

Aislamiento de compuestos aromáticos a partir de torres de decoloración de un ingenio azucarero

Mateo Andrés Echeverry Becerra

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE CIENCIA NATURALES, DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
FARMACÉUTICAS

PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA

Cali, Valle del Cauca

2016

Aislamiento de compuestos aromáticos a partir de torres de decoloración de un ingenio azucarero

Mateo Andrés Echeverry Becerra

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE PREGRADO DE QUÍMICA
FARMACÉUTICA

Tutores: Guillermo León Montoya, Ph.D.

Giovanni Rojas Jiménez, Ph.D.

Cali, Valle del Cauca

2016



APROBADO POR:

Carlos Arango Mambuscay
Evaluador.

Guillermo León Montoya
Director del Proyecto.

Giovanni Rojas Jiménez
Director del Proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Icesi por brindarme la oportunidad de desarrollar diferentes tipos de aptitudes que han sido de gran ayuda en mi vida personal y serán de gran ayuda en mi vida profesional.

A los doctores Guillermo León Montoya y Giovanni Rojas por el acompañamiento brindado durante todo el proceso de este proyecto.

Gracias a mi familia que siempre me ha apoyado en cada decisión que he tomado y fueron la mejor ayuda en momentos difíciles de mi carrera.

Finalmente, gracias a todos mis compañeros de pregrado por su constante compañía y apoyo durante toda la carrera.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|----|
| CONTENIDO DE TABLAS | 7 |
| CONTENIDO DE FIGURAS | 8 |
| RESUMEN DEL PROYECTO..... | 11 |
| ABSTRACT..... | 12 |
| 1. INTRODUCCION | 13 |
| 2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO | 14 |
| 2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 14 |
| 2.2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE..... | 15 |
| 2.2.1 Generalidades | 15 |
| 2.2.2 Impacto Económico de la Caña de Azúcar | 15 |
| 2.2.3 Fabricación de Azúcar Comercial..... | 15 |
| 2.2.4 Proceso de Decoloración | 16 |
| 2.2.5 Antecedentes..... | 17 |
| 2.3 OBJETIVOS | 21 |
| 2.3.1 Objetivo General..... | 21 |
| 2.3.2 Objetivos Específicos | 21 |
| 2.4 METODOLOGÍA | 22 |
| 2.4.1 Matriz de marco lógico | 22 |
| 2.4.2 Toma de la muestra..... | 23 |
| 2.4.3 Tratamiento inicial de la muestra..... | 23 |
| 2.4.4 Extracción..... | 24 |
| 2.4.5 Liofilización | 25 |
| 2.4.6 Prueba cualitativa de shinoda | 26 |
| 2.4.7 TLC para flavonoides C-Glicosidos (Wargner & Blandt, 2009) | 26 |
| 2.4.8 Análisis de extracto por UPLC..... | 27 |
| 2.4.9 Purificación | 27 |
| 2.4.10 Caracterización..... | 28 |
| 2.4.11 Análisis de azúcar encontrado | 28 |
| 2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 31 |
| 2.5.1 Tratamiento de muestra y extracción | 31 |

| | |
|--|----|
| 2.5.2 Cristales de azucres obtenidos en la extracción. | 32 |
| 2.5.3 Liofilización | 34 |
| 2.5.4 Prueba de shinoda para flavonoides. | 34 |
| 2.5.5 TLC para flavonoides C-Glicósidos | 35 |
| 2.5.6 Análisis por cromatografía líquida | 35 |
| 2.5.7 Purificación | 39 |
| 2.5.8 Caracterización por resonancia magnética nuclear | 42 |
| 2.7 CONCLUSIONES | 44 |
| 2.8 RECOMENDACIONES | 45 |
| 3. Bibliografía | 46 |

CONTENIDO DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Matriz de marco lógico. | 22 |
| Tabla 2. Condiciones de UPLC para análisis de extracto. | 27 |
| Tabla 3. Condiciones de Detector PDA para análisis de extracto..... | 27 |
| Tabla 4. Condiciones Isolera para purificación. | 28 |
| Tabla 5. Condiciones UPLC para análisis de azúcares. | 30 |
| Tabla 6. Condiciones detector ELSD para análisis de azúcares. | 30 |
| Tabla 7. Comparación de resultados obtenidos en el presente estudio con el estudio preliminar realizado en 2013..... | 36 |

CONTENIDO DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Torre de decoloración de Manuelita S.A | 17 |
| Figura 2. Estructura básica de flavonoides | 18 |
| Figura 3. Flavonoides totales en diferentes intermediarios del proceso de la caña de azúcar. (Londoño, 2013) | 19 |
| Figura 4. Espectro UV del flavonoide en mayor proporción de la caña de azúcar obtenido por (Londoño, 2013) con las estructuras de los posibles compuestos correspondientes. | 19 |
| Figura 5. RMN-H1 de polímero sintetizado a partir de Acido Aconítico. (VÁSQUEZ, 2014) | 20 |
| Figura 6. Torre de decoloración Manuelita S.A | 23 |
| Figura 7. Extracción de muestra de carbón. | 23 |
| Figura 8. Montaje para realizar lavados a la muestra. | 24 |
| Figura 9. Algodón usado como filtro en la parte inferior del recipiente. | 24 |
| Figura 10. Muestra de carbón en extracción con solventes. Se observa un beacker mas pequeño (amarillo) con los solventes que ya extrajeron moléculas de interés. | 24 |
| Figura 11. Montaje usado para la filtración del solvente usado en la extracción. . | 25 |
| Figura 12. Rotovaporador Heidolph usado en la eliminación de solventes. | 25 |
| Figura 13. Extracto obtenido con remanente de agua. | 25 |
| Figura 14. Modulo de refrigeración del liofilizador Leyela. | 26 |
| Figura 15. Modulo de alta presión del liofilizador Leyela. | 26 |
| Figura 16. Equipo Isolera Flash One usado en la purificación del extracto. | 28 |
| Figura 17. Cristales de azúcar obtenido en el proceso de filtración. | 29 |
| Figura 18. Cromatograma obtenido para el estándar de glucosa. | 32 |
| Figura 19. Cromatograma obtenido para el estándar de Xylitol. | 32 |
| Figura 20. Cromatograma obtenido para el estándar de Fructosa. | 33 |
| Figura 21. Cromatograma obtenido para el estándar de sacarosa. | 33 |
| Figura 22. Cromatograma obtenido para la muestra de cristales de azucares. ... | 33 |
| Figura 23. Extracto liofilizado. | 34 |
| Figura 24. Prueba de Shinoda en Extracto Liofilizado. | 35 |
| Figura 25. Cromatograma de extracto liofilizado obtenido por UPLC en 2016. | 36 |
| Figura 26. Espectro UV para la retención en 4.396 minutos(figura 24). | 37 |
| Figura 27. Espectro UV para la retención en 5.135 minutos(figura 24). | 37 |
| Figura 28. Espectro UV para la retención en 6.152 minutos(figura 24). | 37 |
| Figura 29. Espectro UV para la retención en 6.441 minutos(figura 24). | 37 |
| Figura 30. Cromatograma obtenido en 2013. | 37 |
| Figura 31. Espectro UV para la retención en 3.741 minutos(figura 29). | 38 |
| Figura 32. Espectro UV para la retención en 4.299 minutos(figura 29). | 38 |
| Figura 33. Espectro UV para la retención en 4.465 minutos(figura 29). | 38 |
| Figura 34. Espectro UV para la retención en 4.877 minutos(figura 29). | 38 |

| | |
|---|----|
| Figura 35. Cromatograma obtenido por Isolera Biotage® | 40 |
| Figura 36. Espectro UV obtenido por Isolera Biotage® | 41 |
| Figura 37. Espectro RMN de Extracto Purificado y Liofilizado. | 42 |

RESUMEN DEL PROYECTO

La caña de azúcar ha representado uno de los principales pilares en la economía del suroccidente colombiano por muchos años, lo cual hace de este sector un excelente foco de investigación en la optimización de procesos y productos elaborados por esta industria. En la actualidad, se están realizando estudios en diferentes campos asociados al sector azucarero, con la finalidad de generar reaprovechamiento de residuos obtenidos durante el procesamiento de la caña de azúcar, lo que termina en un impacto positivo ambiental y económico para la región. Las torres de decoloración utilizan carbón activado para remover diferentes moléculas que aportan color al jugo de caña y así obtener un producto mas apetecido por los clientes (azúcar blanca), sin embargo una vez terminado el ciclo de producción, las moléculas que fueron retenidas por el carbón activado son desechadas.

Por medio de este proyecto se desarrolló una metodología a nivel de laboratorio para extraer biomoléculas a partir de una matriz de carbón usado en torres de decoloración de un ingenio azucarero, con el fin de brindar información estructural de moléculas presentes en este residuo. Para esto fue necesario realizar procesos como extracción, purificación y caracterización por resonancia magnética nuclear protónica (RMN- H^1). Lastimosamente, el gran número de moléculas con características fisicoquímicas similares, hacen que el proceso de purificación de una sola molécula sea sobredimensionado para las competencias de formación profesional. Sin embargo la información preliminar obtenida en el trabajo experimental ofreció al estudiante un reto analítico e instrumental de gran proporción. A pesar de no haber obtenido el nivel de pureza suficiente para brindar mayor información estructural, se comprobó la presencia de flavonoides por medio de pruebas cualitativas. Además, se realizó un análisis por cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento (UPLC) al extracto obtenido y fue comparado con otro estudio similar realizado en 2013 (en el mismo grupo de investigación), con lo que se corroboró la existencia de flavonoides en torres de decoloración de ingenios azucareros. Adicionalmente, se analizaron cristales obtenidos en el proceso de extracción por solventes por cromatografía líquida en acople con un detector de dispersión de luz evaporativo (UPLC-ELSD) y se determinó que estaban compuestos en su mayoría por sacarosa.

Palabras clave: Caña de azúcar, Torres de Decoloración, Carbón , Biomoléculas.

ABSTRACT

Over the years, sugarcane has been one of the best economy pillars in the southwest of Colombia, which has turn this part of the country into a main investigation center for the optimization of manufacturing process for this industry. Currently, the different sugarcane investigations have generated a positive environmental and economic impact for the reutilization of the sugarcane wastes. To obtain a good quality product, the discoloration towers use charcoal to remove the sugarcane juice color in order to acquire white sugar, product that is more desired for the costumers. Once the production cycle has ended, the retained molecules are thrown away.

Through this project a methodology was developed for extracting flavonoids from a carbon matrix used in discoloration towers, in order to provide structural information of molecules present in this residue. It was necessary processes such as extraction, purification and proton nuclear magnetic resonance (NMR). Unfortunately, the NMR spectrum showed several molecules in the extract sample, which impede the structural elucidation of some biomolecules. However, despite the result, it could be proved the presence of some flavonoids by the Shinoda experimental method. Moreover, an analysis by ultra performance liquid chromatography (UPLC) was done on the extract sample. The result was compared with another similar study performed in 2013, which helped to explore the existence of some flavonoids in the sugarcane discoloration towers. Finally, some crystals were obtained in the process of solvent extraction, which where later analyzed and determined by ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) that most of them were composed by sucrose.

Key Words: Sugarcane, Discoloration Towers, Coal, Biomolecules.

1. INTRODUCCION

La industria azucarera es uno de los pilares de la economía vallecaucana y ha sido de gran influencia en la economía nacional por muchos años. A pesar que la elaboración y comercialización de azúcar hacen parte de un mercado estable y que genera una cantidad considerable de ganancias para nuestra región, se han venido explotando otros productos que representan mayor valor comercial que el azúcar mismo (ej. Etanol). Por tanto, muchos estudios se centran en el aislamiento e identificación de moléculas presentes en residuos y productos intermedios, con el fin de impulsar el re-aprovechamiento y generación de nuevos sub-productos a partir de productos remanentes.

En los últimos años, se han realizado diversos estudios sobre algunas moléculas como flavonoides presentes en diferentes residuos en las etapas de la obtención de azúcar a partir de la caña (Londoño, 2013), los cuales se destacan por sus propiedades antioxidantes y pueden ser re-aprovechados. Adicionalmente, se han reportado estudios donde se han sintetizado polímeros a partir de residuos de la industria azucarera (Vásquez, 2014). Este tipo de estudios no solo puede desencadenarse en un impacto económico para la industria azucarera sino en un gran impacto ambiental para la región vallecaucana también.

El proceso de obtención de azúcar consta de varias etapas: extracción de jugo, clarificación, evaporación, cristalización, afinación o lavado, decoloración y re cristalización. En el ingenio Manuelita S.A (Valle del Cauca) el proceso de decoloración se lleva a cabo en sistemas denominados torres de decoloración, aquí se remueven diferentes moléculas que aportan color al jugo de caña para finalmente obtener azúcar blanca. Actualmente, después de un ciclo de producción, estas moléculas son retiradas y desechadas.

Este proyecto tenía como objetivo brindar información estructural sobre las moléculas removidas por las torres de decoloración y que están siendo desechadas. Para esto, se realizó la extracción de moléculas de interés por medio de solventes orgánicos a partir de una muestra de carbón usado en las torres de decoloración, luego se sometió a purificación el extracto haciendo uso de técnicas cromatográficas y por último se usó resonancia magnética nuclear protónica ($^1\text{H-NMR}$) con la intención de realizar una propuesta estructural de dichas moléculas. A pesar que los resultados no fueron los esperados, se determinó la presencia de flavonoides en la muestra de carbón activado tomado de las torres de decoloración de ingenio Manuelita S.A.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante años, los ingenios azucareros han representado un sector clave en la economía colombiana, con un aproximado de 225.500 hectáreas de caña de azúcar sembrada en el suroccidente del país y generando por lo menos 2 millones de empleos directa e indirectamente durante toda la cadena de elaboración y distribución de sus principales productos (azúcar, panela, energía y etanol). (Asocaña, 2013-2014)

Actualmente, se están explotando al máximo los recursos y generando subproductos como biocombustibles y nuevos edulcorantes. El mercado azucarero se ha venido diversificando, debido a que otros derivados de la caña diferentes al azúcar (etanol y energía) representan hoy en día, un aporte económico mucho mayor que el azúcar mismo para la industria cañera. Lo anterior conlleva a que el azúcar tradicional pierda su protagonismo y los ingresos de la industria se ven influenciado en gran medida por estos nuevos subproductos y sus derivados (Aguilar-Rivera, Rodríguez Lagunes , & Castillo Morán, 2010).

Adicionalmente, se han estudiado las composiciones de los residuos generados en este proceso como los son la vinaza, melaza, el bagazo, entre otros. También, se han estudiado ácidos orgánicos presentes en gran proporción en el jugo de caña como es el caso del ácido Aconítico, el cual puede ser de gran utilidad en la generación de agentes entrecruzantes naturales y bioplásticos. (VÁSQUEZ, 2014)

Por otra parte, una etapa clave en el proceso de obtención de alcohol etílico y azúcar de alta pureza es la decoloración del jarabe, en este paso se remueven moléculas coloridas para obtener productos más atractivos y competitivos en el mercado internacional. Existen diversos métodos para llevar a cabo el proceso mencionado, en el caso del Ingenio Manuelita S.A, se usan torres de decoloración equipadas con carbón animal, el cual retiene una parte de las moléculas que aportan color al jugo de caña. Una vez este carbón se encuentra saturado, es expuesto a altas temperaturas donde son eliminadas estas moléculas coloridas y posteriormente se reincorpora el carbón seco a las torres de decoloración para un nuevo ciclo de producción.

Este trabajo evidencia la presencia de flavonoides como biomoléculas residuales retenidas en carbón animal de torres de decoloración del ingenio Manuelita S.A, con gran potencial para generar un posterior re-aprovechamiento de dichos recursos en diferentes líneas de investigación.

2.2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

2.2.1 Generalidades

Inicialmente, la caña de azúcar que llegó al Valle del Cauca fue *Saccharum Officinarum*, originaria de Nueva Guinea y se fue extendiendo por Asia hasta llegar a Sudamérica. Se caracteriza por sus tallos altos y gruesos, hojas anchas, alto contenido de sacarosa, bajo contenido de fibras. Sus largos tallos están divididos por nodos en forma de anillos. La caña de azúcar se propaga asexualmente por trozos de tallo cortado que posean al menos un brote (Barnes, 1964). En la actualidad, la variedad de caña de azúcar mas encontrada en el suroccidente colombiano es llamada “CC 85-92”, la cual ha sido desarrollada por Cenicaña con el fin de asegurar la sostenibilidad y competitividad del sector. (Estévez, 2002)

2.2.2 Impacto Económico de la Caña de Azúcar

El mercado azucarero genera un gran impacto en la economía mundial y nacional, solo en Colombia se sembraron 225.560 hectáreas en 2013, generando 180.000 empleos de forma directa (cosecha, fabrica y refinería) e influye en aproximadamente 720.000 empleos de forma indirecta (distribuidores, encargados de procesos de empaque, publicidad, entre otros). (Asocaña, 2013-2014)

Sin embargo, el azúcar en el mercado mundial ha venido perdiendo su valor de cambio como producto final. Como resultado, la industria azucarera ha diversificado sus productos con el fin de mejorar la rentabilidad y estabilidad económica. Para lograr esto, desde los años ochenta se han venido estableciendo programas de investigación centrados en la generación de subproductos y reaprovechamiento de material que antes se consideraba sobrante o desecho. (Aguilar-Rivera, Rodríguez Lagunes , & Castillo Morán, 2010)

Es posible que en unos años la economía del sector azucarero dependa mas de otros derivados de la caña que del azúcar mismo.

2.2.3 Fabricación de azúcar comercial

El proceso de obtención de azúcar partiendo de la caña de azúcar se puede dividir en los siguientes pasos:

Extracción de jugo o guarapo: El primer paso es la molienda, donde la caña pasa por una serie de cuchillas giratorias para reducir su tamaño. Luego se pasa por una serie de múltiples rodillos que extraen el jugo de caña con un contenido de 95% de azúcar aproximadamente. En este proceso se obtiene como residuo el Bagazo en cual es usado principalmente en calderas de vapor por su alto contenido en agua. (Chen, 2006)

Clarificación: Del proceso anterior se obtiene el Guarapo; jugo de tonalidad verde oscura con pH ácido. A este jugo se aplica cal para neutralizar su acidez y formar

sales insolubles de calcio, permitiendo la remoción de impurezas. Además, se expone a altas temperaturas para coagular o degradar cera, gomas y demás grasas presentes. Por último se filtra y se remueven sobrenadantes y precipitados. El residuo de esta etapa es conocido como Cachaza, ampliamente usada como fertilizante en cultivos. (Chen, 2006)

Evaporación y Cristalización: El jugo clarificado cuenta con más o menos un 85% de agua, gran parte de esta es evaporada en sistemas de tachos al vacío, donde el jarabe es evaporado hasta quedar saturado de azúcar. Es este proceso, se añaden semillas con el fin de ser usadas como núcleos para la cristalización de azúcar. A medida que se va evaporando la porción de agua y cristalizando el azúcar, se va adicionando jarabe haciendo un proceso continuo hasta que se alcanza la capacidad máxima del tacho. Posteriormente, se disminuye la temperatura para cristalizar la sacarosa que permanece en solución. (Chen, 2006)

La mezcla viscosa obtenida se le da el nombre de masa cocida. Luego, esta es llevada a equipos de centrifugación donde son expuestas a velocidades entre 1000 y 1800 RPM, con el fin de separar los cristales de sacarosa obtenida de las mieles residuales. Las mieles o melazas residuales son usadas para alimentación de ganado, fermentación alcohólica, entre otras. (Chen, 2006)

Afinación o Lavado: consiste en eliminar la película de mieles adherida a los cristales de azúcar con agua caliente. En este paso se manejan temperaturas de 72 °C para mejorar la fluidez del crudo obtenido tras la centrifugación. Luego, este jugo de caña es sometido a un proceso de clarificación debido a que contiene material particulado que no fue removido en la primera clarificación. Licor en este contexto, hace referencia a una solución muy concentrada de azúcar. Por último se filtra para eliminar impurezas ya mencionadas. (Chen, 2006)

Decoloración, evaporación y cristalización: En este proceso, el licor o jugo de caña filtrado se pasa por unas torres de decoloración, las cuales contienen carbón animal para adsorber impurezas y moléculas que aportan color a este jugo de caña. El jugo de caña decolorado se envía a un sistema de tachos al vacío previamente mencionados donde es cristalizado el azúcar comercial y se obtienen las mieles residuales.

2.2.4 Proceso de decoloración

Una de las principales diferencias entre el azúcar alta pureza y el azúcar crudo es el color, por lo tanto, este es un parámetro exigido por el mercado internacional. Existen diferentes tipos de sistemas de decoloración, pero en el cual se va a hacer énfasis será en la decoloración por adsorbentes de carbón.

El carbón animal o de hueso usado en la torres de decoloración remueve por adsorción moléculas coloridas e impurezas como la ceniza presente en el jugo de caña lavado. El contacto del jugo de caña con el carbón se da en zonas llamada cisternas, una vez se completa el ciclo del licor o jugo de caña, el carbón es lavado en la mismas cisternas. Luego, se descarga el carbón húmedo para ser sometido a altas temperaturas y evaporar agua y demás moléculas adheridas. Por ultimo, el carbón seco se reingresa a la torres para un nuevo ciclo.(Chen, 2006)



Figura 1. Torre de decoloración de Manuelita S.A

2.2.5 Antecedentes

Se han realizado diversos estudios sobre caracterización y cuantificación de diversas moléculas en residuos e intermediarios del proceso de la caña de azúcar dado que encontrarle una funcionalidad a estos desechos generaría un impacto positivo a nivel ambiental y económico a la industria azucarera. Algunas de las moléculas que han sido foco de estudio son los flavonoides, ácido Aconítico y antocianinas.

Los flavonoides son metabolitos secundarios presentes en varios tipos de plantas, tienen como función ejercer resistencia a la foto-oxidación causada por luz ultravioleta y aportan color a estas y a sus plantas. A nivel molecular, se caracterizan por tener un esqueleto de difenilpropanos; dos anillos aromáticos unidos por una cadena de tres carbonos que usualmente forman un tercer anillo con un oxígeno como heteroátomo. Dicho esqueleto de fenilpropano proviene de la ruta del ácido Shikimico y conforma la porción Cinamoilo, mientras que la

cadena de tres carbonos viene de la ruta metabólica de los policetidos y forma la porción b́enzoilo (figura 2) (Londoño, 2013). La mayoría de flavonoides se caracterizan por presentar dos máximos de absorbancia en espectros ultravioleta, el primero entre 300 - 390nm asociada a la porción Cinamoilo, y la segunda banda en el rango de 250-280nm asociada con la porción B́enzoilo (Martínez, 2005)

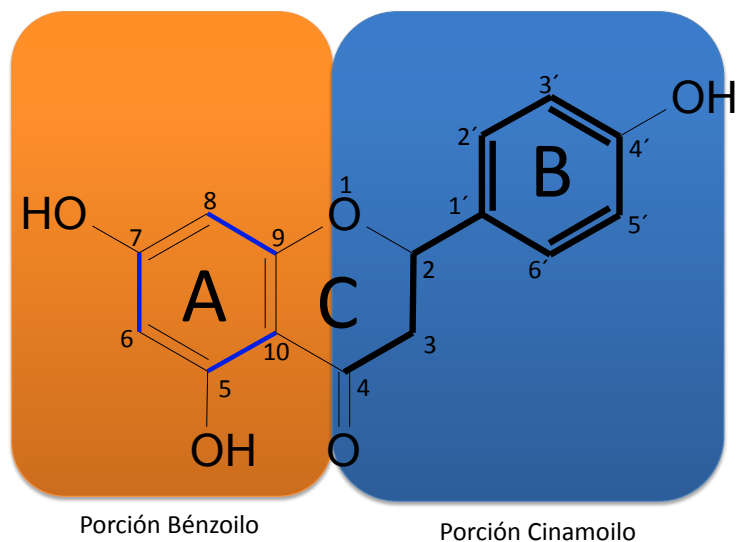


Figura 2. Estructura básica de flavonoides.

Esta demostrado que los flavonoides están presentes en jugos, extractos, jarabes y mieles del proceso de la caña de azúcar, con cantidades mayores en los dos últimos (Figura 3). En particular, en este estudio realizado por Londoño y colaboradores, 2013 se obtuvo un espectro ultravioleta del flavonoide con mayor presencia en la caña de azúcar y se determinó por los máximos de absorción que posiblemente correspondían a Schaftosido o Vitexina (figura 4).

Los flavonoides han sido foco de diferentes estudios debido a sus propiedades antioxidantes que pueden ser usadas en la industria cosmética, farmacéutica o alimentaria. Adicionalmente, se tiene conocimiento del alto contenido de flavonoides en productos altamente comercializados como el Ginkgo, el cual se encontró que contiene en sus hojas alrededor 2,62 mg/g, lo que lleva a pensar que puede verse implicado en la acción vasodilatadora, antiagregante plaquetario, antioxidante y/o diurética del Ginkgo comercial. (Ji-yonga, Xiao-boa, Jie-wena, b, Kai-lianga, & Xuea, 2012),

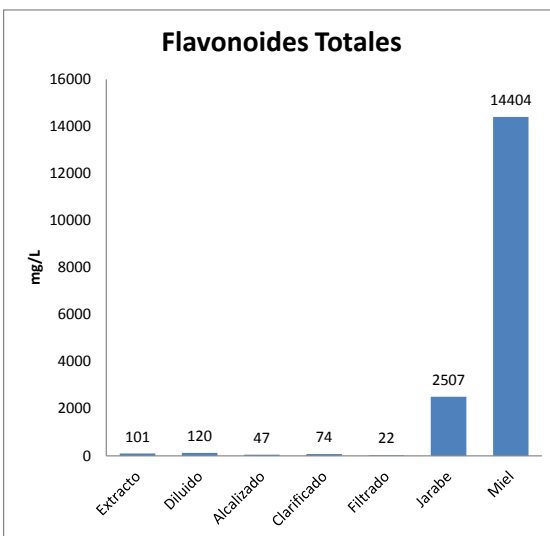


Figura 3. Flavonoides totales en diferentes intermediarios del proceso de la caña de azúcar. (tomado de Londoño, 2013)

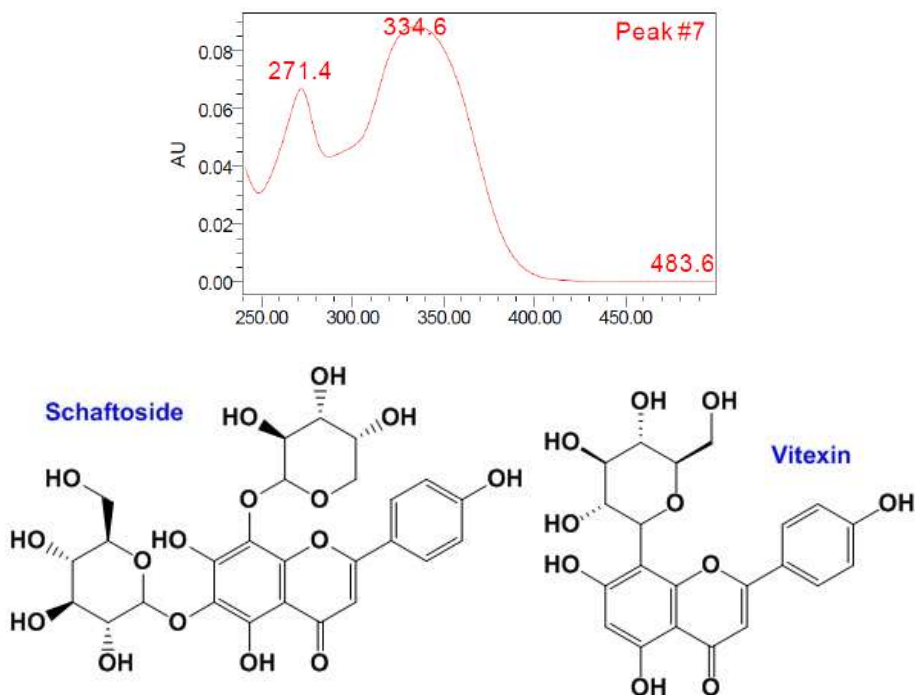


Figura 4. Espectro UV del flavonoide en mayor proporción de la caña de azúcar obtenido por (Londoño, 2013) con las estructuras de los posibles compuestos correspondientes.

Por otra parte, los ácidos orgánicos representan un porcentaje significativo de los compuestos diferentes al azúcar presentes en la caña y tienen un papel importante en procesos vitales como el ciclo de Krebs. El ácido Aconítico es el ácido orgánico de mayor proporción, por encima de otros ácidos como el fumárico, cítrico, oxálico y glucólico. (Zapata Gil, 2007)

Este ácido alifático e insaturado cuenta con dos isómeros, cis y trans; el primero participa en procesos metabólicos de la planta por tanto se encuentra en bajas concentraciones a diferencia del isómero trans. El ácido aconítico ha sido aislado de la caña de azúcar para ser usado como agente entrecruzante en la síntesis de materiales poliméricos, en la figura 5 se puede apreciar el espectro RMN-H¹ de un polímero obtenido a partir del ácido Aconítico (VÁSQUEZ, 2014). También, este ha sido usado como agente acidulante en diferentes productos referentes a la industria alimentaria. (Tascon Romero, 2013).

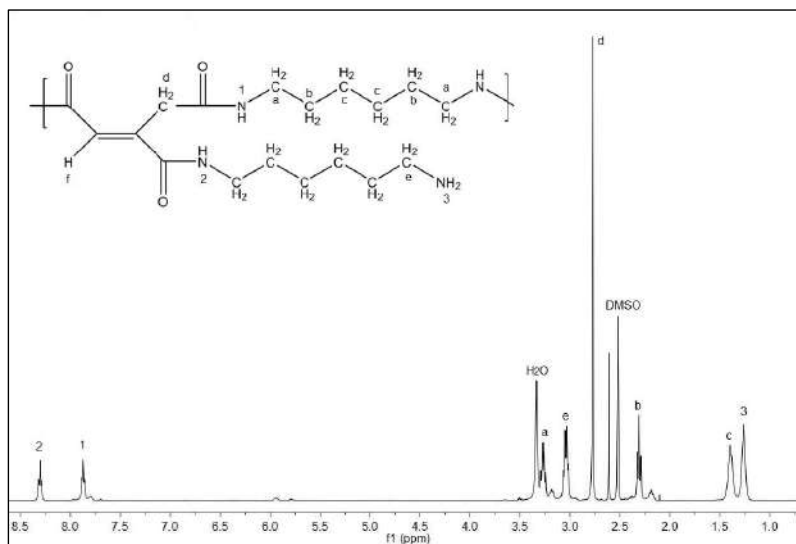


Figura 5. RMN-H¹ de polímero sintetizado a partir de Acido Aconítico. (tomado de VÁSQUEZ, 2014)

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 Objetivo General

Caracterizar a nivel estructural al menos un compuesto aromático presente en residuos de torres de decoloración usadas en el proceso de obtención de azúcar en un ingenio del Valle del Cauca.

2.3.2 Objetivos Específicos

- Extraer compuestos aromáticos presentes en una muestra de carbón animal previamente usado en torres de decoloración de Ingenio Manuelita S.A.
- Separar compuestos aromáticos por medio de cromatográfica en columna automatizada (Isolera Flash-One).
- Elucidar la estructura de al menos un compuesto aromático presente en torres de decoloración haciendo uso de resonancia magnética nuclear protónica y de carbono (RMN-H¹ y RMN-C¹³).

2.4 METODOLOGÍA

2.4.1 Matriz de marco lógico

| Objetivo General: Caracterizar a nivel estructural al menos un compuesto aromático presente en residuos de torres de decoloración usadas en el proceso de obtención de azúcar en un ingenio del Valle del Cauca. | | | |
|---|---|--|---|
| Objetivos Específicos | Actividades | Indicadores | Supuestos |
| Extraer compuestos aromáticos presentes en una muestra de carbón animal previamente usado en torres de decoloración de Ingenio Manuelita S.A. | <ul style="list-style-type: none"> • Toma de muestra de carbón animal usado en torres de decoloración en Manuelita S.A. • Solubilización de compuestos aromáticos presentes en muestra por tratamiento con solventes. | <ul style="list-style-type: none"> • Compuestos aromáticos extraídos de la muestra (Carbón) y presentes en solventes. | <ul style="list-style-type: none"> • Disponibilidad de los solventes requeridos. |
| Separar compuestos aromáticos por medio de cromatográfica en columna automatizada (Isolera Flash-One). | <ul style="list-style-type: none"> • Separación de compuestos aromáticos por su polaridad, haciendo uso de Isolera Flash-One. | <ul style="list-style-type: none"> • Cromatogramas obtenidos en Isolera Flash-One. | <ul style="list-style-type: none"> • Disponibilidad de equipo Isolera Flash-One. |
| Elucidar la estructura de al menos un compuesto aromático presente en torres de decoloración haciendo uso de resonancia magnética nuclear protónica y de carbono (RMN-H ¹ y RMN-C ¹³). | <ul style="list-style-type: none"> • Toma de espectros RMN-H¹ y RMN-C¹³ para corroborar y ajustar la estructura de los compuestos obtenidos. | Caracterización estructural de la molécula. | <ul style="list-style-type: none"> • Disponibilidad de equipos RMN-H¹ y RMN-C¹³). • Muestra debidamente purificada. |

Tabla 1. Matriz de marco lógico.

2.4.2 Toma de la muestra

La muestra de carbón es extraída de una de las torres de decoloración del ingenio Manuelita SA. Esta torre llevaba varias horas de trabajo sin realizar el recambio de carbón.



Figura 6. Torre de decoloración Manuelita S.A



Figura 7. Extracción de muestra de carbón.

2.4.3 Tratamiento inicial de la muestra

La muestra fue llevada al laboratorio y ya que no se contaban con implementos específicos para el tratamiento, se utilizaron materiales de uso común como mangueras, erlenmeyer de 5 litros y un recipiente plástico con válvula inferior (ver figura 8). Este montaje permitió realizar lavados con agua para eliminar el alto contenido de sacarosa. El lavado consistió en tres volúmenes (15 litros) del recipiente con agua destilada tratando de desorber las moléculas de alta polaridad que pudiesen quedar adsorbidas en el carbón.

Fue de gran importancia agitar de forma mecánica el recipiente una vez adicionada el agua para que esta pueda estar en contacto con toda la muestra. Adicionalmente, se usó algodón en la válvula inferior para evitar que la muestra de carbón saliera del contenedor (figura 9).



Figura 8. Montaje para realizar lavados a la muestra.



Figura 9. Algodón usado como filtro en la parte inferior del recipiente.

2.4.4 Extracción

El carbón lavado se separó en tres beacker de 5 litros en partes iguales. Luego, se adicionaron 2 litros de metanol:acetato de etilo (1:1) y se dejó en reposo por 72 horas.



Figura 10. Muestra de carbón en extracción con solventes. Se observa un beacker mas pequeño (amarillo) con los solventes que ya extrajeron moléculas de interés.

Posteriormente, se tomó un embudo Buchner y se colocó una capa de algodón, donde se filtró la muestra para retirar el carbón del solvente usado. Después, Se

rotovaporó hasta eliminar la mayor cantidad de metanol y acetato de etilo, usando condiciones sugeridas por el fabricante Heidolph para eliminar este tipo de solventes.



Figura 11. Montaje usado para la filtración del solvente usado en la extracción.



Figura 12. Rotovaporador Heidolph usado en la eliminación de solventes.

2.4.5 Liofilización

Debido a que el extracto evidenció gran cantidad remanente de agua (figura 13), se procedió a liofilizar en el equipo Leyela donde se llevó la muestra a -60°C en el modulo de congelación (figura 14) y luego se expuso a secado por congelamiento (sublimación) (figura 15).

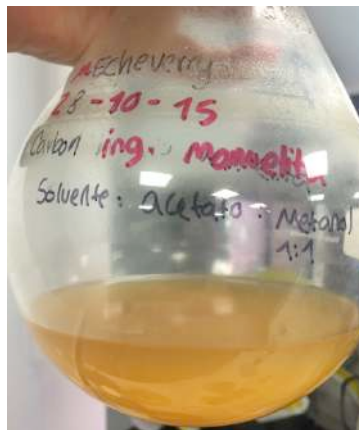


Figura 13. Extracto obtenido después del proceso de evaporación de solventes, que evidencia una cantidad acuosa significativa.



Figura 14. Modulo de refrigeración del liofilizador Leyela.



Figura 15. Modulo de alta presión del liofilizador Leyela.

2.4.6 Prueba cualitativa de Shinoda

Esta prueba determina la presencia de flavonoides de núcleo benzopirona por medio de un viraje de color. Primero se solubiliza la muestra en agua o etanol y se agregan limaduras de magnesio. Después, se dejan caer gotas de HCl concentrado por la pared del tubo, lo que genera un burbujeo en el tubo a causa de la liberación de hidrógeno. Se deja en reposo y al cabo de unos 20-25 minutos se compara colorimétricamente el tubo de la reacción con un tubo testigo, el cual solo posee la muestra solubilizada. Si el tubo de la reacción posee una coloración rojiza, la prueba se concluye como positiva para presencia de flavonoides.

2.4.7 TLC para flavonoides C-glicósidos (Wagner & Blandt, 2009)

Esta cromatografía planar ayuda a evidenciar ciertos flavonoides de tipos C-glicósido, es decir que la molécula de azúcar está unida al flavonoide por un enlace de carbono. Primero debe prepararse la fase móvil y el revelador que se presenta a continuación:

Fase móvil: Acetato de etilo- Ácido Fórmico- Ácido Acético Glacial- Agua (100:11:11:26).

Revelador: Natural Products – Polietilenglicol (NP/PEG). Fase A: solución metanólica al 1% de Ácido difenilbórico (Natural Products). Fase B: solución etanólica al 5% de polietilenglicol 4000 (PEG-4000).

Una vez sembrada la placa y saturada la cámara con la fase móvil, se pone a eluir la fase móvil sobre la placa. Se revela con la fase A seguido de la fase B y se observa la placa a 365 nm.

2.4.8 Análisis de extracto por UPLC

El extracto fue analizado por cromatografía líquida acoplada a un detector de fotodiodos en las siguientes condiciones:

| Equipo | UPLC WATERS con detector PDA |
|---------------------|---|
| Columna | ACQUITY UPLC HSS T3 2.1 x 100 mm, 1.8 |
| Fase móvil B | Acetonitrilo |
| Fase móvil A | AGUA con 0.05% FA (Acido Fórmico) |
| Flujo | 0.3 mL/min |
| Método | Inicial: 99%A / 1%B 7 minutos 80%A / 20%B 11 minutos: 65%A / 35%B |

Tabla 2. Condiciones de UPLC para análisis de extracto.

| Condiciones PDA | |
|------------------------|-------------|
| Rango | 210nm-400nm |
| Resolución | 1,2 nm |

Tabla 3. Condiciones de Detector PDA para análisis de extracto.

2.4.9 Purificación

Para esta sección de la metodología se hace uso del equipo Biotage® Isolera Flash-One. La muestra seca es disuelta en metanol y luego se ajusta el equipo a las siguientes condiciones:

| | |
|-----------------|--|
| Equipo | Isolera Biotage acoplado a detector UV/VIS |
| Cartucho | Biotage® SNAP KP-C18-HS 30g |

| | |
|------------------|--------------------|
| Flujo | 12 mL/min |
| Solventes | A: Metanol B: Agua |
| Detección | 200-800 nm |

Tabla 4. Condiciones Isolera para purificación.

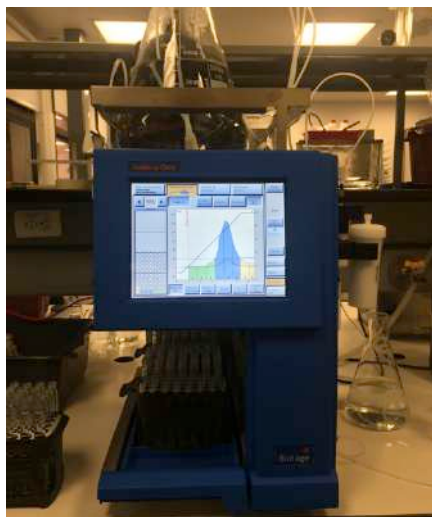


Figura 16. Equipo Isolera Flash One usado en la purificación del extracto.

2.4.10 Caracterización

Acorde a los objetivos específicos, se procedió a llevar a cabo la caracterización de la moléculas de interés haciendo uso de equipos RMN- H^1 y RMN- C^{13} , estos servicios fueron subcontratados a la Universidad de Valle debido a que el grupo de investigación de productos naturales de la Universidad Icesi no posee acceso a estos equipos.

2.4.11 Análisis de azúcar encontrado

Durante el proceso de filtración con algodón en 2.4.4 extracción, se obtuvo la cristalización de algún tipo de azúcar (figura 17) , lo cual resultó de interés y se decidió analizar la composición de estos cristales. El análisis se realizó por cromatografía líquida en acople con un detector de dispersión de luz evaporativo, donde se inyectaba la muestra encontrada y el cromatograma obtenido se comparaba con el cromatograma de estándares de azúcares inyectados previamente en el equipo en condiciones iguales. Se uso como referencia las

condiciones de estudio de azúcares en melaza sugerido por el fabricante del equipo, Waters (Waters Corporation, 2009). Se usaron estándares de Xilosa, Fructosa, Sacarosa, Glucosa y Xilitol y el experimento se levó a cabo en las condiciones mostradas en las tablas 5 y 6.



Figura 17. Cristales de composición desconocida obtenidos durante el proceso de filtración.

| | | | |
|-----------------------------|--|---------------------------------|---------|
| Equipo | UPLC WATERS con detector ELSD | | |
| Columna | ACQUITY UPLC BEH amide 2.1 x 100 mm, 1.7 | | |
| Fase móvil B | 80:20 ACN:AGUA con 0.2% TEA (Trietilamina) | | |
| Fase móvil A | 30:70 ACN:AGUA con 0.2% TEA (Trietilamina) | | |
| Flujo | 0.3 mL/min | | |
| Método | Isocratico; 90% de B y 10% de A | | |
| Volumen de inyección | 2 uL | Concentración estándares | 1 mg/ml |

| | | | |
|----------------------------------|---------|--------------------------|--------|
| Concentración de muestra | 5 mg/ml | Tiempo de corrida | 12 min |
| Temperatura de la columna | 35°C | | |

Tabla 5. Condiciones UPLC para análisis de azúcares.

| Condiciones ELSD | |
|--------------------------------|---------|
| Gain | 200 |
| Presión | 40 psi |
| Drift tuve temperatura: | cooling |
| Data rate: | 10 pps |

Tabla 6. Condiciones detector ELSD para análisis de azúcares.

2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.5.1 Tratamiento de muestra y extracción

En el primer paso de la metodología (2.4.2) se realizó la toma de la muestra, para esto se obtuvo una muestra de carbón de las torres de decoloración de Manuelita S.A. La torre de la cual se tomó la muestra llevaba ya varios ciclos de decoloración, según informó el personal encargado. Con esto se aumenta la probabilidad de encontrar moléculas que aportan color al jugo de caña y son removidas en estas torres.

El carbón animal es un material con gran superficie de contacto que permite retener moléculas por interacción física o exclusión de tamaño, este método puede llegar a retener del 15 al 30% de moléculas coloridas en el jugo de caña. Sin embargo, el carbón no es un método selectivo, ya que retiene cualquier tipo de molécula que entre en contacto en la zonas de adsorción, lo cual dificulta los procesos de purificación (Chen, 2006).

Debido a que la muestra fue tomada directamente de la torre de decoloración, también se recogió gran cantidad de jugo de caña que contenía diferentes azúcares, en su mayoría sacarosa. Para remover estos azúcares, se realizaron varios lavados con agua utilizando un recipiente que regularmente es usado para dispensar agua destilada. Primero se agregó muestra de carbón húmeda (por el jugo de caña) hasta la mitad del recipiente, luego se terminó de llenar con agua y se agitó mecánicamente para favorecer la solubilización de azúcares en el agua. Por último se abrió el válvula inferior del recipiente para dejar salir el agua con azúcares disueltos que se recolectaban en un recipiente. Se situó algodón en la salida del agua para evitar que parte del carbón escapara con el agua. Este proceso se realizó en repetidas ocasiones para eliminar la mayor cantidad de sacarosa y demás azúcares presentes en la muestra. Existe la probabilidad de que algunas moléculas que aportan color al jugo de caña hayan sido eliminados por los lavados con agua, sin embargo, varias de estas moléculas como flavonoides han reportado bibliográficamente baja solubilidad en agua.

Una vez retirada la mayor cantidad de sacarosa mediante los lavados, se tomó el carbón del recipiente y se llevó a tres erlenmeyers de 5 litros; a cada Erlenmeyer se le agregó aproximadamente 2 litros de Metanol:Acetato de Etilo (1:1) y se dejó

en reposo 48 horas. Pasadas la 48 horas, se observó que la mezcla de solventes paso de ser translúcida a un color amarillo que se evidencia en la figura 10, con lo que se puede concluir que las moléculas coloridas fueron solubilizadas en este medio. Posteriormente, se filtraron los solventes para separarlos de su matriz inicial (carbón) y para ser llevados al rotovaporador, sin embargo, en este proceso de filtración se obtuvieron unos cristales translúcidos que se aprecian en la figura 17.

2.5.2 Cristales de azúcares obtenidos en la extracción.

Durante la extracción de moléculas de interés haciendo uso de solventes (acetato de etilo : metanol) se obtuvo cristales blancos y dulces. Este residuo resultó de gran interés debido a que en pasos anteriores se realizaron lavados con gran cantidad de agua, lo que debió haber removido la mayor parte de azúcares, o por lo menos la sacarosa, teniendo en cuenta que la solubilidad de la sacarosa es de 2,1 g/ml (drugbank). En ese orden de ideas, se consideró la posibilidad de que estos cristales estuviesen constituidos por cantidades significantes de azúcares diferentes a la sacarosa (ej. Xilitol) y en grandes proporciones, lo que resultaría de gran interés para la industria azucarera.

Estos cristales se analizaron por UPLC-ELSD siguiendo una metodología establecida por el fabricante del equipo para análisis de azúcares en melazas y se comparó con estándares de azúcares que podrían estar presentes (Waters Corporation, 2009). Se obtuvieron los siguientes cromatogramas de los estándares y la muestra:

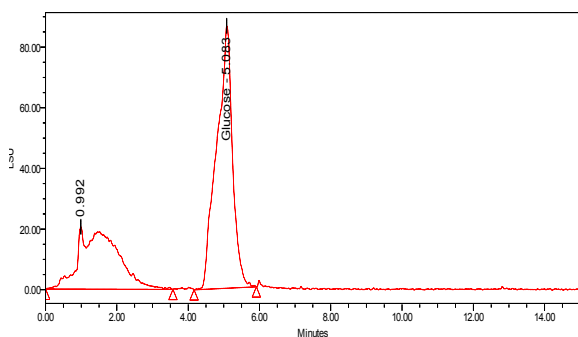


Figura 18. Cromatograma obtenido para el estándar de glucosa.

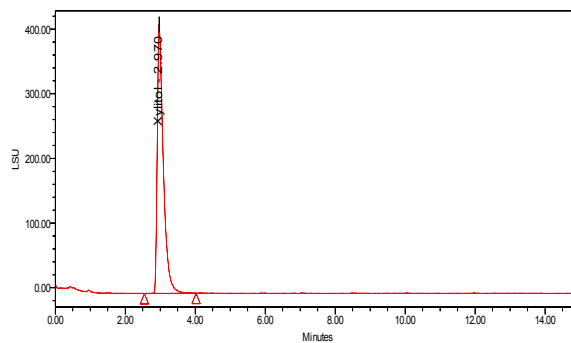


Figura 19. Cromatograma obtenido para el estándar de Xilitol.

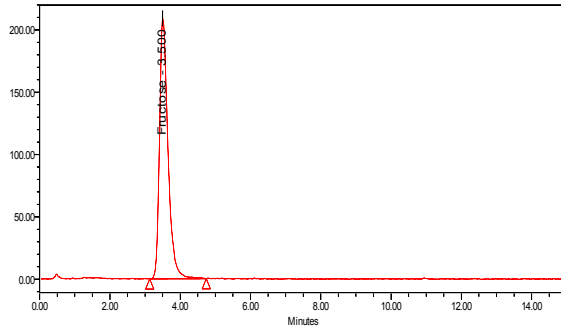


Figura 20. Cromatograma obtenido para el estándar de Fructosa.

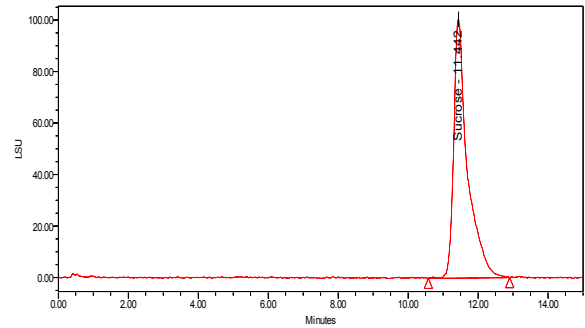


Figura 21. Cromatograma obtenido para el estándar de sacarosa.

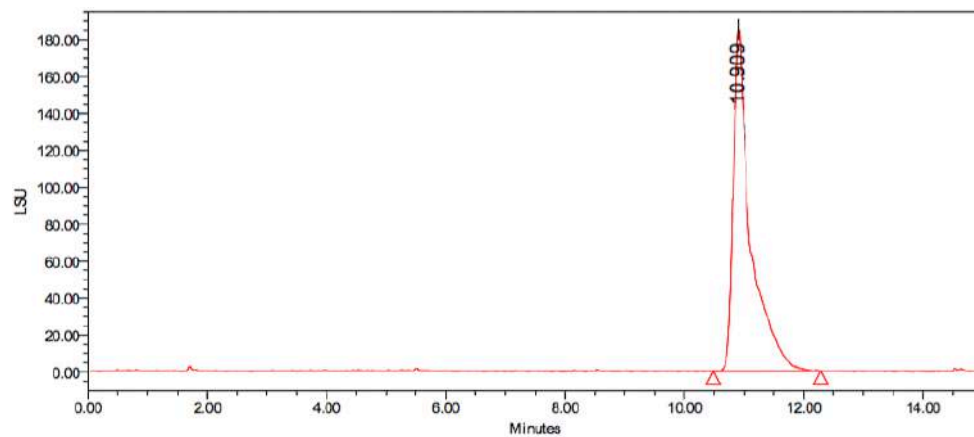


Figura 22. Cromatograma obtenido para la muestra de cristales de azúcares.

Los cromatogramas de los estándares difieren de los cromatogramas obtenidos por el fabricante en el análisis usado como guía, esto puede atribuirse a que la columna usada por el fabricante es mas corta, lo que afecta el tiempo de retención. Además, los azúcares usados en este análisis como estándar no garantizaban ser de gran pureza, lo que también afecta los cromatogramas obtenidos.

El análisis fue mas de tipo cualitativo, ya que inicialmente solo se quería saber la presencia de azúcares diferentes a la sacarosa, en caso de encontrarlas, se procedía a la cuantificación de los mismos. Como se aprecia en la figura 22, la muestra tuvo un tiempo de retención de 10,9 minutos, muy similar al tiempo de retención de la sacarosa (11,4 minutos según figura 21) y muy lejano a los demás estándares, lo cual lleva a concluir que estos cristales están compuestos en mayor parte por sacarosa y que la cantidad de agua usada en la etapa de lavado no fue suficiente.

2.5.3 Liofilización

Una vez analizado la sacarosa remanente, se continuó con el proceso de la muestra inicial, donde se utilizó el rotovaporador para eliminar los solventes usados en la extracción y obtener un concentrado de moléculas de interés. Sin embargo, se obtuvo gran cantidad remanente de agua, posiblemente de los lavados iniciales, el cual no se pudo eliminar por el rotovaporador ya que se requiere generar un alto vacío y la bomba usada por este equipo no era lo suficientemente potente.

Por lo anterior, se decidió usar el equipo liofilizador Leyela para eliminar el remanente de agua por medio de secado por sublimación y obtener un extracto sólido. Primero se llevó al módulo de refrigeración para enfriar la muestra hasta -60 °C y luego se expuso a vacío para llevar a cabo la sublimación del agua, obteniendo como resultado 133 gramos de un extracto sólido de color amarillo pálido (figura 23).



Figura 23. Extracto liofilizado obtenido por sublimación.

A este extracto se le realizó una prueba cualitativa de Shinoda para probar si había o no presencia de flavonoides y una TLC específica para flavonoides C-glicósidos y los resultados se presentan a continuación.

2.5.4 Prueba de Shinoda para flavonoides.

Cuando se exponen los flavonoides con núcleo benzopirona a una solución acuosa o alcohólica con limaduras de magnesio y HCl concentrado, se produce una coloración rojiza en la solución. En la figura 24 se observa el resultado de

prueba de Shinoda realizada al extracto liofilizado, al lado derecho se tiene el testigo el cual solo posee la muestra en solución alcohólica para fines comparativos. Por otro lado, en el tubo de la izquierda vemos la prueba de Shinoda con una coloración rojiza indicando ser positivo para flavonoides.



Figura 24. Prueba de Shinoda en Extracto Liofilizado.

Con el resultado de esta prueba se puede concluir que hay presencia de flavonoides con núcleo benzopirona.

2.5.5 Análisis de cromatografía planar para flavonoides c-glicósidos

En contraste con la prueba de Shinoda, los resultados para esta prueba cualitativa para flavonoides C-glicósidos fueron negativos. Al realizarse la cromatografía en capa delgada no se observó ninguna banda, lo cual lleva a concluir que a pesar que en la muestra hay presencia de flavonoides, estos no son de tipo c-glicósido.

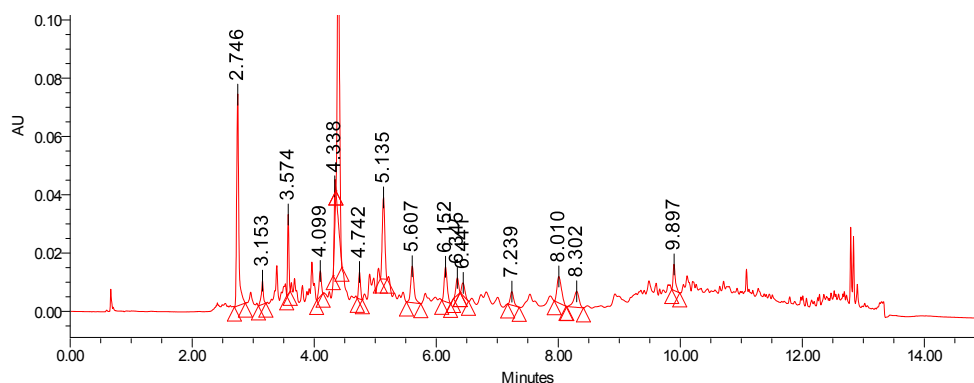
El término c-glicósido se le atribuye a que la glicosilación o unión con la molécula de azúcar se da por un enlace carbono-carbono. A pesar de los resultados negativos en esta prueba no se puede descartar la presencia de flavonoides con glicosilaciones de tipo O-glicosídico, S-glicosídico o N-glicosídico.

2.5.6 Análisis por cromatografía líquida

Haciendo uso del equipo UPLC de Waters en las condiciones expuestas en 2.4.8 se realizó un análisis que se compara continuación con un estudio preliminar realizado en 2013 en una matriz de carbón similar a la usada en este proyecto.

| Compuesto Retenido | Resultados en 2016 | | Resultados en 2013 | |
|--------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------|-----------------------------|
| | Pico de Retención | Máximo de Absorción UV (nm) | Pico de Retención | Máximo de Absorción UV (nm) |
| 1 | Pico #6 | 284,5 | Pico #2 | 284,5 |
| 2 | Pico #8 | 277,7 / 308,3 | Pico #4 | 279,7 / 309,5 |
| 3 | Pico #10 | 323,8 | Pico #5 | 323,8 |
| 4 | Pico #12 | 279,7 | Pico #7 | 279,7 |

Tabla 7. Comparación de máximos de absorción UV obtenidos en compuestos de una matriz de carbón en el presente estudio contra resultados del estudio preliminar realizado en 2013 en otra matriz de carbón del mismo ingenio.



Peak Results

Name:

| | Name | RT | Area | Height | Amount | Units |
|---|------|-------|--------|--------|--------|-------|
| 1 | | 2.746 | 173090 | 72762 | | |

Figura 25. Cromatograma de extracto liofilizado obtenido por UPLC en 2016.

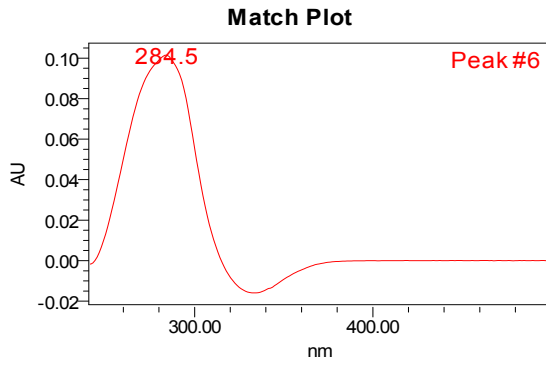


Figura 26. Espectro UV para la retención en 4.396 minutos(figura 24).

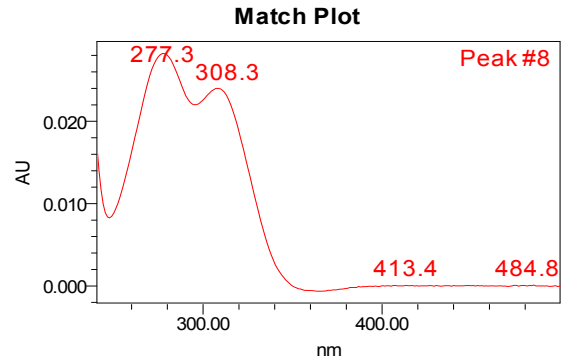


Figura 27. Espectro UV para la retención en 5.135 minutos(figura 24).

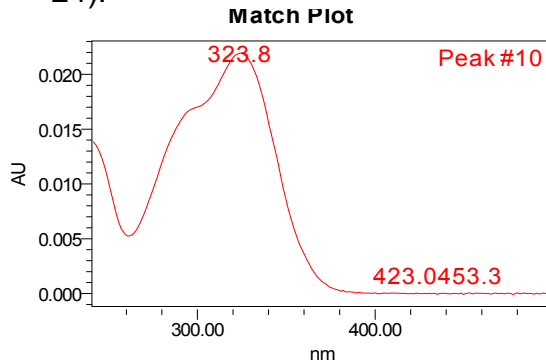


Figura 28. Espectro UV para la retención en 6.152 minutos(figura 24).

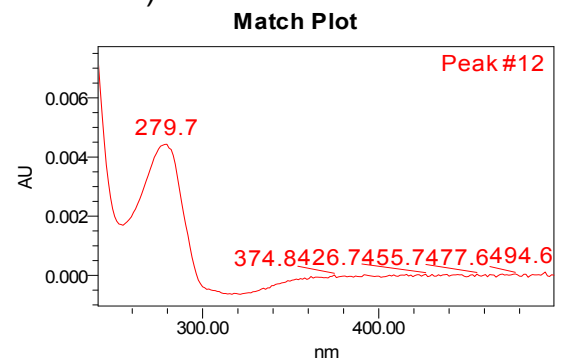


Figura 29. Espectro UV para la retención en 6.441 minutos (figura 24).

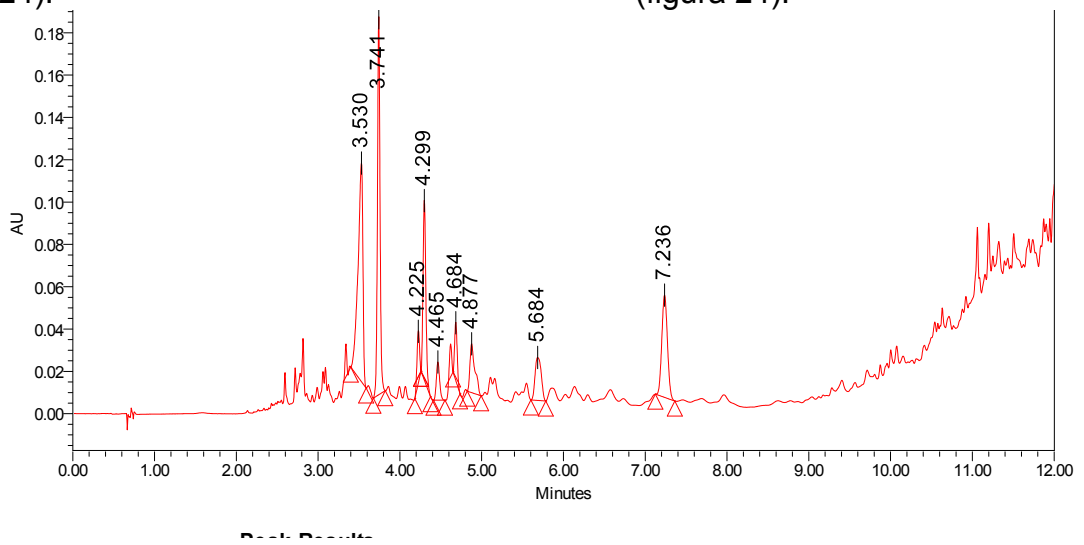


Figura 30. Cromatograma obtenido en 2013.

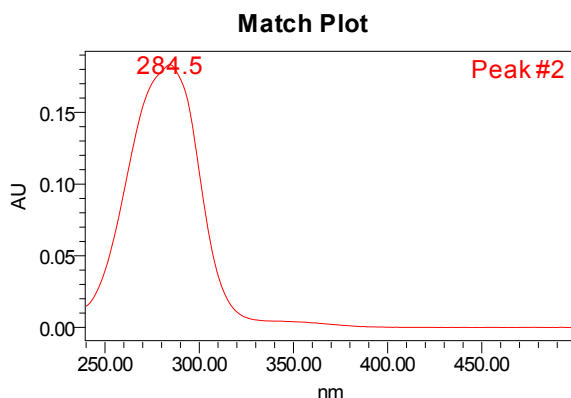


Figura 31. Espectro UV para la retención en 3.741 minutos (figura 29).

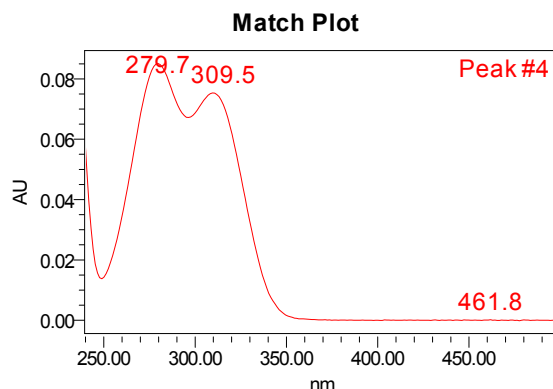


Figura 32. Espectro UV para la retención en 4.299 minutos (figura 29).

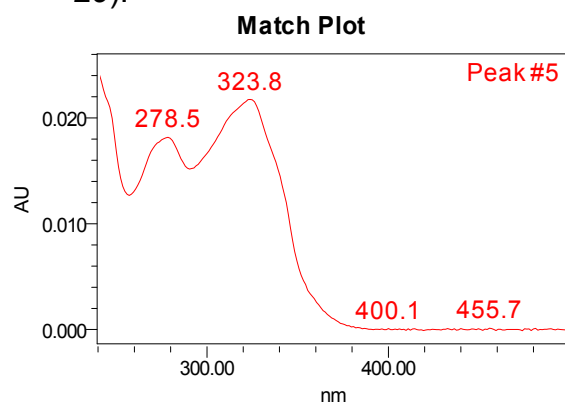


Figura 33. Espectro UV para la retención en 4.465 minutos (figura 29).

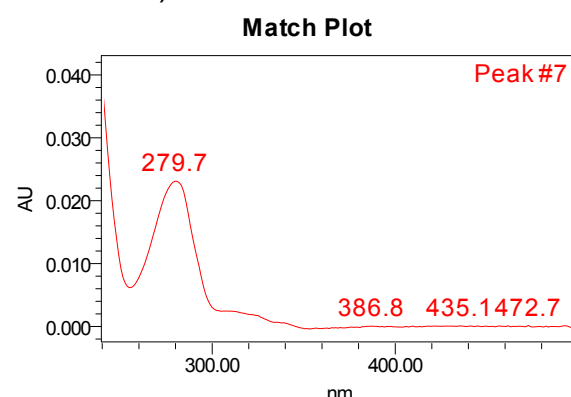


Figura 34. Espectro UV para la retención en 4.877 minutos (figura 29).

En el año 2013, el doctor en ciencias químicas y tutor de este proyecto Guillermo Montoya realizó una exploración preliminar, donde se tomó una matriz de carbón del mismo ingenio azucarero y también se analizó por cromatografía de ultra rendimiento, pero usando condiciones de análisis diferentes al proyecto actual (2016). A pesar que estos dos estudios se realizaron sobre condiciones, muestras y personal diferente, se tuvieron muchos resultados similares, por esto se decide comparar los resultados del presente estudio con dicha exploración preliminar. Los máximos de absorción UV se usan como punto de comparación entre ambos estudios ya que los tiempos de retención varían según la columna, el método usado y demás variables.

El pico de retención en mayor proporción para el análisis realizado en 2016 está en 4.396 minutos y presentó un máximo de absorción a 284.5 nm (figura 26), de igual forma, el pico de retención en mayor proporción en el estudio de 2013

presentó absorción a la misma longitud de onda (figura 31). A pesar que los picos de retención se dan a tiempos diferentes, se podría atribuir a la presencia de la misma molécula, ya que los estudios no fueron realizados exactamente en las mismas condiciones.

También se presentaron otras similitudes relevantes; como es el caso del pico de retención en 4.465 minutos en el estudio de 2013 y el pico de retención en 6.152 minutos en el estudio de 2016, donde ambos presentan la misma absorbancia en 323.8 nm (figuras 28 y 33). Del mismo modo, los picos en 4.877 minutos tomado en 2013 y 6.441 minutos tomado en 2016 presentan absorbancia en 279.7 nm. Esta absorbancia tan similar en ambos estudios brinda mayor seguridad respecto a la presencia de estas moléculas en muestras de carbón animal obtenidas en torres de decoloración de ingenio Manuelita S.A y descarta posibilidades de falsos positivos por contaminación en la manipulación de la muestra, contaminación por fermentación, entre otras. También, se debe tener en cuenta que los picos mencionados en la comparación mantienen el mismo orden de elución en ambos análisis.

Se debe tener en cuenta que las absorbancias también pueden variar un poco debido a variaciones de la matriz lo que puede favorecer resultados con algunas variaciones. Como es el caso del pico de retención en 4.294 minutos obtenido en 2013 que presentó absorbancias en 279.7 y 309.5 nm y el pico en 5.135 minutos obtenido en 2016 que presentó absorbancias en 277.3 y 308.3 nm, posiblemente se haya retenido moléculas muy similares que puedan variar en la unión con la molécula de azúcar.

La mayoría de los flavonoides presentan dos bandas de absorción ultravioleta; la primera se muestra entre 300 - 390nm y esta asociada con la porción cinamoilo de las moléculas, mientras que la segunda banda se evidencia en el rango de 250-280nm y esta asociada con la porción benzoilo de los flavonoides (Martínez, 2005). Sin embargo, pueden presentarse casos en donde solo se observe una banda ya que la porción Cinamoilo puede estar sustituida lo que conlleva a generar cambios o desaparición en una banda de absorción ultravioleta. Además, en los estudios anteriores no se analiza una sola molécula, sino grupos de moléculas similares, por lo que las bandas de absorción pueden superponerse y afectar los espectros obtenidos.

2.5.7 Purificación

En este proceso se utilizó el equipo Isolera Flash-One en las condiciones mencionadas en 2.4.9 y se obtuvo el cromatograma evidenciado en la figura 35.

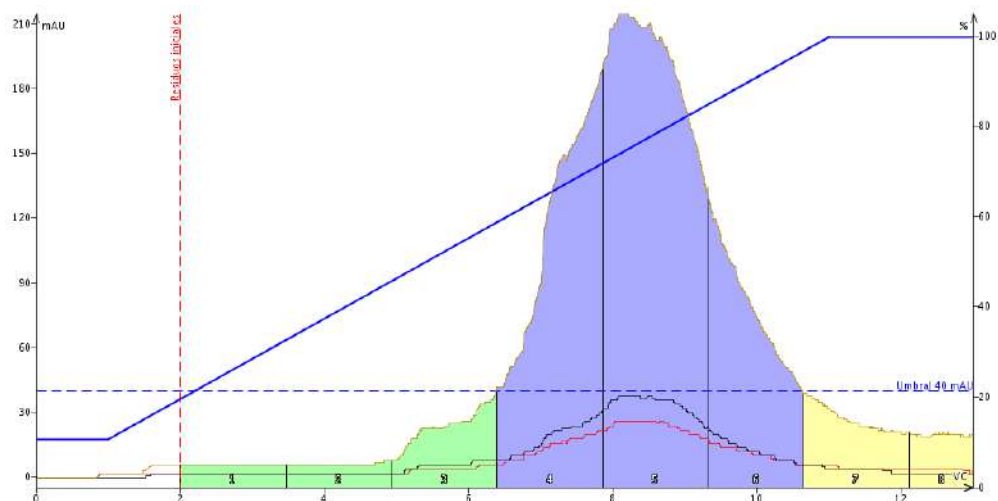


Figura 35. Cromatograma obtenido por Isolera Biotage® durante la purificación del extracto liofilizado.

El método utilizado para obtener el cromatograma de la figura 35 consistió en aplicar un gradiente de solventes (agua y metanol) e ir recolectando fracciones según su polaridad, primero se observa un periodo de acondicionamiento y posteriormente las fracciones recogidas separadas por colores. Durante el periodo de acondicionamiento, se usaron tres volúmenes de columna con 10% de metanol y 90% de agua, lo que corresponde al plano inicial de la línea azul. Cabe aclarar que un volumen de columna se refiere al volumen necesario para llenar la columna con solvente por una vez, por lo tanto, tres volúmenes de columna serían tres veces el volumen que puede contener la columna.

Después del periodo de acondicionamiento, se inició un gradiente con 10 volúmenes de columna, iniciando con 10% metanol y 90% agua hasta llegar a 100% metanol. Este gradiente se evidencia en el cromatograma como la pendiente representada por la línea azul. Al realizar este gradiente se recolectaron las fracciones 1, 2, 3 de color verde y las 4, 5, 6 de color morado.

Por último, se realizó un periodo de lavado con dos volúmenes de columna usando solamente metanol, para eluir las moléculas que continuaban retenidas en las columna. Durante este periodo se recolectaron la fracciones 7 y 8 de color amarillo en el cromatograma.

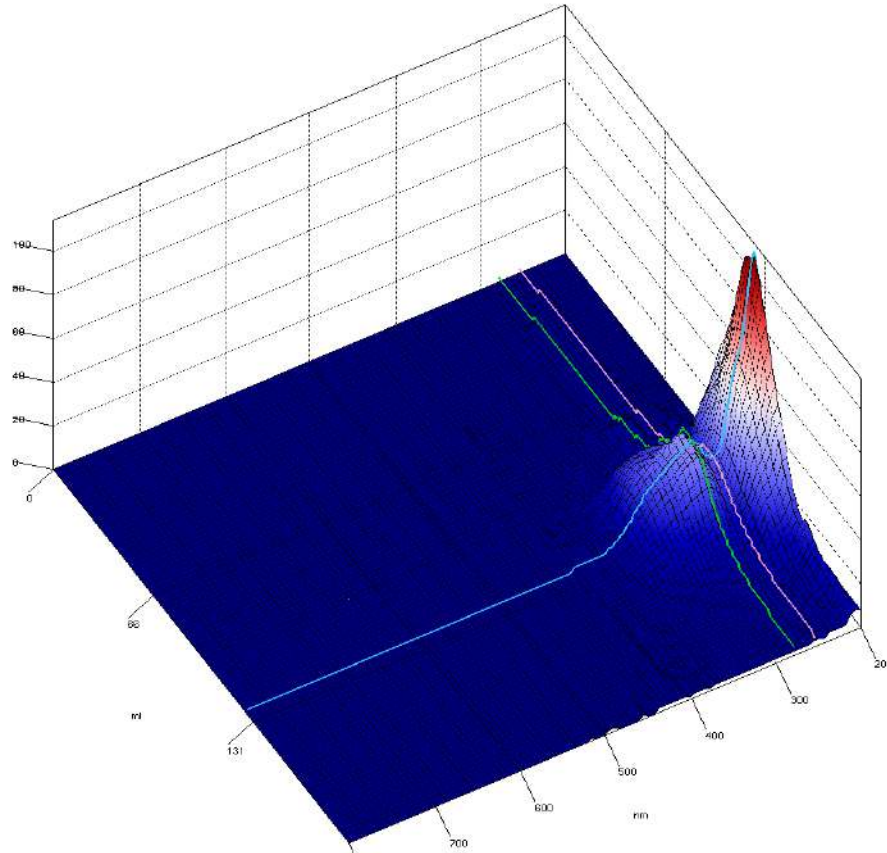


Figura 36. Espectro UV obtenido por Isolera Biotage® durante la purificación del extracto liofilizado.

El cromatógrafo usado está acoplado a un detector UV, lo que permite realizar un barrido y obtener las longitudes de los máximos de absorción de cada grupo de moléculas que van saliendo de la columna. Este cromatógrafo genera gráficos como el de la figura 36; donde se puede observar una línea azul clara que representa el flujo continuo de solvente en mililitros, también se ven líneas que representan una longitud de onda específica previamente definida, para este caso se usó 280 nm (línea verde) y 254 nm (línea rosada).

En la gráfica se pueden apreciar dos picos significativos, el primero es bastante ancho ya que posiblemente varias moléculas similares están presentando un máximo de absorbancia muy cercano entre ellas y se solapan formando este pico ancho. El segundo pico es mucho mas grande, sin embargo no es de mucho interés, debido a que representa las moléculas que salen de la columna en el periodo de lavado.

En consecuencia, se tomaron las fracciones 4,5 y 6 para seguir con la caracterización ya que representan un gran potencial de análisis por sus máximos de absorción similares a flavonoides y una cantidad significativa.

2.5.8 Caracterización por resonancia magnética nuclear

Las fracciones recolectadas en el ítem anterior fueron llevadas a rotovaporación para eliminar la mayor cantidad de solvente usado, en este caso metanol y agua. Al igual que en la extracción, fue necesario liofilizar la muestra ya que se eliminó el metanol pero se obtuvo un remanente de agua.

Una vez liofilizada la muestra purificada, se subcontrató el servicio de análisis por resonancia magnética nuclear protónica (RMN- H^1) a la Universidad Del Valle y se obtuvo el siguiente espectro:

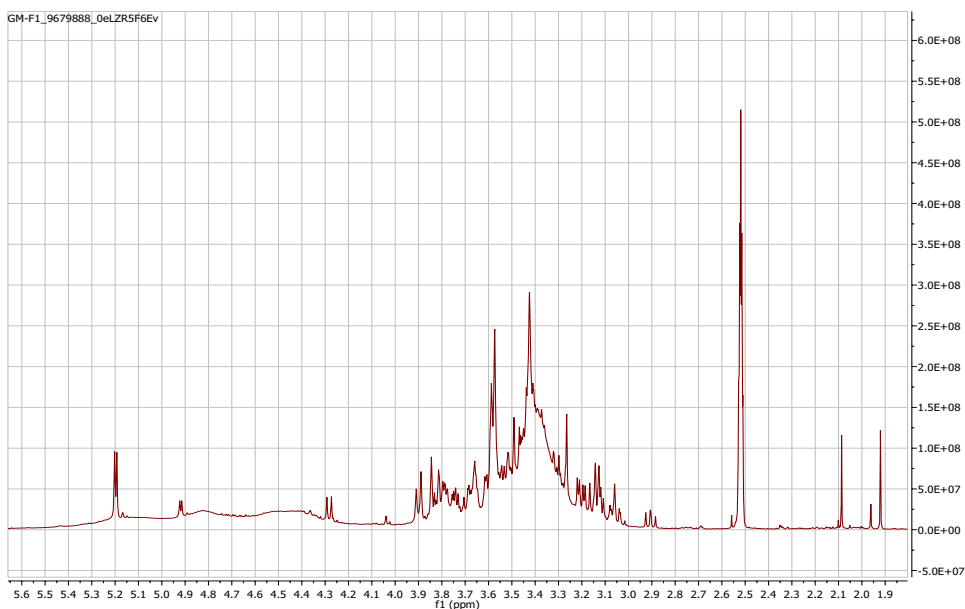


Figura 37. Espectro RMN de Extracto Purificado y Liofilizado.

Lastimosamente, no se pudo elucidar o llegar a alguna conclusión contundente respecto a la estructura química de moléculas presentes en el extracto, ya que se evidencia la presencia de demasiadas moléculas en la muestra. A pesar del trabajo de purificación realizado, la muestra posee muchas moléculas con gran similitud estructural, lo que dificulta en gran medida llegar al grado de purificación necesario para elucidar la estructura de algún compuesto. En este orden de

ideas, se decidió no realizar análisis de resonancia magnética nuclear de carbón (RMN-C¹³) ya que se obtendría un espectro similar y sería malgastar recursos.

Sin embargo, se pueden observar gran cantidad de picos entre 3.0 y 3.9, que según fuentes bibliográficas, pueden atribuirse a protones que hacen parte de azúcares, si se tiene en cuenta que la matriz usada para la extracción está expuesta a grandes cantidades de azúcares es muy probable que los flavonoides estén glicosilados. A pesar que se comprobó que no hay existencia de C-glicosidos en la muestra, es posible que los flavonoides presentes sean O-glucosídico, S-glicosídico o N-glucosídico. (Martínez, 2005)

2.7 CONCLUSIONES

- Se desarrolló una metodología que permitió extraer moléculas que aportan color al jugo de caña, partiendo de una matriz de carbón activado usado en el proceso de decoloración de un ingenio azucarero y haciendo uso de una mezcla 1:1 de Acetato de Etilo: Metanol.
- Se determinó por medio de cromatografía líquida (UPLC) que los cristales obtenidos durante el proceso de extracción estaban compuestos en gran mayoría por sacarosa.
- Se obtuvieron 133 gramos de extracto liofilizado con gran contenido de flavonoides a partir de aproximadamente 10 kg de muestra de carbón activado.
- Por medio de la prueba cualitativa de Shinoda se determinó la presencia de flavonoides con núcleo benzopirona, tales como Flavonas, Flavononas, Flavononoles, Rotenoides e Isoflavonas en el extracto previamente liofilizado.
- Se compararon los resultados obtenidos en el equipo UPLC con los resultados de una exploración preliminar obtenida en 2013, después de analizarlos, se encontró gran similitud entre los cromatogramas y espectros UV de ambos estudios. Con esto se concluye que hay existencia de flavonoides en muestras de carbón activado de torres de decoloración y que los resultados no son falsos positivos ocasionados por algún tipo de contaminación.

2.8 RECOMENDACIONES

- Se debe realizar la estandarización de una metodología para extraer flavonoides a partir de una matriz de carbón activado, para evitar algunos inconvenientes reportados durante la realización de este proyecto, como la cristalización de azúcares en la etapa de extracción.
- Es de gran importancia establecer una metodología para separar y purificar flavonoides presentes en extractos de carbón activado usado en torres de decoloración de ingenios azucareros, ya que este fue el principal inconveniente que impidió alcanzar los objetivos de este proyecto.
- El uso de resonancia magnética nuclear protónica (RMN- H^1) y de carbón (RMN- C^{13}) es de gran ayuda para realizar la elucidación de estructuras presentes en una muestra, siempre y cuando dicha muestra se encuentre debidamente purificada.
- Se debe tener en cuenta que los extractos liofilizados obtenidos en este proyecto deben ser almacenados en condiciones de poca humedad (refrigeración) ya que captan fácilmente agua de la humedad del ambiente.

3. Bibliografía

Asocaña. (2013-2014). *Asocaña*. From <http://www.asocana.org/modules/documentos/10572.aspx>

Londoño, J. (2013). *DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA POR UPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES EN EL JUGO DE LA CAÑA DE AZÚCAR DURANTE LAS DIFERENTES ETAPAS DEL PROCESO DE FABRICACIÓN DE AZÚCAR*. universidad Icesi, ciencias quimicas, cali, colombia.

Aguilar-Rivera, N., Rodríguez Lagunes , A., & Castillo Morán, A. (2010). AZÚCAR, COPRODUCTOS Y SUBPRODUCTOS EN LA DIVERSIFICACIÓN DE LA AGROINDUSTRIA DE LA CAÑA DE AZÚCAR. *virtual pro* , 1-28.

Tascon Romero, A. M. (2013). *DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ACONÍTICO EN EL JUGO DE CAÑA DE AZÚCAR* . universidad Icesi, Ciencias Químicas, Cali, Colombia.

Subiros Ruiz, F. (2000). *El cultivo de la caña de azucar*. San jose, Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia .

Barnes, A. C. (1964). *The Sugar Cane*. New york: Interscience Publishers inc.

Beyer, H., & Walter, W. (1987). *Manual de Química Organica* . Barcelona: Reverté SA.

Chen, J. C. (2006). *Manual del Azucar de Caña*. Mexico DF: Noriega Editores.

Duarte-Almeida , J. M., Negri, G., De Carvalho , J. E., & Salatino, A. (2007). Antiproliferative and antioxidant activities of a tricin acylated glycoside from sugarcane (*Saccharum officinarum*) juice. *Phytochemistry* , 1165–1171 .

Zapata Gil, N. J. (2007). *ACONITIC ACID FROM SUGARCANE: PRODUCTION AND INDUSTRIAL APPLICATION* . Louisiana State University , Lousiana.

VÁSQUEZ, E. V. (2014). *SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE UN MATERIAL POLIMÉRICO A PARTIR DEL ÁCIDO TRANS-ACONÍTICO* . universidad icesi, ciencias quimicas, cali.

Ji-yonga, S., Xiao-boa, Z., Jie-wena, Z., b, M. H., Kai-lianga, W., & Xuea, W. (2012). Determination of total flavonoids content in fresh Ginkgo biloba leaf with different colors using near infrared spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* , 271–276.

Montoya, G. L. (2014). *Guías de laboratorio farmacognosia y fitoquímica*. Universidad Icesi, Ciencias Farmaceuticas, Cali.

Biotage. (2012). *Flash chromatographic isolation and characterization of organic molecules using advanced λ -All detection with full range photo-diode array analysis*. EEUU.

Arango, C. L., Jaramillo, E. G., & Durango, E. O. (2012). *MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA I*. universidad de antioquia, medellin.

Estévez, A. A. (2002). *Características agronómicas y de productividad de la variedad Cenicaña Colombia (CC) 85-92*. Cenicaña, Valle del cauca.

Waters Corporation. (2009). Acquity UPLC BEH amide columns. *Application Notebook*, 10.

drugbank. (n.d.). *DrugBank database*. Retrieved 8 de mayo de 2016 from DrugBank database: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB02772>

Wargner, H., & Blandt, S. (2009). *Plant Drug Analysis*. Springer.

Martínez, A. (septiembre de 2005). FLAVONOIDES. medellin, colombia: Universidad de Antioquia.