo 12).



**Gráfica 13.** Espectro de masas correspondiente a la Diosmetina-8-C-glucosido en modo positivo

Otro flavonoide que fue posible identificar en los espectros de masas, fue el schaftosido-C-glicosido con un  $[M + H]^+$  de 565.5 m/z, esta molécula no fue sensible al hidróxido de amonio por lo que el valor del ion molecular que aparece en el espectro no cambia y además gracias a esto, tampoco fue posible identificar otras señales relevantes que mostraran la fragmentación del flavonoide. Pero a pesar de esto, gracias al espectro UV obtenido (Gráfica 15) y los datos que ya se han reportado en algunos estudios, se pudo confirmar que si correspondía a este compuesto.



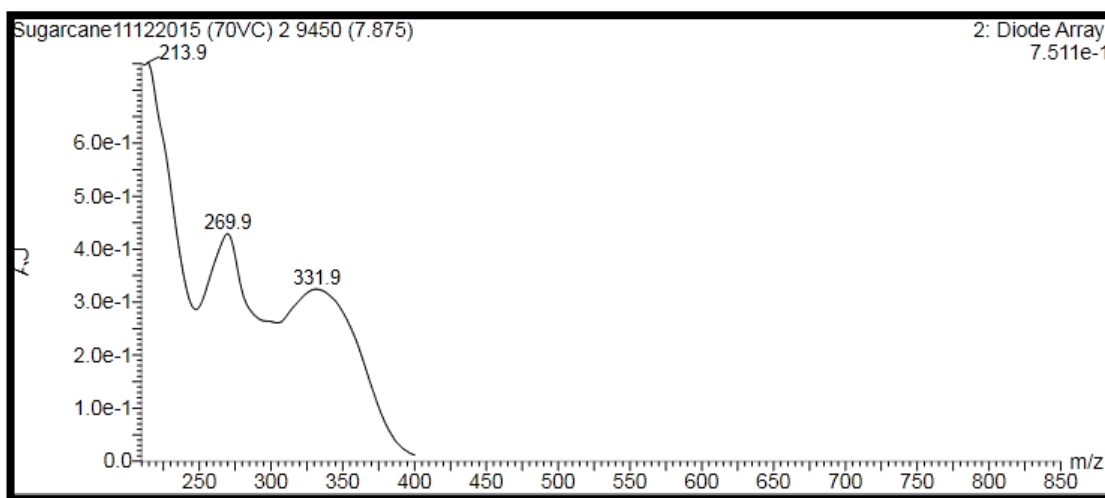
**Gráfica 14.** Espectro de masas correspondiente al schaftosido-C-glicósido en modo positivo.

**Tabla 6.** HPLC-MS fragmentos de los flavonoides encontrados en especie *Saccharum Officinarum*.

Table 2 HPLC-MS data of the flavonoids from <i>Saccharum officinarum</i>		
Compound	$[M + H]^+$	CID-MS fragment ions (% relative intensity)
1	639	493 (31), 331 (100)
2	595	431 (91), 413 (40), 395 (29), 383 (100), 353 (51), 329 (35), 299 (15)
3	433	415 (100), 397 (45), 379 (21), 367 (81), 337 (44), 313 (26), 283 (4)
4	449	431 (100), 413 (34), 395 (10), 383 (29), 353 (11), 329 (15), 299 (3)
5	493	331 (62)
6	565	547 (45), 475 (81), 445 (100), 355 (45), 271 (3)
7	565	547 (21), 475 (100), 445 (45), 355 (28), 271 (5)
8	477	459 (100), 441 (28), 423 (24), 411 (70), 381 (43), 357 (14), 327 (6), 315 (3)

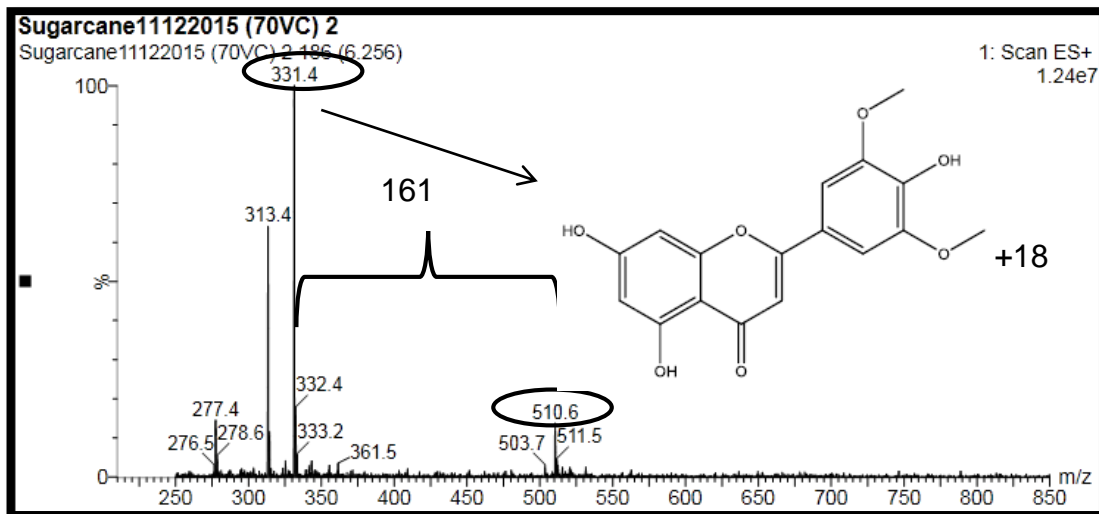
Esta tabla es la que se encuentra en el estudio realizado por (Colombo, 2006), en donde se muestran los iones moleculares de diferentes flavonoides con las otras señales que se encuentran en abundancia. En este caso el de nuestro interés es el compuesto número 6, el cual corresponde la Schaftoside, como se puede observar el ion molecular representado allí corresponde con el que se obtuvo experimentalmente.

Además en el espectro UV se pueden observar las bandas características de dicho flavonoide ya que los máximos de absorción corresponden con los ya reportados que se pueden observar en la Tabla 3.



**Gráfica 15.** Espectro UV correspondiente al Schaftoside-C-glucósido.

Por último, el otro flavonoide que se encontró corresponde a la tricina-8-C-glucosido con un ion molecular de 510.6 m/z y la diferencia de masa de este ion molecular con el ion de amonio es de 492.6 m/z que corresponde al peso neto del flavonoide glicosilado. En el cromatograma también se observa una señal abundante la cual corresponde a la aglicona 331.4 m/z, que al igual que la Diosmetina-8-C-glucosido pierde un resto de hexosa correspondiente a 161 m/z.



**Gráfica 15.** Espectro de masas correspondiente a tricina-8-C-glucósido en modo positivo.

En general, en los espectros que se realizaron en modo negativo solo fue posible identificar la señal correspondiente al ion molecular. Estos espectros se muestran en anexos.



### 3. CONCLUSIONES

- Los métodos de extracción utilizados para el tratamiento de la melaza residual fueron exitosos, ya que fue posible la identificación de seis flavonoides utilizando técnicas cromatografías y espectroscópicas.
- El método de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, fue eficaz para la caracterización de Schaftoside-C-glucósido, Diosmetina-8-C-glucósido y tricina-8-C-glucósido.
- Algunos de los flavonoides identificados y caracterizados ya se han asociado con algún tipo de actividad farmacológica, ya sea como antiinflamatorios o antitumorales.

#### **4. RECOMENDACIONES**

- En el proceso de extracción, se recomienda utilizar la técnica de extracción en fase sólida desde el inicio, ya que con esta es posible eliminar todos los compuestos de interferencia sin necesidad de utilizar grandes cantidades de solvente.
- Se recomienda que en futuros estudios, además de identificar y caracterizar los flavonoides presentes en la melaza, también se realice una búsqueda exhaustiva de las propiedades farmacológicas de los flavonoides encontrados en esta, relacionándolos con su estructura química.

## 5. REFERENCIAS

- Arbelaéz, M. A., Estacio, A., & Olivera, M. (2010). Impacto socioeconómico del sector azucarero colombiano en la economía nacional y regional. *Fedesarrollo*, 3 - 4.
- Asocaña. (2009). *Impacto socioeconómico del sector azucarero colombiano en la economía nacional y regional* . Fededesarrollo.
- Asocaña. (2012). *El sector azucarero Colombiano en la actualidad*. Recuperado el 12 de 11 de 2015, de asocana.org:  
<http://www.asocana.org/publico/info.aspx?Cid=215>
- Asocaña, s. a. (2009). *El sector azucarero en la actualidad*. Recuperado el 25 de 10 de 2015, de [www.asocana.org](http://www.asocana.org)
- Bruice, P. Y. (2008). *Química orgánica, quinta edición*. Santa Barbara: Pearson.
- ChEBI. (2015). *tricin 7-O-glucoside*. Recuperado el 11 de 11 de 15, de <https://www.ebi.ac.uk/chebi/chebiOntology.do?chebuid=CHEBI:75349>
- Colombo, R. (2006). On-line Identification of Further Flavone C- and O-Glycosides from Sugarcane (*Saccharum officinarum* L., Gramineae) by HPLC-UV-MS. *Phytochemical Analysis - InterScience*, 340.
- Colombo, R., Yariwake, J., & McCullagh, M. (2008). Study of C- and O-glycosylflavones in sugarcane extracts using liquid chromatography - exact mass measurement mass spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*.
- Colombo, R., Yariwake, J., Queiroz, E., Ndjoko, K., & Hostettmann, K. (2005). On-line identification of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) methoxyflavones by liquid chromatography–UV detection using post-column derivatization and liquid chromatography–mass spectrometry. *Elsevier. Journal of Chromatography*, 52 - 59.
- Crespo, S. J. (1997). *Niveles de proteína para cerdos de crecimiento y engorde alimentados con jugo de caña de azúcar*. Honduras: Zamorano, escuela agrícola panamericana departamento de zootecnia .
- Cromlab S.L. (2014). *Cromlab*. Recuperado el 02 de 05 de 2016, de [http://www.cromlab.es/EFS\\_Principal.htm](http://www.cromlab.es/EFS_Principal.htm)
- Díaz Montejo, L. L., & Protocarrero Rivera , E. T. (2002). *Manual de producción de caña de azúcar (Saccharum officinarum)*. Honduras.

- Escamilla Jimenéz, C. I., Cuevas Martínez, E. Y., & Guevara Fonseca, J. (2009). *Flavonoides y sus acciones antioxidantes*. medigraphic Artemisa.
- Fajardo Castillo, E. E., & Sarmiento Forero, S. C. (2007). *Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de Saccharomyces cerevisiae*. Bogotá.
- Gómez, O. G. (2005). *Caña de azúcar en Colombia*. Asocaña.
- Guzmán, L. P. (2011). *SCAI - Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación*. Recuperado el 13 de 06 de 2016, de Unidad de espectrometría de masas: <http://www.scai.uma.es/servicios/aqcm/ems/ems.html>
- Hudson, E., Dinh, P., Kokubon, T., Simmonds, M., & Gescher, A. (2000). Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers*, 1163–1170.
- Larrahondo, J. (1995). *Calidad de la caña de azúcar*. Calo: CENICAÑA.
- Luengo, T. L. (2002). *Flavonoides*. OFFARM.
- Martínez Flórez, G., Gónzales Gallego, Culbras, & Tuñón. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*, 271-276.
- Martínez, A. (2005). *Flavonoides*. Medellín.
- Procaña (Asociación Colombiana de productores y proveedores de caña de azúcar). (s.f.). *Procana.org*. Recuperado el 05 de 11 de 2015, de <http://www.procana.org/new/quienes-somos/subproductos-y-derivados-de-la-ca%C3%B1a.html>
- Rieger, D., & Pfeiffer, J. (2003). Cromatografía en Fase Reversa: El gel de sílice es lo más importante. *Noticias técnicas de laboratorio*, 1-2.
- Rijke, E. d., Out, P., & Niessen, W. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *ELSEVIER - Journal of chromatography*, 31 - 63.
- Rodríguez, J. S. (2008). *Preparación de la muestra*. Análisis Instrumental y Sensorial de Alimentos.
- Rosa, S., Rios, S., Bagolun, & Martins. (2016). Vitexin reduces neutrophil migration to inflammatory focus by down-regulating pro-inflammatory mediators via inhibition of p38, ERK1/2 and JNK pathway. *Elsevier GmbH*, 9 - 17.
- Sigma-Aldrich Co. (2015). *SIGMA - ALDRICH*. Recuperado el 11 de 11 de 2015, de <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=tricin&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=en&region=CO&focus=product>

- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2001). Espectrometría de masas atómica. En *Principios de análisis instrumentales* (págs. 269-278). Madrid: McGRAW-HILL.
- Trease, & Evans. (2009). *Pharmacognosy 16th edition*. SAUNDERS ELSEVIER.
- Ugaz, O. L. (1997). *Colorantes Naturales*. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú.
- Universidad Politécnica de Valencia. (2006). *Familia Gramineas*. Recuperado el 03 de 11 de 2015
- Universidad politécnica de Valencia. (2013). *UPV*. Recuperado el 23 de 10 de 2015, de <https://www.upv.es/noticias-upv/noticia-5777-azucar-de-cana-es.html>
- Wagner, H., & Bladt, S. (2001). *Plant Drug Analysis - segunda edición*. Berlín: Springer.

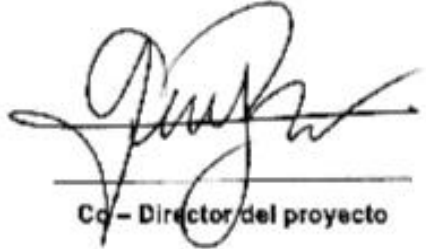
## 8. ANEXOS

Aprobado por:

\_\_\_\_\_  
Evaluador

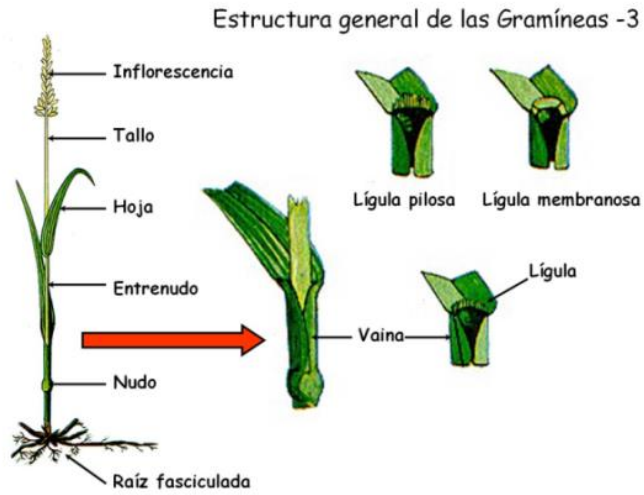
  
Evaluador

  
Director del proyecto

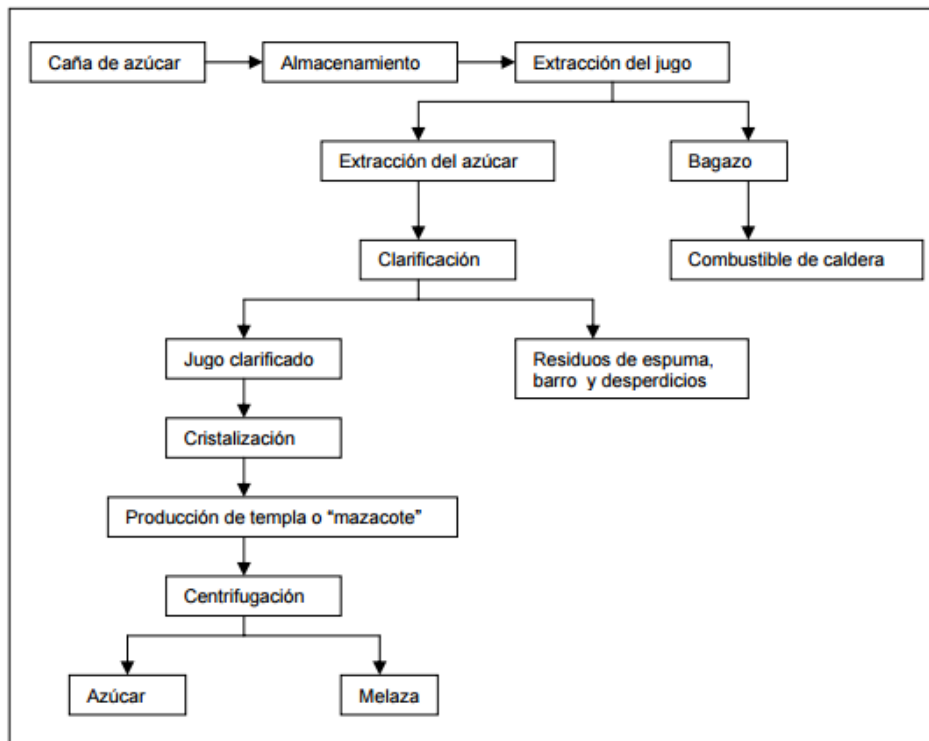
  
Co - Director del proyecto

Fecha de entrega: 03 - Jun-2016 de la ciudad de Cali

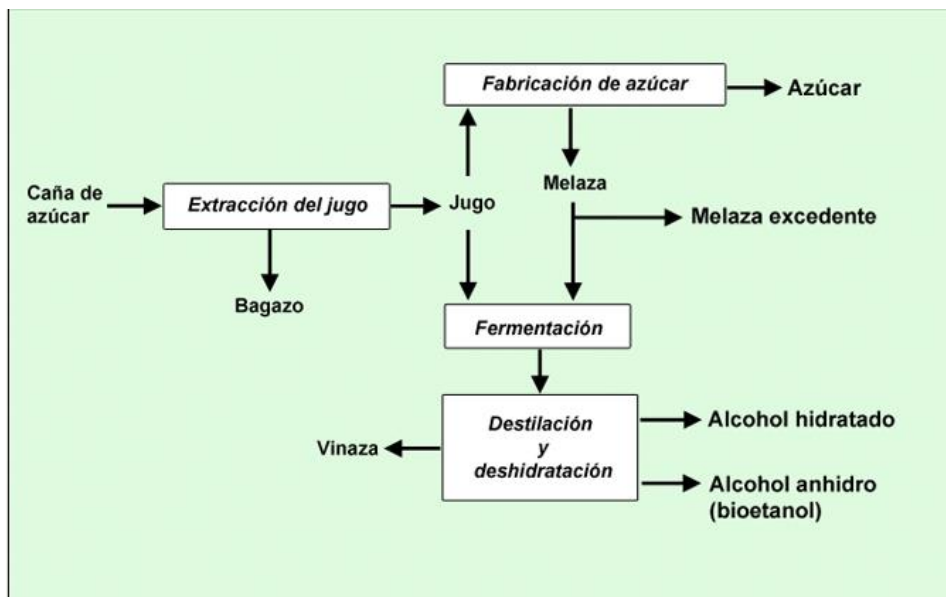
**Anexo 1.** Estructura general de las Gramíneas (Universidad Politécnica de Valencia, 2006)



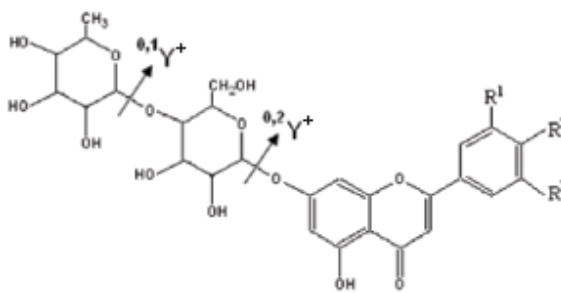
**Anexo 2.** Proceso de obtención de la melaza (Fajardo Castillo & Sarmiento Forero, 2007)



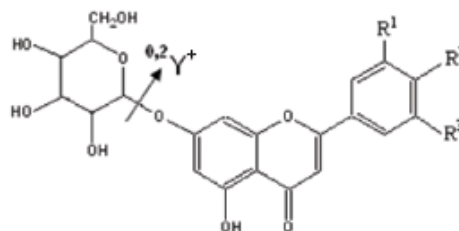
**Anexo 3.** Obtención del bioetanol a partir de la melaza. En esta imagen también se muestran de donde provienen el bagazo y la vinaza.



**Anexo 4.** Fragmentación de la disomina R1 = OH ; R2= OCH3; R3 = H (Colombo, Yariwake, & McCullagh, 2008).

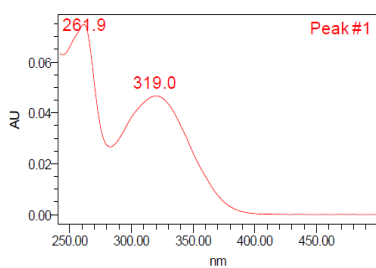


**Anexo 5.** Fragmentación de la tricín-7-glucosido R1 = OCH3 ; R2= OH; R3 = OCH3 (Colombo, Yariwake, & McCullagh, 2008).

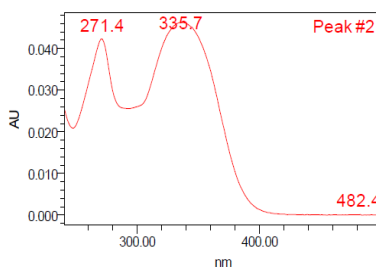




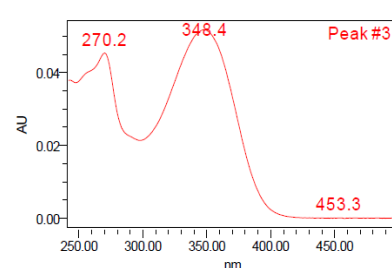
## Anexo 6. Espectros UV correspondientes al cromatograma del extracto Isolera A.



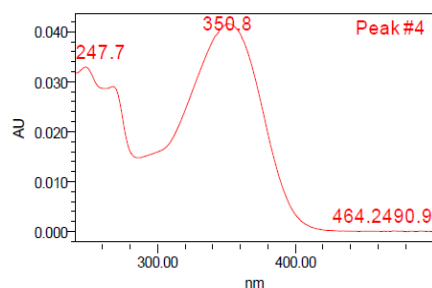
SampleName: Isolera A Injection: 1 Name:  
Retention Time 4.244



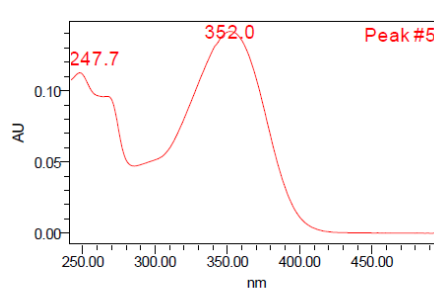
SampleName: Isolera A Injection: 1 Name:  
Retention Time 5.085



SampleName: Isolera A Injection: 1 Name:  
Retention Time 5.431

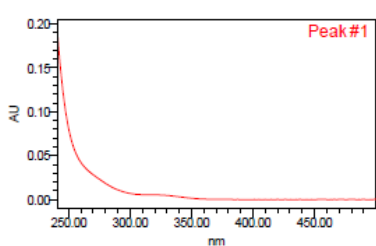


SampleName: Isolera A Injection: 1 Name:  
Retention Time 6.455

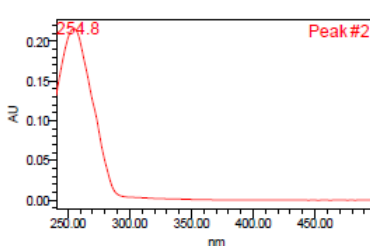


SampleName: Isolera A Injection: 1 Name:  
Retention Time 9.029

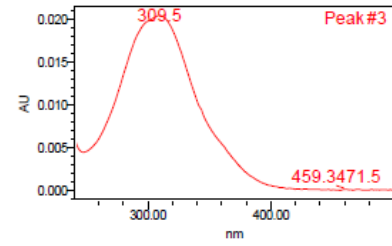
## Anexo 7. Espectros UV correspondientes al cromatograma del extracto B.



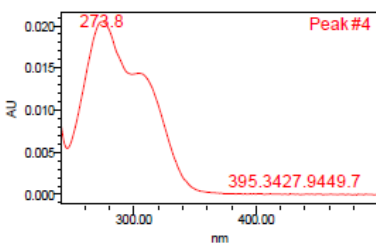
SampleName: Juliana B Injection: 1 Name:  
Retention Time 3.456



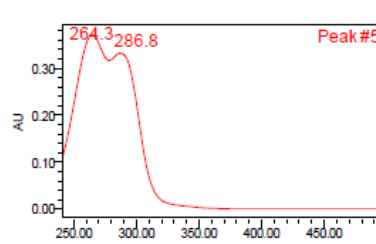
SampleName: Juliana B Injection: 1 Name:  
Retention Time 5.459



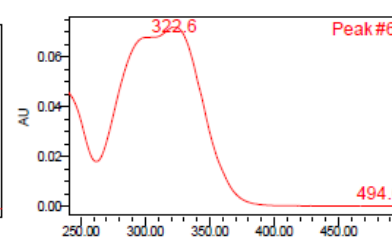
SampleName: Juliana B Injection: 1 Name:  
Retention Time 6.301



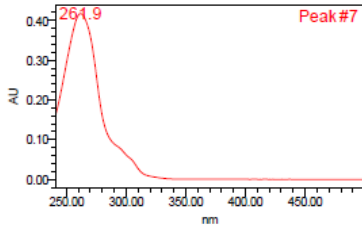
SampleName: Juliana B Injection: 1 Name:  
Retention Time 6.681



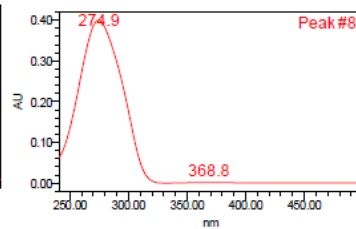
SampleName: Juliana B Injection: 1 Name:  
Retention Time 6.996



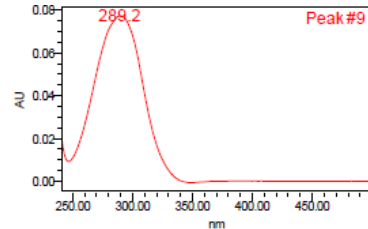
SampleName: Juliana B Injection: 1 Name:  
Retention Time 7.232



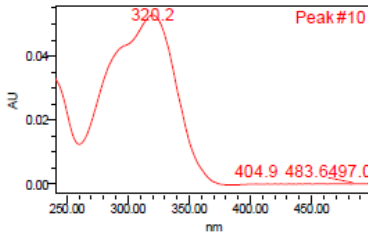
SampleName: Juliana B Injection: 1 Name:  
Retention Time 7.586



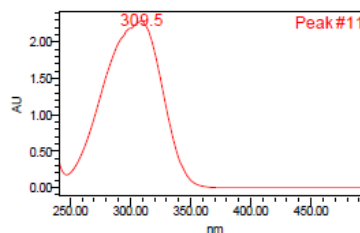
SampleName: Juliana B Injection: 1 Name:  
Retention Time 7.900



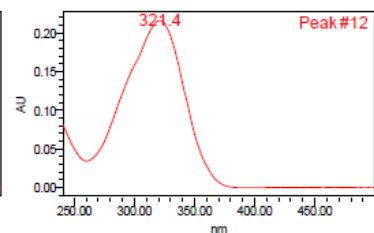
SampleName: Juliana B Injection: 1 Name:  
Retention Time 8.467



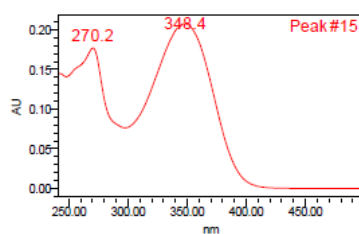
SampleName: Juliana B Injection: 1 Name:  
Retention Time 8.992



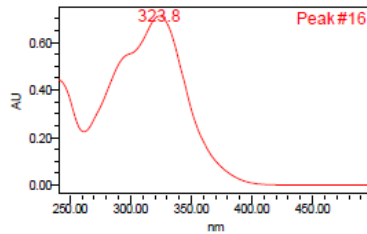
SampleName: Juliana B Injection: 1 Name:  
Retention Time 9.129



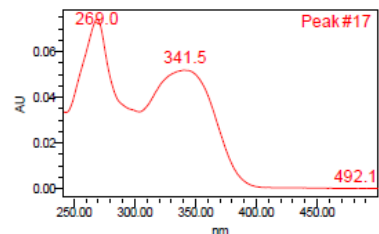
SampleName: Juliana B Injection: 1 Name:  
Retention Time 9.253



SampleName: Juliana B Injection: 1 Name:  
Retention Time 9.687

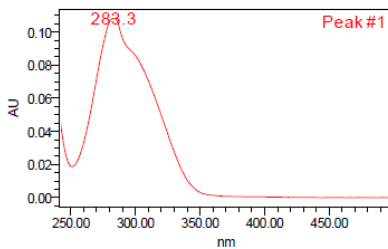


SampleName: Juliana B Injection: 1 Name:  
Retention Time 9.838

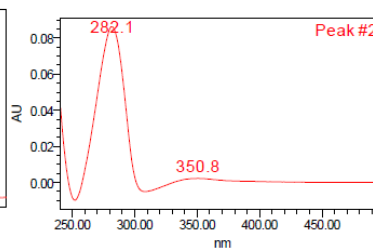


SampleName: Juliana B Injection: 1 Name:  
Retention Time 9.970

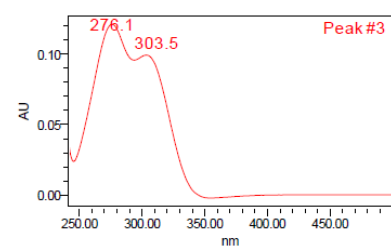
### Anexo 8. Espectros UV correspondientes al cromatograma del extracto C.



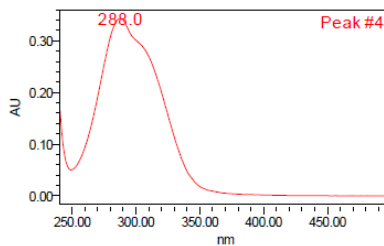
SampleName: Juliana C Injection: 1 Name:  
Retention Time 2.481



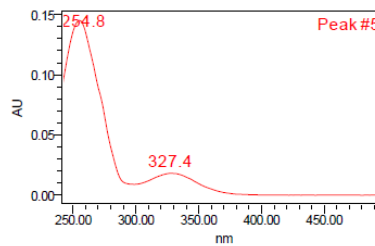
SampleName: Juliana C Injection: 1 Name:  
Retention Time 2.526



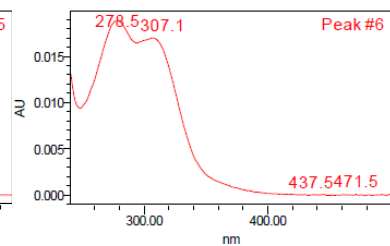
SampleName: Juliana C Injection: 1 Name:  
Retention Time 3.090



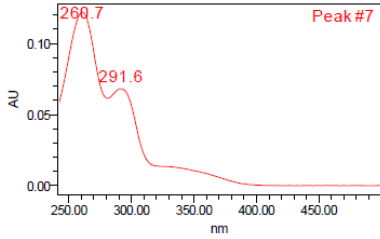
SampleName: Juliana C Injection: 1 Name:  
Retention Time 3.259



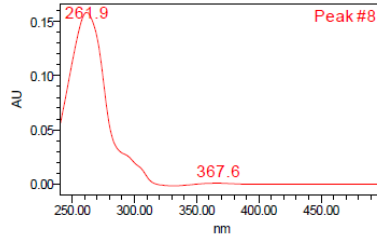
SampleName: Juliana C Injection: 1 Name:  
Retention Time 3.514



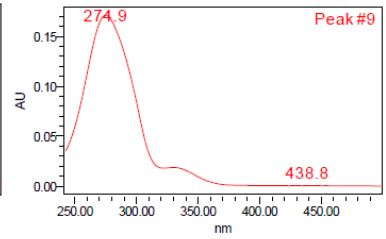
SampleName: Juliana C Injection: 1 Name:  
Retention Time 3.867



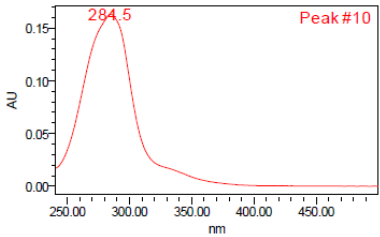
SampleName: Juliana C Injection: 1 Name:  
Retention Time 3.976



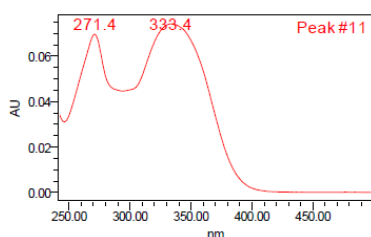
SampleName: Juliana C Injection: 1 Name:  
Retention Time 4.066



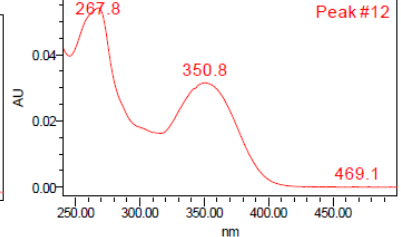
SampleName: Juliana C Injection: 1 Name:  
Retention Time 4.202



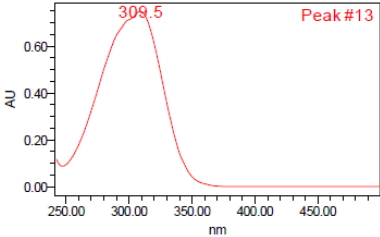
SampleName: Juliana C Injection: 1 Name:  
Retention Time 4.307



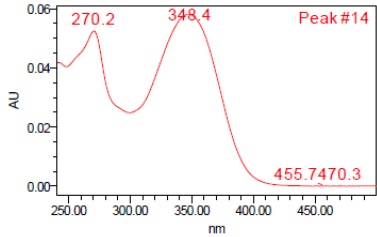
SampleName: Juliana C Injection: 1 Name:  
Retention Time 4.930



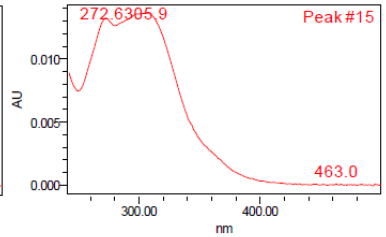
SampleName: Juliana C Injection: 1 Name:  
Retention Time 5.022



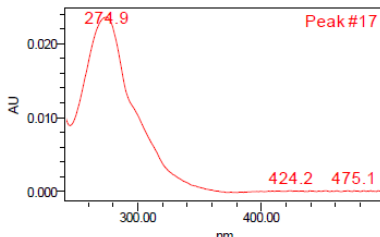
SampleName: Juliana C Injection: 1 Name:  
Retention Time 5.118



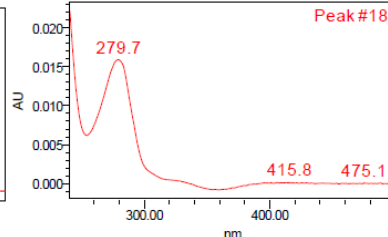
SampleName: Juliana C Injection: 1 Name:  
Retention Time 5.275



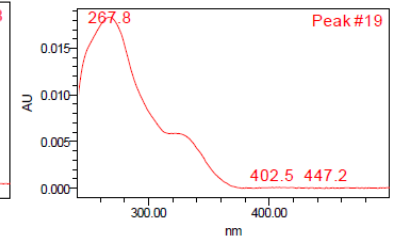
SampleName: Juliana C Injection: 1 Name:  
Retention Time 5.466



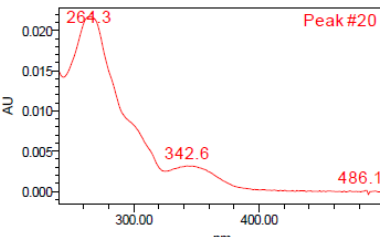
SampleName: Juliana C Injection: 1 Name:  
Retention Time 6.171



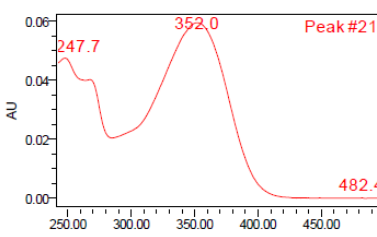
SampleName: Juliana C Injection: 1 Name:  
Retention Time 6.262



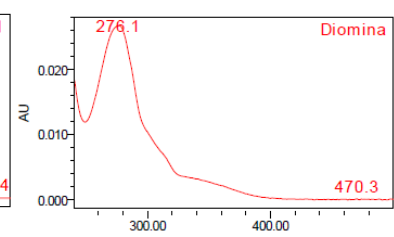
SampleName: Juliana C Injection: 1 Name:  
Retention Time 6.762



SampleName: Juliana C Injection: 1 Name:  
Retention Time 7.594

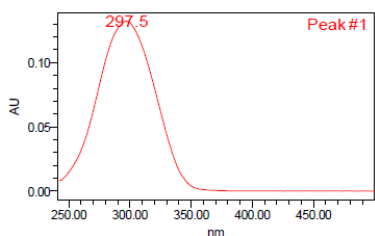


SampleName: Juliana C Injection: 1 Name:  
Retention Time 8.840

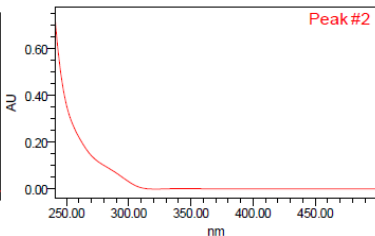


SampleName: Juliana C Injection: 1 Name:  
Diomina Retention Time 9.843

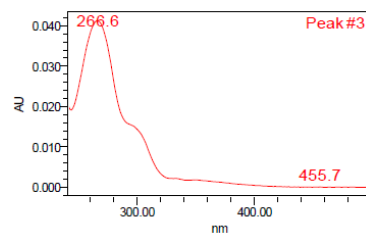
## Anexo 9. Espectros UV correspondientes al cromatograma del extracto D.



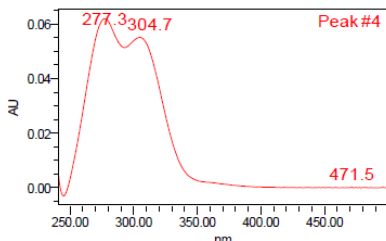
SampleName: Juliana D Injection: 1 Name:  
Retention Time 2.468



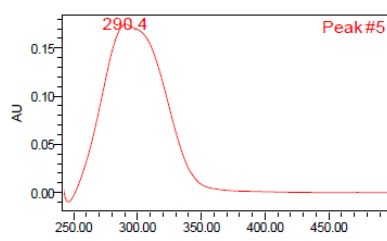
SampleName: Juliana D Injection: 1 Name:  
Retention Time 2.698



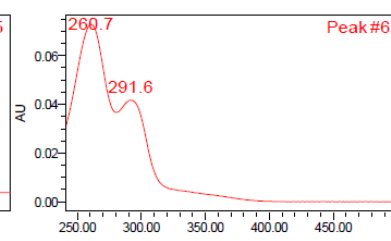
SampleName: Juliana D Injection: 1 Name:  
Retention Time 2.886



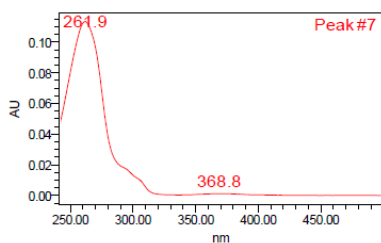
SampleName: Juliana D Injection: 1 Name:  
Retention Time 3.064



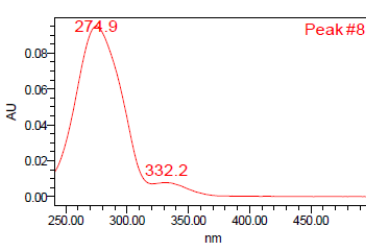
SampleName: Juliana D Injection: 1 Name:  
Retention Time 3.241



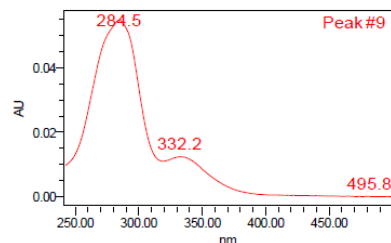
SampleName: Juliana D Injection: 1 Name:  
Retention Time 3.936



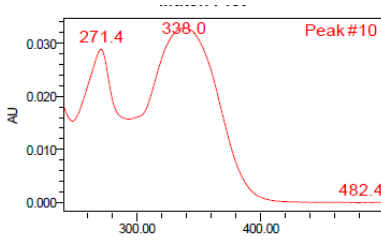
SampleName: Juliana D Injection: 1 Name:  
Retention Time 4.024



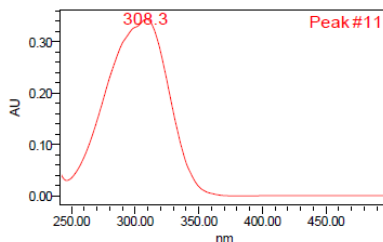
SampleName: Juliana D Injection: 1 Name:  
Retention Time 4.155



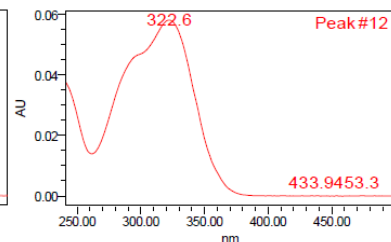
SampleName: Juliana D Injection: 1 Name:  
Retention Time 4.268



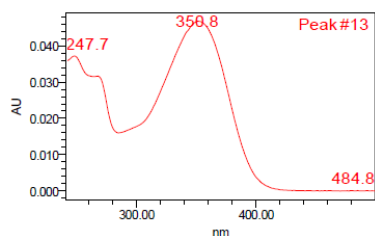
SampleName: Juliana D Injection: 1 Name:  
Retention Time 4.822



SampleName: Juliana D Injection: 1 Name:  
Retention Time 5.048

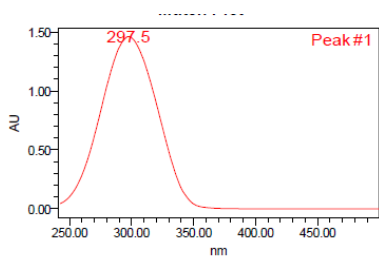


SampleName: Juliana D Injection: 1 Name:  
Retention Time 5.801

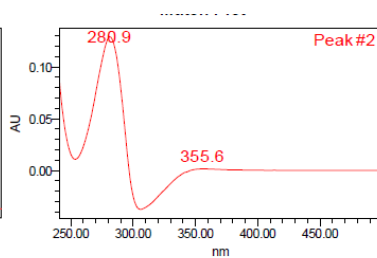


SampleName: Juliana D Injection: 1 Name:  
Retention Time 8.920

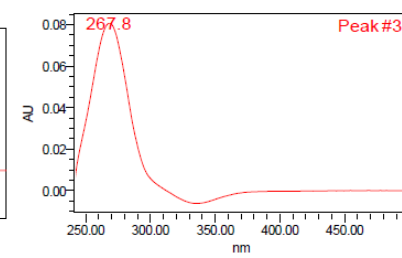
## Anexo 10. Espectros UV correspondientes al cromatograma del extracto E.



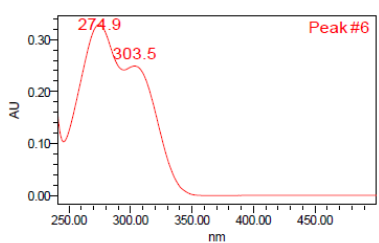
SampleName: Juliana E Inyección: 1 Name:  
Retention Time 2.475



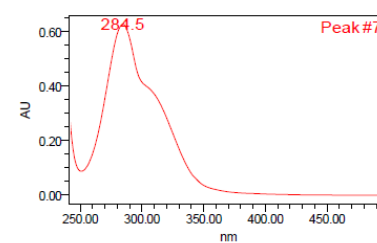
SampleName: Juliana E Inyección: 1 Name:  
Retention Time 2.511



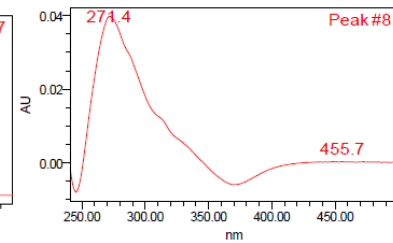
SampleName: Juliana E Inyección: 1 Name:  
Retention Time 2.586



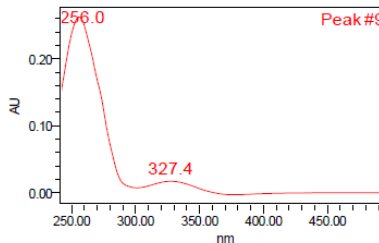
SampleName: Juliana E Inyección: 1 Name:  
Retention Time 3.066



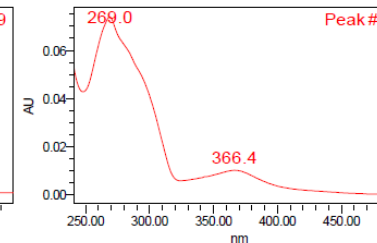
SampleName: Juliana E Inyección: 1 Name:  
Retention Time 3.253



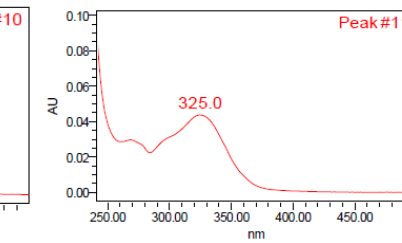
SampleName: Juliana E Inyección: 1 Name:  
Retention Time 3.446



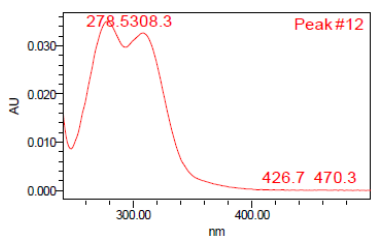
SampleName: Juliana E Inyección: 1 Name:  
Retention Time 3.509



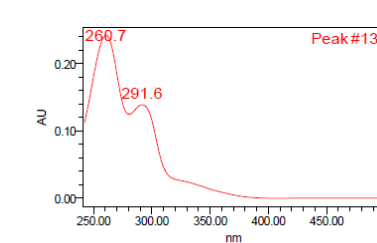
SampleName: Juliana E Inyección: 1 Name:  
Retention Time 3.585



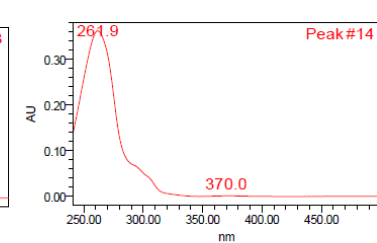
SampleName: Juliana E Inyección: 1 Name:  
Retention Time 3.687



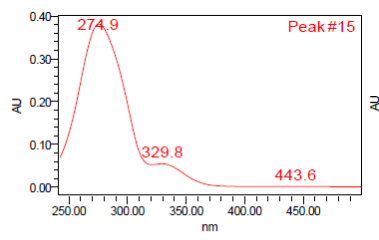
SampleName: Juliana E Inyección: 1 Name:  
Retention Time 3.857



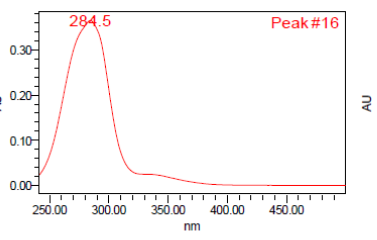
SampleName: Juliana E Inyección: 1 Name:  
Retention Time 3.963



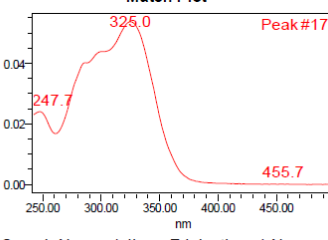
SampleName: Juliana E Inyección: 1 Name:  
Retention Time 4.049



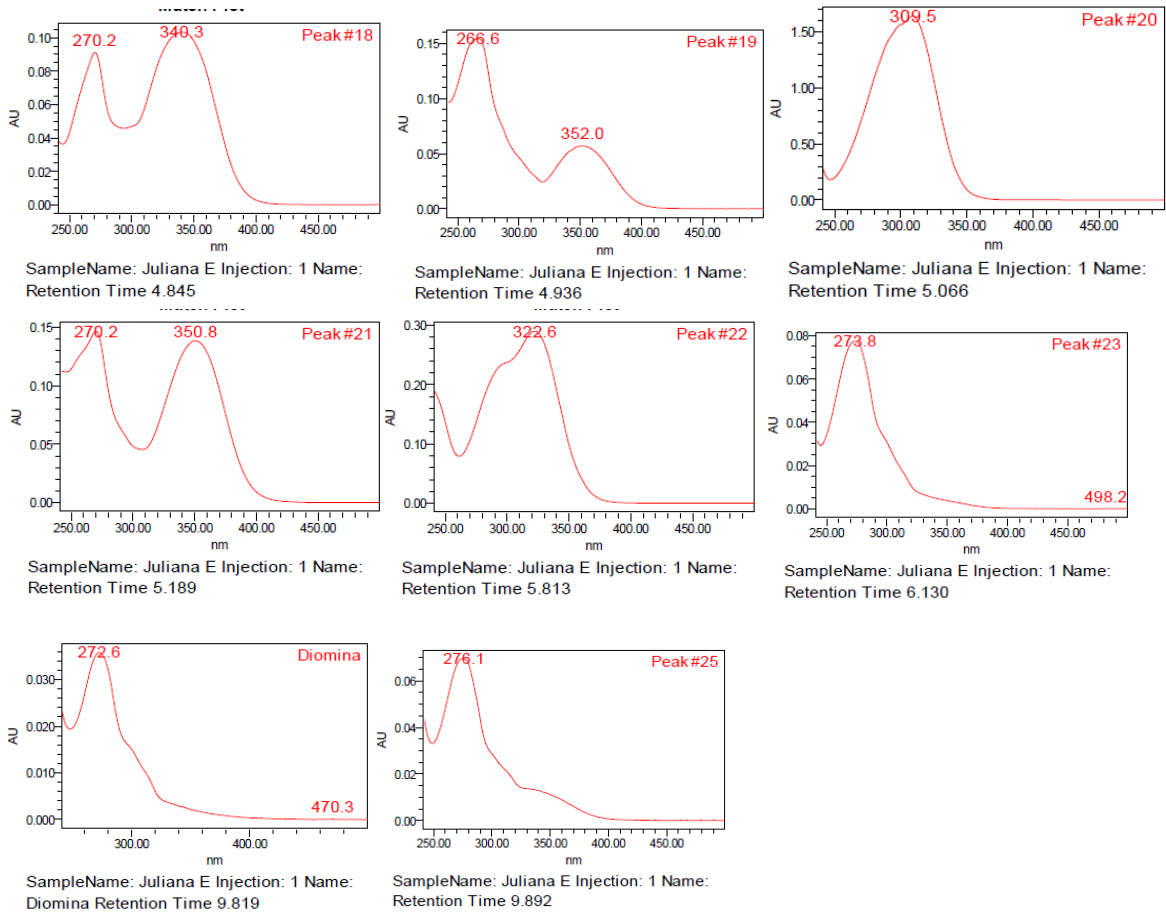
SampleName: Juliana E Inyección: 1 Name:  
Retention Time 4.180



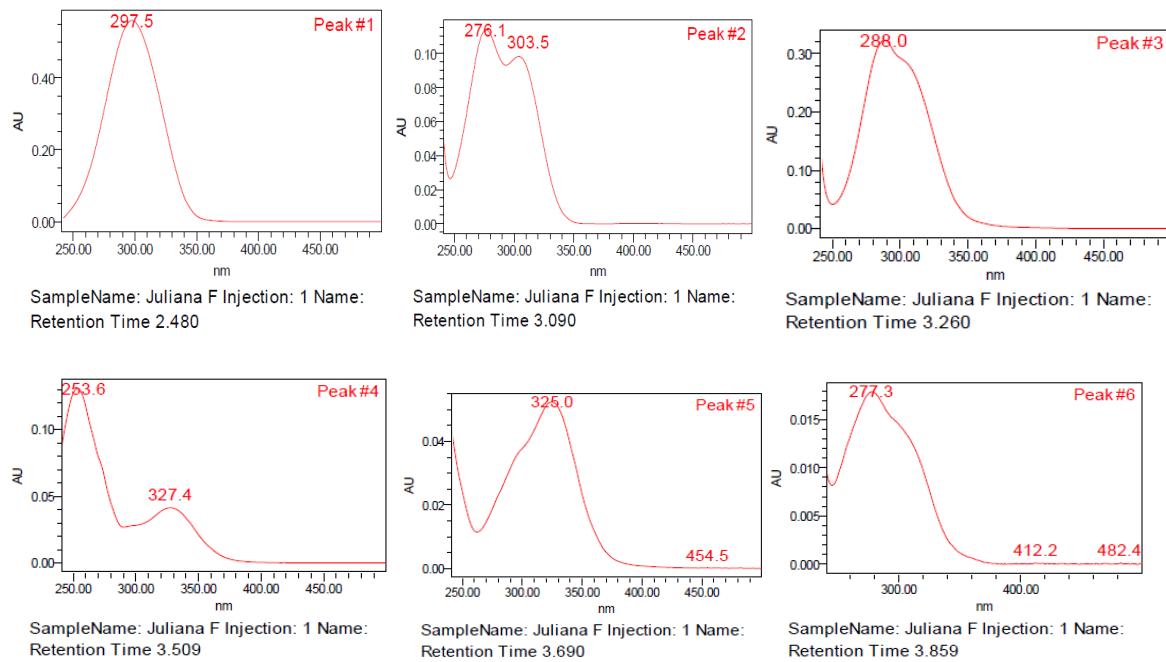
SampleName: Juliana E Inyección: 1 Name:  
Retention Time 4.288

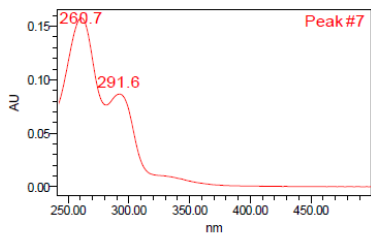


SampleName: Juliana E Inyección: 1 Name:  
Retention Time 4.695

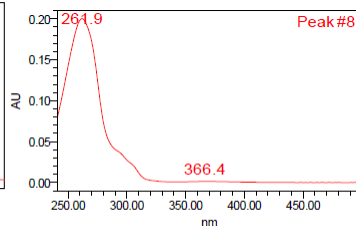


### Anexo 11. Espectros UV correspondientes al cromatograma del extracto F.

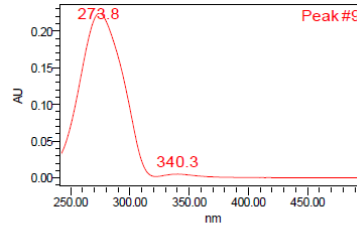




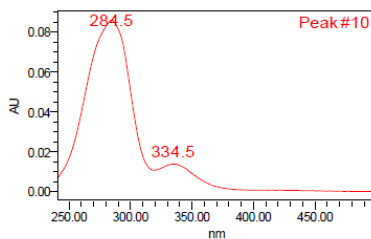
SampleName: Juliana F Injection: 1 Name:  
Retention Time 3.965



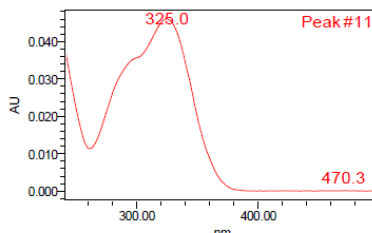
SampleName: Juliana F Injection: 1 Name:  
Retention Time 4.056



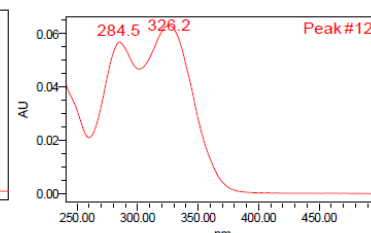
SampleName: Juliana F Injection: 1 Name:  
Retention Time 4.188



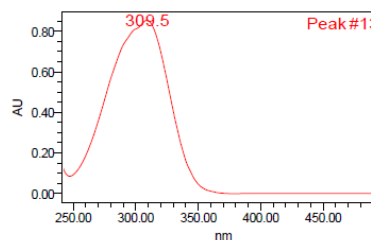
SampleName: Juliana F Injection: 1 Name:  
Retention Time 4.294



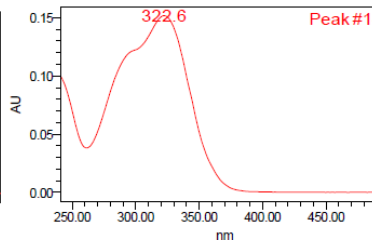
SampleName: Juliana F Injection: 1 Name:  
Retention Time 4.622



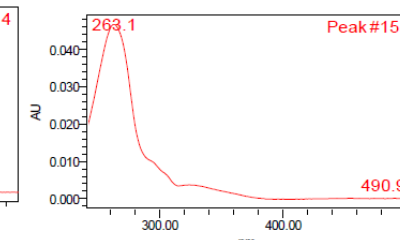
SampleName: Juliana F Injection: 1 Name:  
Retention Time 4.709



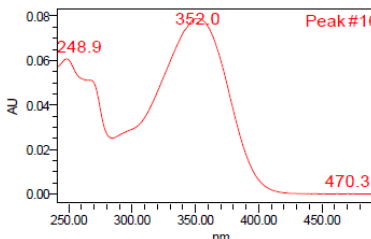
SampleName: Juliana F Injection: 1 Name:  
Retention Time 5.073



SampleName: Juliana F Injection: 1 Name:  
Retention Time 5.821

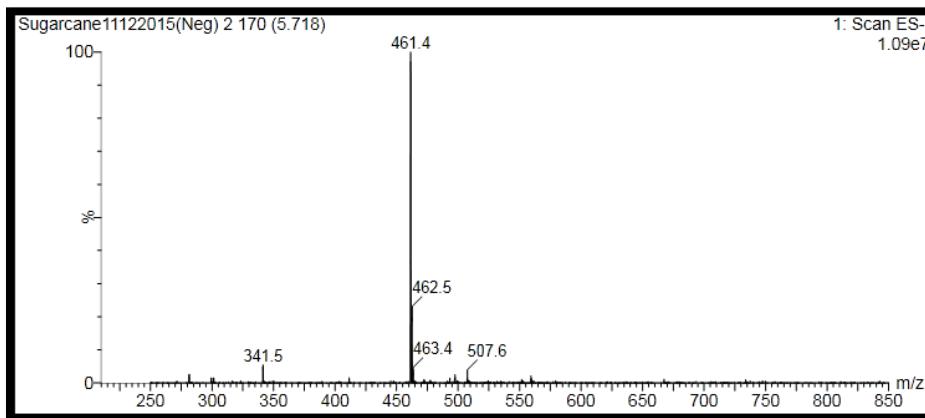


SampleName: Juliana F Injection: 1 Name:  
Retention Time 7.243

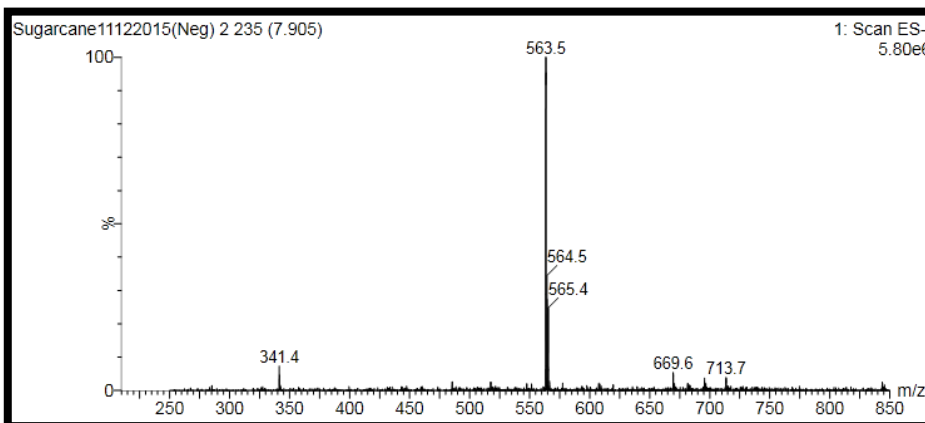


SampleName: Juliana F Injection: 1 Name:  
Retention Time 8.941

**Anexo 12.** Espectro de masas correspondiente a la Diosmetina-8-C-glucosido en modo negativo.



**Anexo 13.** Espectro de masas correspondiente al schaftosido-C-glicósido en modo negativo.



**Anexo 14.** Espectro de masas correspondiente a tricina-8-C-glicósido en negativo.

