

**Aislamiento y purificación de esteroides a partir de los residuos de las torres  
de decoloración del ingenio manuelita**

**Luisa María Betancourth Gil**

**UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS  
SANTIAGO DE CALI, COLOMBIA  
2017**

**AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ESTEROLES A PARTIR DE LOS  
RESIDUOS DE LAS TORRES DE DECOLORACIÓN DEL INGENIO MANUELITA**

**LUISA MARÍA BETANCOURTH GIL**

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE QUÍMICO  
FARMACÉUTICO**

**Tutor de investigación**

**GUILLERMO LEÓN MONTOYA PELÁEZ, PhD.**

**UNIVERSIDAD ICESI**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

**SANTIAGO DE CALI, COLOMBIA**

**2017**

**APROBADO POR:**

---

(Nombre correspondiente)

Evaluador externo

---

Guillermo León Montoya PhD

Director del proyecto

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco primero a Dios por permitirme llegar hasta donde estoy hoy, a mi familia: mi madre, mi hermano y mis tías por apoyarme incondicionalmente y guiarme por el mejor camino.

Agradezco a María Cristina Navia, por ayudarme a comprender que soy capaz de lograr todo lo que me proponga y por apoyarme en buenos y malos momentos a lo largo de toda mi carrera. Y en general a la oficina de Bienestar Universitario por su apoyo incondicional.

Al profesor Guillermo León Montoya, quien me ha impulsado a hacer las cosas con amor y de la mejor manera posible y por guiarme, no solo a lo largo del desarrollo de este proyecto, sino en el ámbito académico y personal.

A la Universidad Icesi y a todos sus profesores, por formarme como una profesional íntegra y capaz y por brindarme todos los materiales necesarios para llevar a cabo este proyecto.

Finalmente, agradezco a mis amigos quienes han estado presentes durante toda mi carrera y han sido de gran apoyo para mí.

## TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	4
Lista de Figuras .....	7
Lista de tablas .....	8
RESUMEN DEL PROYECTO .....	9
ABSTRACT .....	10
1. INTRODUCCIÓN .....	11
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO .....	12
2.1 Planteamiento del problema .....	12
2.2 MARCO DE REFERENCIA Y ESTADO DEL ARTE .....	13
2.2.1 Historia e impacto del sector azucarero en la región .....	13
2.2.2 Subproductos obtenidos de la caña de azúcar .....	13
2.2.3 Proceso de elaboración y refinación del azúcar .....	14
2.2.4 Proceso de decoloración .....	14
2.2.5 Los fitosteroles y sus características estructurales y farmacológicas .....	15
2.3 OBJETIVOS .....	20
2.3.1 Objetivo general .....	20
2.3.2 Objetivos específicos .....	20
2.4 METODOLOGÍA REALIZADA .....	21
2.4.1 Matriz de marco lógico .....	21
2.4.2 Recolección de la muestra .....	22
2.4.3 Extracción de compuestos aromáticos en la planta semi piloto. ....	22
2.4.4 Identificación y determinación del compuesto presente en mayor proporción. ....	22
2.4.5 Separación por Cromatografía al vacío (cromatografía flash) .....	23
2.4.6 Fraccionamiento de los compuestos apolares y medianamente polares en Isolera Flash One Biotage®. ....	23
2.4.8 Purificación por cromatografía preparativa .....	23
2.4.9 Caracterización .....	24
2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	24
2.5.1 Recolección de muestra, extracción y rotaevaporación del extracto obtenido a partir de la matriz de carbón activado .....	24
2.5.2 Identificación de los compuestos aromáticos a separar por sus características de polaridad y su separación. ....	25

2.5.3 Cromatografía al vacío (cromatografía flash) .....	26
2.5.4 Determinación de la fase móvil indicada para el proceso de cromatografía en columna automatizada y fraccionamiento de compuestos en Isolera Flash One Biotage® .....	28
2.5.5 Cristalización .....	31
2.5.6 Purificación de moléculas por cromatografía planar preparativa .....	33
2.5.7 Caracterización por cromatografía de gases acoplada a masas. ....	34
2.6 CONCLUSIONES.....	40
2.7 RECOMENDACIONES.....	41
2.8 REFERENCIAS.....	42

## Lista de Figuras

Figura 1: Esquema del proceso de decoloración del azúcar crudo. Tomado de: (CENICAÑA, 2003) .....	15
Figura 2. Estructura del ciclopentano-perhidrofenantreno. ....	16
Figura 3. a. Unidad isoprenica y b. Biosíntesis de esteroides en plantas. ....	16
Figura 4. Ciclación concertada para la formación del cicloartenol en plantas (Martínez A. , 2002). ....	17
Figura 5. Reacción de oxidación fotoquímica en esteroides (Martínez A. , 2002). ..	18
Figura 6. Efectos de los esteroides en la disminución del colesterol (Oliver A, 2005) .....	19
Figura 7. Planta de extracción semi-piloto PSE solutions.....	25
Figura 8. Cromatografía planar derivatizada con vainillina-ácido sulfúrico, desarrolladas en una mezcla de solventes hexano: acetato de etilo (9:1).....	26
Figura 9. Proceso de cromatografía al vacío. ....	26
Figura 10. Fracciones obtenidas una vez se desarrolló la cromatografía al vacío.	27
Figura 11. Cromatografía planar desarrollada a partir de las fracciones obtenidas derivatizada con vainillina-ácido sulfúrico, desarrolladas en una mezcla de solventes hexano: acetato de etilo (9:1).....	27
Figura 12. Isolera Flash One Biotage®.....	28
Figura 13. Desarrollo de la cromatografía en columna automatizada.....	30
Figura 14. Cromatograma obtenido en el Isolera Flash One Biotage ® durante el fraccionamiento de compuestos. ....	30
Figura 15. Cromatografía planar desarrollada a partir de las fracciones obtenidas vista bajo luz ultravioleta a una longitud de onda larga (365 nm) (a) y a una onda corta (254 nm) (b). Derivatizada con vainillina-ácido sulfúrico (c), desarrolladas en una mezcla de solventes hexano: acetato de etilo (6,5:3,5). ....	31
Figura 16. Esquema del proceso de cristalización.....	32
Figura 17. Cromatografía planar vista bajo luz ultravioleta a una longitud de onda larga (365 nm) (a) Derivatizada con vainillina-ácido sulfúrico (b). Desarrolladas en una mezcla de solventes hexano: acetato de etilo (9:2:0,5). ....	32
Figura 18. Cromatografía planar vista bajo luz ultravioleta a una longitud de onda corta (254 nm) (a) y a una onda larga (365 nm) (b). Derivatizada con vainillina-ácido sulfúrico (c), desarrolladas en una mezcla de solventes tolueno: cloroformo: metanol (40:40:10). ....	33
Figura 19. Purificación de compuestos por cromatografía preparativa. ....	34
Figura 20. Estructura química del ergost-5-en-3-ol (3 beta). ....	35
Figura 21. Estructura química del stigmasta-5,22-dien-3-beta-ol.....	35
Figura 22. Estructura química del stigmasta-5-en-3-ol. ....	35
Figura 23. Cromatograma obtenido a partir del desarrollo cromatográfico llevado a cabo en el proceso de cromatografía de gases acoplada a masas. ....	36
Figura 24. Espectro de masas obtenido experimentalmente para ergost-5-en-3-ol (3 beta).....	36
Figura 25. Espectro de masas teórico del ergost-5-en-3-ol (3 beta).....	36

Figura 26. Esquema de la fragmentación del ergost-5-en-3-ol (3 beta) para generar el pico base en 43. ....	37
Figura 27. Espectro de masas obtenido experimentalmente para stigmasta-5,22-dien-3-beta-ol. ....	37
Figura 28. Espectro de masas teórico del stigmasta-5,22-dien-3-beta-ol. ....	37
Figura 29. Esquema de la fragmentación del stigmasta-5,22-dien-3-beta-ol para generar el pico base en 55. ....	38
Figura 30. Espectro de masas obtenido experimentalmente para stigmasta-5-en-3-ol. ....	38
Figura 31. Espectro de masas teórico del stigmasta-5-en-3-ol. ....	38
Figura 32. Fragmentaciones características de los esteroides previamente elucidados (Martínez A. , 2002). ....	39

### Lista de tablas

Tabla 1. Condiciones para la separación de compuestos presentes en el extracto de carbón activado. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Tabla 2. Condiciones de gradiente para la separación de compuestos presentes en el extracto de carbón activado. ....	29
Tabla 4. Características estructurales de las moléculas elucidadas. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>

## RESUMEN DEL PROYECTO

La industria azucarera en Colombia es una de las bases de la economía en el Valle del Cauca, la producción de azúcar con altos estándares de calidad es uno de los aspectos que caracteriza a esta región. Sin embargo, es importante mencionar que a partir de la caña de azúcar no solo es posible obtener azúcar refinada; sino, también alcohol y otros compuestos orgánicos tales como, flavonoides, triterpenos y esteroides. Estos compuestos han sido analizados recientemente, debido a que en la actualidad se desea optimizar el aprovechamiento de recursos, con el objetivo de minimizar en gran medida la producción de desechos y la contaminación del medio ambiente.

Durante este proyecto se llevó a cabo una metodología con el fin de obtener información de las moléculas presentes en mayor proporción en la matriz de carbón activado proveniente del Ingenio Manuelita y utilizado para llevar a cabo el proceso de decoloración del azúcar. Para esto se realizó en primera medida una desorción haciendo uso de la planta de extracción semipiloto de la Universidad Icesi. A continuación, se llevó a cabo su purificación haciendo un seguimiento por medio de cromatografía planar (TLC) de los compuestos que se encontraban en mayor proporción, una vez identificados, se hizo uso de las técnicas de cromatografía en columna automatizada y cromatografía preparativa para culminar el proceso de purificación. Finalmente, se realizó la caracterización de los compuestos purificados por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

En relación con los resultados obtenidos una vez realizada la purificación, se realizó una comparación de los espectros de masas obtenidos con la librería NIST 11 y se encontraron tres moléculas con más del 90% de similitud, que son esteroides con estructuras químicas similares, por tanto se puede afirmar que en la matriz de carbón activado, obtenida de las torres de decoloración del Ingenio Manuelita se hallaron las siguientes moléculas: Ergost-5-en-3-ol, (3 beta), Stigmasta-5,22-dien-3-ol, (3 beta,22E) y Stigmast-5-en-3-ol.

**Palabras clave:** caña de azúcar, cisternas de decoloración, carbón activado, esteroides.

## ABSTRACT

The sugar industry in Colombia is one of the bases of the economy in Valle del Cauca, the production of sugar with high quality standards is one of the aspects that characterizes this region. However, it is important to mention that from sugar cane it is not only possible to obtain refined sugar; can also get, alcohol and other organic compounds such as flavonoids, triterpenes and sterols. These compounds have been recently analyzed, because currently it is desired to optimize the use of resources, with the aim of minimizing the production of waste and environmental pollution.

During this project, a methodology was carried out to obtain information about the molecules present in a greater proportion in the activated carbon matrix from the Manuelita sugar mill and used to carry out the process of sugar discoloration. To this purpose, a desorption was carried out using the semipilot extraction plant of the Icesi University. Then, it was carried out its purification by following through planar chromatography (TLC) of the compounds that were in greater proportion, once identified, it was used the techniques of automated column chromatography and preparative chromatography to complete the purification process. Finally, the characterization of the purified compounds was carried out by means of gas chromatography coupled to mass spectrometry.

In relation to the results obtained after the purification, a comparison of the obtained mass spectra with the NIST library was made and three molecules with more than 90% similarity were found, which are sterols with similar chemical structures, therefore it can be affirmed that in the matrix of activated carbon, obtained from the decolorization towers of the Manuelita, the following molecules were found: Ergost-5-en-3-ol, (3 beta), Stigmasta-5,22 -dien-3-ol, (3 beta, 22E) and Stigmast-5-en-3-ol.

**Keywords:** sugar cane, discoloration tanks, activated carbon, sterols.

## 1. INTRODUCCIÓN

El Valle del Cauca a lo largo de la historia ha sido ampliamente reconocido por la producción de azúcar y la gran cantidad de cultivos de caña de azúcar que hay alrededor de todo el departamento, que juega un importante papel en la economía de la región. Sin embargo, a partir de la caña de azúcar no solo es posible la fabricación de azúcar, ya que muchos de los mal llamados “residuos” son reutilizados por las industrias azucareras para la producción de otros subproductos tales como el etanol, que es producido a partir de la fermentación del jugo de la caña, además se tienen también subproductos tales como el bagazo, la melaza y la vinaza que tienen diferentes usos en esta industria.

Con el objetivo de lograr el máximo aprovechamiento de los residuos, en la actualidad se están realizando diferentes estudios de las moléculas presentes en los procesos llevados a cabo para la producción del azúcar y los derivados de la caña. Un ejemplo puntual son los esfuerzos en la recuperación no solo del ácido trans-aconítico actualmente obtenido a partir de la vinaza, sino también de los flavonoides encontrados dentro del licor del jugo de la caña y en la melaza, los cuales presentan propiedades antioxidantes y pueden ser de interés para la industria cosmética y de alimentos.

Otras moléculas reportadas en la caña de azúcar son los esteroides, que son “lípidos insaponificables, similares al colesterol presente en animales. Estas moléculas, consisten en un esqueleto esteroide y contienen un grupo hidroxilo en el carbono 3 del anillo A, además se caracterizan por tener una cadena ramificada de ocho o más átomos de carbono en el carbono 17 del anillo D” (Figura 2) (Cantrill, 2008). Estas moléculas son sintetizadas en las plantas por la ruta del mevalonato y han sido descritos más de 200 tipos de esteroides diferentes, pero los más abundantes son el sitosterol, campesterol y el estigmasterol, estos en la actualidad son ampliamente utilizados para lograr la disminución del colesterol en el cuerpo humano, debido a que evita la absorción en el intestino del colesterol (Oliver A, 2005).

Por tanto, este proyecto tiene como finalidad, dar información estructural acerca de los compuestos que se encuentren en mayor proporción en el extracto obtenido a partir de la matriz de carbón activado, proveniente de las torres de decoloración del ingenio Manuelita. Por lo cual, se llevó a cabo una metodología para la extracción de compuestos de naturaleza apolar (esteroides y similares) para tener una adecuada separación de los mismos para el proceso de purificación, se hizo uso de diferentes técnicas cromatográficas, como la cromatografía planar, la cromatografía automatizada en columna y la cromatografía al vacío. Una vez se alcanzó un nivel óptimo de purificación se realizó un análisis por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y comparación de los espectros obtenidos con la librería NIST versión 11 con lo cual se logró obtener la información estructural de algunos de los compuestos presentes en el extracto.

## 2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

### 2.1 Planteamiento del problema

Colombia se ha caracterizado por tener algunas de las mejores industrias azucareras a nivel mundial, el sector azucarero en el país se encuentra ubicado en el valle geográfico del río Cauca, que abarca 47 municipios desde el norte del departamento del Cauca, la franja central del Valle del Cauca, hasta el sur del departamento de Risaralda. En esta región hay 225.560 hectáreas sembradas en caña para azúcar, una de las industrias más destacadas es el Ingenio Manuelita, que se encuentra ubicado en el Valle del Cauca, este ha sido pionero de la industria azucarera en el país y se ha caracterizado por sus altos estándares de calidad y pureza en la producción de azúcares. De igual forma, esta industria se ha diferenciado por su gran contribución al desarrollo socioeconómico de la región, según investigaciones realizadas por el sector azucarero colombiano, gracias a la actividad manufacturera de los ingenios, se generan 265 mil empleos a través de toda la cadena de valor (ASOCAÑA, 2012).

No obstante, cuando se lleva a cabo el proceso de producción de azúcar, se generan muchos residuos que en la actualidad son un reto para las industrias, las cuales se esmeran en reducir al máximo su generación puesto que son una gran fuente de contaminación ambiental. En el país se producen más de 20 millones de toneladas de caña de azúcar por año para generar alrededor de 2,4 millones de toneladas de azúcar, produciéndose de esta manera 17,6 millones de toneladas de residuos que podrían ser reutilizados por diferentes industrias (Montoya, 2014). Es por esa razón que en los últimos años se han realizado diferentes estudios acerca de los subproductos que pueden obtenerse a partir de la caña de azúcar, estos pueden ser empleados en diferentes industrias, para contribuir con el cuidado del medio ambiente y con el desarrollo sostenible del país.

Con el enfoque principal de la contribución a dicho desarrollo sostenible del país, este proyecto tuvo como finalidad la extracción, purificación y posible caracterización de esteroides, con el fin (a largo plazo) de encontrar posibles usos de estas moléculas en la industria alimentaria o cosmética y de esta manera generar un aprovechamiento de los residuos producidos por el Ingenio Manuelita y por tanto disminuir la producción de desechos que contaminan el medio ambiente en el país. De esta manera, se encontró que además de los flavonoides que estaban reportados en la literatura como los compuestos que se encontraban en mayor proporción en la etapa de decoloración del azúcar, también se encontraban adsorbidos en la matriz de carbón activado, esteroides que hacen parte de los compuestos que aportan color al jugo de caña de azúcar. Para el desarrollo del trabajo, se hizo referencia a un estudio realizado con anterioridad, que tuvo como objetivo principal, comprobar la presencia de flavonoides en las cisternas de decoloración del ingenio Manuelita (Echeverry, 2016). Sin embargo, durante el desarrollo del presente trabajo, se encontró que los compuestos que se hallaban en mayor proporción en el extracto eran esteroides.

## **2.2 MARCO DE REFERENCIA Y ESTADO DEL ARTE**

### **2.2.1 Historia e impacto del sector azucarero en la región**

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), es una planta de la familia Poaceae procedente del sureste asiático, es conocida desde hace más de 500 años y ha sido ampliamente utilizada para la producción de azúcar y etanol. Esta especie es muy común en las zonas tropicales del mundo, y se cultiva ampliamente en Brasil, donde se considera la principal fuente de alcohol combustible, un sector industrial que está creciendo significativamente (Assuncao. J, 2008). Por su parte, el sector azucarero en Colombia tiene un gran impacto socioeconómico a nivel nacional e internacional, es importante mencionar que dicho sector está conformado por trece ingenios en total y que de acuerdo con los datos reportados por la organización internacional del azúcar (OIA), se dice que Colombia se encuentra ubicada en las primeras posiciones en la producción y exportación de azúcar en el mundo (ISO, 2016) lo que trae consigo grandes aportes a la economía del país. De igual forma, la excesiva producción de todos los materiales derivados de la caña de azúcar genera un aumento en la cantidad de empleos que se ofrecen en la región, así, según cifras del DANE “en 2007, 10 de los 13 ingenios azucareros emplearon de manera exclusiva para el trabajo en fábrica a 5.809 trabajadores”, cabe resaltar que el trabajo realizado en estas industrias es mejor remunerado en comparación con otras industrias manufactureras (FEDESARROLLO, 2010).

### **2.2.2 Subproductos obtenidos de la caña de azúcar**

Debido a la creciente preocupación de las industrias azucareras por los impactos negativos que afectan al medio ambiente, en la actualidad, estas industrias tienen gran interés en la reutilización de sus desechos. Esto con el fin de contribuir al cuidado y a la creación de un medio ambiente sostenible, por lo que se han venido desarrollando estudios para encontrar moléculas en los residuos y/o subproductos obtenidos por el sector azucarero que puedan ser de interés industrial. Es importante mencionar que la caña de azúcar es fuente de numerosos subproductos, que surgen en las diferentes etapas de fabricación, entre los que se encuentran; el etanol, y diferentes tipos de compuestos fenólicos.

Uno de los subproductos más estudiado es el jugo de la caña de azúcar, en este se han encontrado mayoritariamente compuestos fenólicos, dentro de los cuales se encuentran los fenilpropanoides y los flavonoides, siendo los principales representantes de estos últimos derivados de naringenina, tricina, apigenina y luteolina. Además, en otro estudio realizado con este mismo subproducto se encontró una molécula glucosídica con actividades antiproliferativas. (Duarte et al, 2010)

### 2.2.3 Proceso de elaboración y refinación del azúcar

El proceso de producción del azúcar tiene diferentes fases que son (CENICAÑA, 2003):

*Molienda de la caña de azúcar:* en este proceso se hace la separación del jugo encontrado en la fibra de caña para lo que se utilizan una serie de molinos y cuchillas, en la fase final de este proceso se obtiene como residuo el bagazo, este “residuo” es utilizado como combustible natural utilizado para producir vapor en las fábricas azucareras.

*Calentamiento, clarificación y filtración:* en esta fase del proceso, se aumenta la temperatura del jugo diluido y se le agrega cal, con el fin de disminuir su acidez y lograr la separación de las sustancias contaminantes del jugo. A continuación, se separan los sólidos insolubles del jugo y estos posteriormente son filtrados, proceso por el cual se obtiene la “cachaza”, es importante mencionar que esta puede ser utilizada como fertilizante, ya que mejora la estructura superficial del suelo.

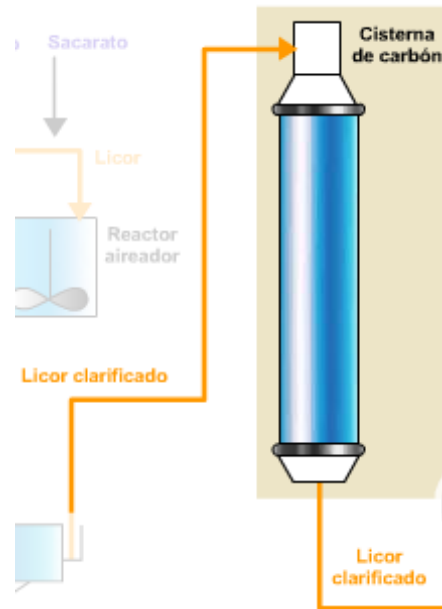
*Evaporación, Cristalización y centrifugación:* en el proceso de evaporación, se retira la mayor cantidad de agua retenida en el jugo y en la fase final del proceso se obtiene la miel (subproducto). A continuación, se realiza la cristalización proceso por el cual se obtienen los cristales de sacarosa mediante el uso de material semilla, en los tachos (tanques) se obtienen masas con diferentes proporciones de cristales y miel, estos compuestos son separados finalmente en centrifugas, para separar los cristales de sacarosa de las mieles residuales (proceso de centrifugación).

*Secado y refinación:* en este punto el azúcar se encuentra no refinada (con color), para el proceso de refinación se tienen que seguir una serie de pasos similares a los descritos con anterioridad, pero con el azúcar ya obtenido, cuyo fin es obtener un azúcar más puro (blanco), los pasos a seguir son: la separación de sólidos, alcalización, clarificación, **decoloración**, filtración, evaporación, cristalización, centrifugación y secado.

### 2.2.4 Proceso de decoloración

La decoloración es el proceso más importante en la refinación del azúcar, ya que, de todas las diferencias entre el azúcar crudo y el azúcar refinado, el color es la característica más percibida por los consumidores. En dicho proceso de decoloración se remueve no solo el “color” del azúcar, debido a que los colorantes interactúan con los precursores de color, los no azúcares orgánicos y los constituyentes orgánicos que forman ceniza, de manera que todos ellos se eliminan junto con el color (Chen, 2006). Diseñar un sistema de decoloración que sea técnica y económicamente bueno es una de las tareas más importantes a realizar por parte de los ingenios azucareros, en el caso del Ingenio Manuelita se hace uso del carbón activado, este es un compuesto inocuo con la capacidad de remover las moléculas que aportan color al azúcar por medio de un proceso de adsorción, este carbón activado es introducido en unas cisternas de decoloración, por las cuales pasa el

licor clarificado durante el proceso de refinación y las moléculas que aportan color son adsorbidas. Finalmente este carbón es extraído de las cisternas de decoloración y es incinerado para su posterior reutilización en otro proceso de decoloración.

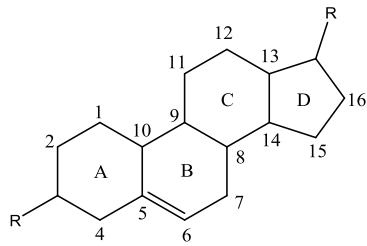


**Figura 1:** Esquema del proceso de decoloración del azúcar crudo. Tomado de: (CENICAÑA, 2003)

### 2.2.5 Los fitosteroles y sus características estructurales y farmacológicas

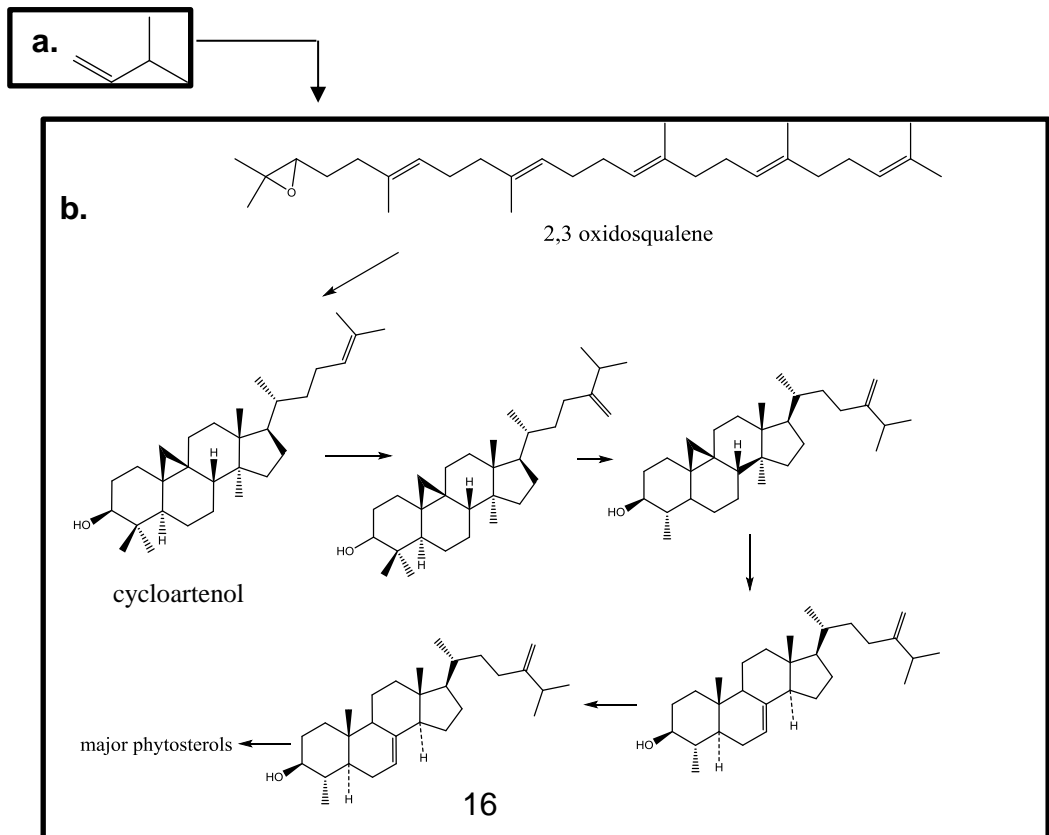
Los fitoesteroles son sintetizados en las plantas y cumplen una función similar al que cumple el colesterol en animales, se ha determinado que estas moléculas intervienen en la biosíntesis de celulosa y de diferentes productos vegetales secundarios, como por ejemplo, los alcaloides (Oliver A, 2005). Los esteroides hacen parte del aceite vegetal que es extraído de algunas plantas y también son sintetizados en los seres humanos, como es el caso del colesterol.

Los esteroides son esteroides con 27 a 29 átomos de carbono. Se caracterizan por ser derivados del ciclopentano-perhidrofenantreno (figura 2) o esterano, una molécula de 17 carbonos formada por cuatro anillos, tres de ellos de 6 átomos de carbono y uno de 5. Además, presentan en el carbono 17 del esqueleto esteroide una cadena de 8 o más carbonos y un grupo hidroxilo en el carbono 3 (Cantrill, 2008).

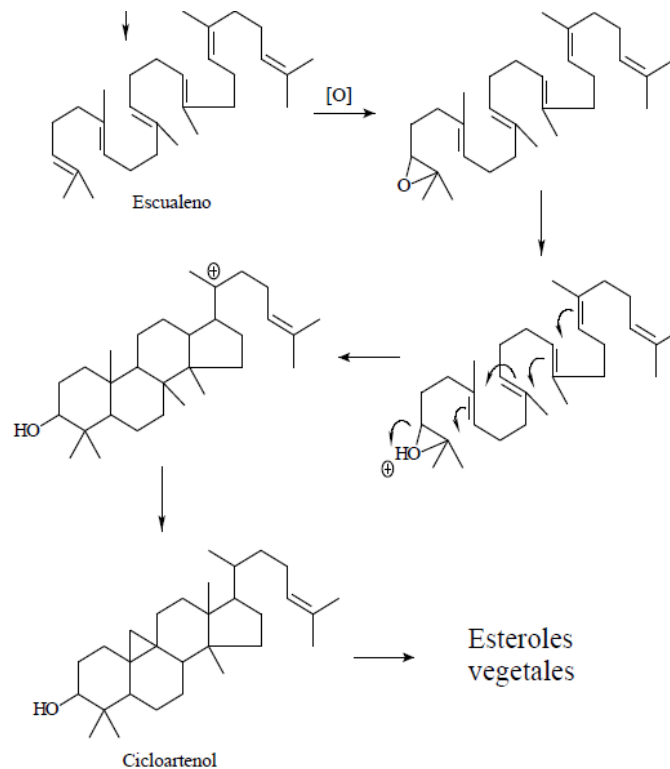


**Figura 2.** Estructura del ciclopentano-perhidrofenantreno.

Los esteroides se derivan de los isoprenoides (unidades isoprenicas), estos son compuestos que han sido altamente estudiados a lo largo de la historia. Su precursor biológico universal es el isopentil difosfato (IPP), en las plantas, los isoprenoides se sintetizan y acumulan en el interior del compartimento plastidial, mientras que los esteroides se forman en el citoplasma, retículo endoplasmático y la mitocondria (GOODWIN, 1966). Estos se biosintetizan por la vía del mevalonato, como primer paso se da la formación y activación del 2,3 oxidosqualeno, a continuación, ocurre una ciclación concertada (figura 4) de dicha molécula y finalmente por la adición y pérdida de dobles enlaces, se da la formación de los diferentes tipos de esteroides en las plantas (figura 3), en general, todos los esteroides tienen como precursor inmediato el cicloartenol, como se puede observar a continuación (Phytochemistry, 1995). Es importante mencionar que, la biosíntesis de esteroides puede ser inhibida en las plantas por la presencia de la mevalonina, que es un inhibidor de la formación de mevalonato y por tanto inhibe la formación de IPP (Lichtenthalera H., 1997).



**Figura 3.** a. Unidad isoprenica y b. Biosíntesis de esteroides en plantas.



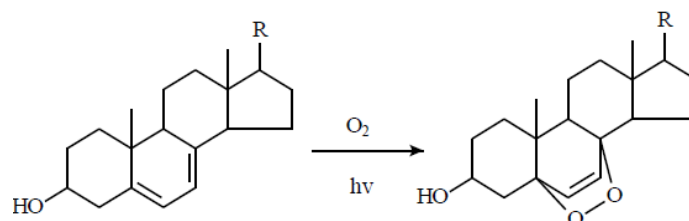
**Figura 4.** Ciclación concertada para la formación del cicloartenol en plantas (Martínez A. , 2002).

Los esteroides pueden ser sintetizados también en otros organismos como los hongos, el esteroide comúnmente encontrado en estos es el ergosterol, que tiene las mismas características estructurales mencionadas con anterioridad, aunque su precursor principal no es el cicloartenol como en las plantas sino el lanosterol (Phytochemistry, 1995). Tanto en plantas como en hongos hay una alta diversidad de esteroides, para lo cual se ha referenciado una enzima denominada esteroide C24-metiltransferasa (SMT), esta juega un papel elemental en la diversidad de fitoesteroides producidos en plantas y en la actualidad se ha tenido un interés considerable en el mecanismo llevado a cabo por dicha enzima y en su estereoquímica, ya que de acuerdo con esas investigaciones se podría impulsar el diseño de nuevos fármacos (Pereira, 2010).

En relación con las características estructurales de los esteroides, es posible afirmar que, se presentan como sólidos cristalinos incoloros y debido al gran tamaño de su núcleo estructural son de naturaleza apolar y por tanto son solubles en solventes orgánicos apolares, tales como el hexano y el cloroformo, son menos solubles en alcoholes de bajo peso molecular. (Martínez A. , 2002).

Estos tienen actividad óptica debido a los carbonos asimétricos que poseen, ya que la mayoría de esteroides naturales contienen grupos funcionales tales como enlaces dobles C=C y el grupo hidroxilo, de esta manera, sus espectros ultravioleta muestran un máximo de absorción alrededor de 205 nm, debido a transiciones p-p\*

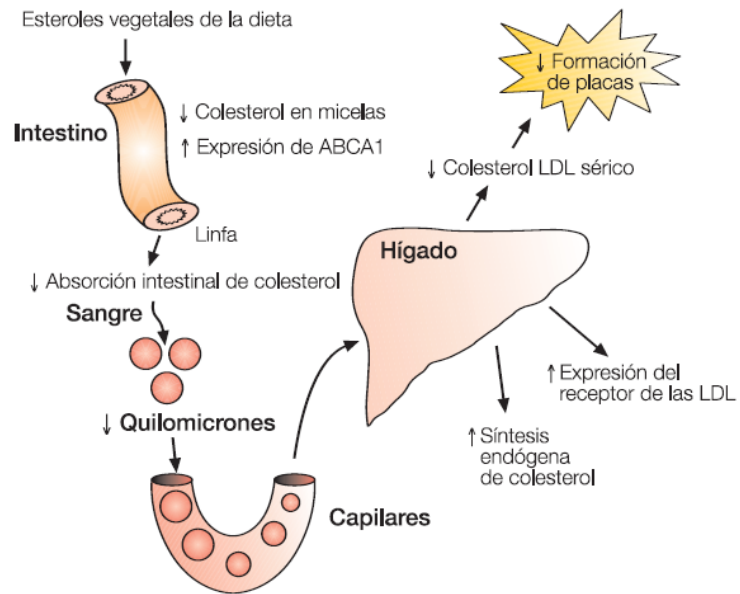
del enlace doble, dicho máximo de absorción no es muy intenso mientras que en esteroides con grupos dienos conjugados como el ergosterol, se tiene un máximo de absorción intenso en el rango de 200 y 360 nm (Electrónica, 2017). Es importante mencionar que, los esteroides se pueden recrystalizar en metanol formando cristales en forma de agujas brillantes incoloras. Los que presentan dobles enlaces conjugados son de color amarillento y tienden a descomponerse por acción de la luz como por ejemplo los esteroides con insaturaciones en C-5 y C-7, los cuales son susceptibles a la reacción de oxidación fotoquímica como se muestra en la figura 5 (Martínez A. , 2002)



**Figura 5.** Reacción de oxidación fotoquímica en esteroides (Martínez A. , 2002).

Los esteroides desempeñan una amplia gama de funciones celulares en hongos y en plantas, dentro de dichas funciones se encuentra que son un componente estructural de las membranas, intervienen en la señalización de feromonas y otros productos secundarios producidos en estos organismos. Sin embargo, ha sido demostrado que los esteroides vegetales consumidos en la dieta diaria juegan un importante papel en la reducción del colesterol en los seres humanos, lo anterior puede explicarse ya que los esteroides vegetales, al ser más hidrofóbicos que el colesterol, pueden desplazarlo de las micelas de absorción y además causar un aumento en los transportadores de esteroides, que transportan el colesterol libre de nuevo al intestino para su eliminación y de esta manera se presenta una disminución de la incorporación de este a las micelas y por tanto de su absorción como se observa en la figura 6 (Oliver A, 2005). Otro mecanismo que explica dicha disminución ha sugerido que el colesterol en el intestino, al ser poco soluble, se precipita por la presencia de esteroides y por tanto no se absorbe (Oliver A, 2005).

De esta manera, los esteroides podrían tener efectos en la disminución de enfermedades tales como la aterosclerosis, los accidentes cardiovasculares y cerebrovasculares, ya que al disminuir la concentración de colesterol se disminuyen también los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL), que son las causantes de la formación de placas ateroscleróticas y trombos que desencadenan todas las patologías mencionadas con anterioridad.



**Figura 6.** Efectos de los esteroides en la disminución del colesterol (Oliver A, 2005)

## **2.3 OBJETIVOS**

### **2.3.1 Objetivo general**

Optimizar el proceso de purificación de los compuestos orgánicos presentes en mayor proporción en los residuos de las cisternas de decoloración del Ingenio Manuelita.

### **2.3.2 Objetivos específicos**

- Extraer los compuestos encontrados en el carbón extraído de las torres de decoloración durante el proceso de refinación del azúcar en el Ingenio Manuelita.
- Aislar y purificar los esteroides encontrados en el carbón activado de las cisternas de decoloración del Ingenio Manuelita.

## 2.4 METODOLOGÍA REALIZADA

### 2.4.1 Matriz de marco lógico

Objetivos	Actividades	Supuestos	Indicadores
Extraer los compuestos que aportan color al azúcar obtenidos del carbón de activado proveniente del ingenio manuelita.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Entrenamiento en el manejo de la planta piloto de extracción.</li> <li>2. Obtención de la muestra de carbón activado a partir de las cisternas de decoloración del ingenio manuelita.</li> <li>3. Inicio del proceso de extracción de la muestra y aseguramiento de la recirculación adecuada del solvente de extracción.</li> <li>4. Concentración del extracto obtenido en la planta.</li> <li>5. Rotaevaporación del extracto concentrado.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Disponibilidad de solventes necesarios para el proceso de extracción.</li> <li>2. Disponibilidad de la muestra de carbón activado en el ingenio Manuelita</li> <li>3. Mantenimiento constante de la planta de extracción.</li> <li>4. Suministro constante de electricidad y agua en el proceso de extracción.</li> </ol>	<p>Planta piloto de extracción con solventes y condiciones óptimas adecuadas.</p> <p>Extracto de compuestos aromáticos concentrado.</p>
Aislamiento de los esteroides encontrados en el carbón activado de las cisternas de decoloración del ingenio Manuelita.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Entrenamiento en el manejo del ISOLERA y HPLC.</li> <li>2. Establecimiento de los parámetros de la técnica cromatográfica utilizada.</li> <li>3. Separación de los diferentes tipos de esteroides de acuerdo con su polaridad.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Disponibilidad de una cantidad suficiente de extracto para el aislamiento de los esteroides.</li> <li>2. Disponibilidad del equipo y del extracto.</li> </ol>	<p>Técnica cromatográfica para el aislamiento de los esteroides definida.</p> <p>Tiempos de retención para las moléculas de esteroides determinados.</p>

Elucidar las moléculas de esteroides encontradas en la matriz de carbón activado del ingenio Manuelita.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Entrenamiento en el manejo los equipos de RMN, UV y masas.</li> <li>2. Selección de disolventes para realizar la RMN de H y C.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Permisos para el manejo de los equipos de RMN y masas de la universidad del Valle obtenidos.</li> <li>2. Muestra debidamente purificada.</li> <li>3. Disponibilidad de solventes necesarios para la identificación y caracterización.</li> </ol>	<p>Técnicas para elucidación de compuestos aromáticos (RMN, masas) determinadas.</p> <p>Estructuras químicas de los esteroides caracterizadas.</p>
---	---	--	--

#### 2.4.2 Recolección de la muestra

Se realizó la recolección de la muestra para lo cual se tomó una muestra de carbón activado de las cisternas de decoloración del Ingenio Manuelita en un recipiente de 50 kg aproximadamente.

#### 2.4.3 Extracción de compuestos aromáticos en la planta semi piloto.

El proceso se llevó a cabo en la planta de extracción semipiloto PSE solutions. En esta se realiza un proceso de extracción sólido-líquido durante aproximadamente 5 horas, a una temperatura de 70°C. Para esto, se hizo uso de aproximadamente 8 litros de acetato de etilo.

#### 2.4.4 Identificación y determinación del compuesto presente en mayor proporción.

La cromatografía planar es un método de análisis de muestras multicomponentes que permite establecer comparaciones cualitativas. El objetivo principal es tener un panorama general de los posibles compuestos que tiene un extracto o una fracción. Convencionalmente este método de separación está acompañado con derivatizaciones post-cromatográficas que permiten la visualización de las sustancias separadas en la placa de desarrollo. Los resultados experimentales permiten seleccionar moléculas blanco para dirigir los esfuerzos posteriores de purificación. Así, ejecutó esta metodología utilizando como fase móvil una mezcla de hexano y acetato de etilo en proporciones 9:1.

#### **2.4.5 Separación por Cromatografía al vacío (cromatografía flash)**

La cromatografía al vacío o cromatografía flash, es una técnica ampliamente utilizada para la separación de moléculas de acuerdo a la polaridad de las mismas. Por esta razón se hizo uso de solventes y mezclas de estos de diferente polaridad, desde el hexano (apolar) hasta el acetato de etilo (medianamente polar). Con el fin de tener una separación adecuada cuando se tienen mezclas complejas de compuestos. Haciendo uso de esta cromatografía es posible separar los compuestos con una mejor resolución en comparación con la cromatografía planar y además tiene la ventaja de que hace posible la obtención de altos rendimientos. Además, en esta técnica se hace un “empaquetamiento en sólido” es decir que para el montaje de la columna se impregna la muestra con la menor cantidad de sílica posible, por lo que se asegura un óptimo desarrollo cromatográfico.

#### **2.4.6 Fraccionamiento de los compuestos apolares y medianamente polares en Isolera Flash One Biotage®.**

La cromatografía automatizada en columna es un método de purificación de extractos que permite realizar un fraccionamiento de compuestos, en función de las características de polaridad de los mismos. Esta técnica presenta muchas ventajas con respecto a otras técnicas cromatográficas, dentro de las cuales se encuentran la posibilidad de acondicionar el equipo para el paso del eluyente, establecer las condiciones de gradiente y el caudal. Como se encuentra acoplado a un detector ultravioleta, permite realizar un barrido de acuerdo con la capacidad de absorbancia de los compuestos. En general, se debe alcanzar un  $R_f$  de 0,5 con la fase móvil seleccionada, ésta la mayoría de las veces debe ser de carácter binario, con el fin de tener la posibilidad de ajustar la polaridad en relación con las características de las moléculas que se desean purificar. De esta manera se hizo uso de una mezcla de hexano y acetato de etilo en proporciones 70:30.

#### **2.4.8 Purificación por cromatografía preparativa.**

La cromatografía preparativa, es una técnica ampliamente utilizada para la purificación de compuestos, esta contiene una sílica de menor tamaño (en comparación con la cromatografía al vacío) lo que le otorga mayor resolución. Esta técnica presenta mayores rendimientos, es muy útil cuando se desea aislar un compuesto en una muestra compleja. El desarrollo cromatográfico, va a depender de la interacción de los compuestos de interés con la fase móvil y la fase estacionaria que actúa como adsorbente. Para llevar a cabo el desarrollo cromatográfico se tuvo como fase móvil, una mezcla de tolueno, cloroformo y metanol en proporciones 40:40:10

## **2.4.9 Caracterización**

Este proceso fue realizado en la universidad del valle en el cromatógrafo de gases acoplado a masas, debido a que en la universidad Icesi y en el grupo de investigación de productos naturales no se contaba con la disponibilidad de este equipo. Así, se disolvió la muestra en diclorometano, se inyectó en el equipo a 300°C, la corrida duró 15 minutos y como el equipo se encontraba acoplado a un espectrómetro de masas, se acondicionó con un voltaje de ionización de 70 voltios.

## **2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **2.5.1 Recolección de muestra, extracción y rotaevaporación del extracto obtenido a partir de la matriz de carbón activado.**

El proceso de recolección de la muestra fue llevado a cabo de acuerdo con lo mencionado en el ítem 2.4.1, es importante mencionar que el carbón activado es una matriz poco selectiva, es decir que al tener una gran área superficial tiene la capacidad de adsorber moléculas de todo tipo, polares, medianamente polares y apolares. “El carbón activado es el adsorbente más versátil y eficiente para remover compuestos orgánicos en solución acuosa. Su capacidad de adsorción se debe no solamente a su gran área específica sino también a su naturaleza, la cual depende considerablemente del proceso de oxidación-activación” (MAHAJAN O, 1980), esta capacidad para adsorber compuestos de todo tipo es una desventaja cuando se desea purificar moléculas específicas, ya que para el proceso se parte de una matriz muy compleja de compuestos químicos. Esto debido a que como se mencionó con anterioridad, en la caña de azúcar han sido reportados diferentes tipos de compuestos, que van desde moléculas muy polares como los flavonoides glicosilados hasta moléculas muy apolares como los esteroides y los triterpenos, de esta manera se presume que todos estos compuestos podían estar presentes dentro del carbón activado.

Seguido a la recolección de la muestra, se llevó a cabo la extracción de moléculas orgánicas, este proceso se realizó en la planta de extracción semipiloto (figura 7) con la que se lleva a cabo un proceso de extracción sólido-líquido, esta contiene una chaqueta de aceite que permite tener una temperatura homogénea en el sistema, por lo que se facilita el proceso de desorción de las moléculas. De esta manera, se utilizaron aproximadamente 10626 g de carbón activado que fueron introducidos en la planta y extraídos con 8 litros de acetato de etilo, que fue el solvente de elección debido a que al ser medianamente polar tiene la capacidad de solubilizar una mayor variedad de compuestos (con diferentes características de polaridad).



**Figura 7.** Planta de extracción semi-piloto PSE solutions.

Finalmente, cuando se terminó el proceso de extracción se recogieron aproximadamente dos litros de extracto de color amarillo del concentrador y se realizó una concentración al vacío del extracto en un rotaevaporador modelo Heidolph.

### **2.5.2 Identificación de los compuestos aromáticos a separar por sus características de polaridad y su separación.**

En este paso, se realizaron diferentes montajes de cromatografía planar con el fin de determinar la fase móvil adecuada para lograr una óptima separación de las moléculas presentes en el extracto. Para la identificación de la mejor resolución cromatográfica se establecieron 3 fases móviles diferentes.

1. Hexano 100% (10 mL)
2. Hexano-Acetato de etilo 8:2 (8 mL de hexano y 2 mL de acetato de etilo)
3. Hexano-Acetato de etilo 9:1 (9 mL de hexano y 1 mL de acetato de etilo)

Llevado a cabo cada desarrollo cromatográfico, se determinó que la fase móvil con la que se lograba una óptima separación de las moléculas presentes en el extracto fue la mezcla de hexano y acetato de etilo en proporciones 9:1 (figura 8), en tanto que se apreciaban mayor número de bandas cromatográficas bajo luz ultravioleta y que el revelador que permitía una mejor visualización de las bandas era la vainillina-ácido sulfúrico. Y como se observa en la imagen, la banda que da cuenta de los compuestos que se encuentran en mayor proporción es la resaltada en rojo.

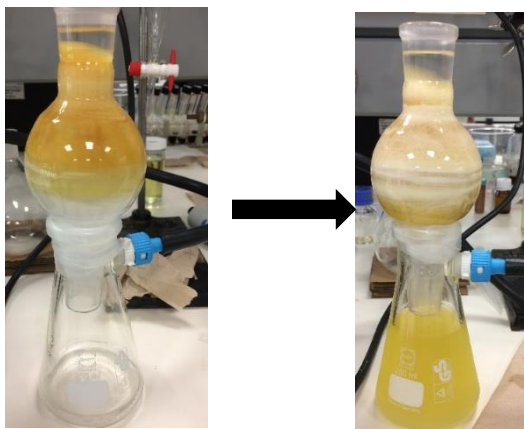


**Figura 8.** Cromatografía planar derivatizada con vainillina-ácido sulfúrico, desarrolladas en una mezcla de solventes hexano: acetato de etilo (9:1).

### 2.5.3 Cromatografía al vacío (cromatografía flash)

A continuación, se procedió a realizar la separación de los compuestos del extracto crudo por medio de cromatografía al vacío, para esto se pasaron diferentes solventes y mezclas de estos por la columna, como se muestra a continuación.

1. Hexano 100% (100mL)
2. Hexano-diclorometano 50%:50% (50mL de hexano y 50mL de diclorometano)
3. Diclorometano 100% (100mL)
4. Diclorometano-Acetato de etilo 50%:50% (50mL de diclorometano y 50mL de acetato de etilo)
5. Acetato de etilo 100% (100mL)



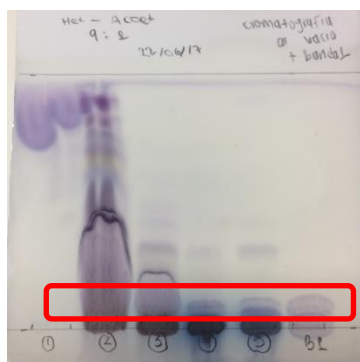
**Figura 9.** Proceso de cromatografía al vacío.

Esta es una técnica de pretratamiento a escala de gramos de muestra, por lo que no es posible tener una separación con alta resolución de compuestos. Sin embargo, es útil para eliminar compuestos e interferencias en relación con su polaridad. Por lo tanto, durante este método de purificación, fue posible observar como la muestra adsorbida sobre la sílica, disminuía su coloración conforme era eluída con los solventes de diferentes polaridades. De esta manera se obtuvieron 5 fracciones que se muestran a continuación en la figura 10.



**Figura 10.** Fracciones obtenidas una vez se desarrolló la cromatografía al vacío.

En la imagen anterior, se puede observar que las fracciones varían de color, esto se debe a la cantidad de moléculas presentes en cada una de ellas. Para establecer el perfil químico de cada fracción, se realizó una cromatografía planar (figura 11) con el fin de determinar en cuál de las fracciones se encontraba la banda de referencia (B1) que representaba el compuesto presente en mayor proporción.



**Figura 11.** Cromatografía planar desarrollada a partir de las fracciones obtenidas derivatizada con vainillina-ácido sulfúrico, desarrolladas en una mezcla de solventes hexano: acetato de etilo (9:1).

#### 2.5.4 Determinación de la fase móvil indicada para el proceso de cromatografía en columna automatizada y fraccionamiento de compuestos en Isolera Flash One Biotage®

Para continuar con el proceso de purificación, en primera medida se determinó que la fase móvil que permitía una separación óptima de los compuestos (factor de retención de la banda de referencia aproximadamente de 0,5) era una mezcla de hexano y acetato de etilo en proporciones 70:30, así, se puede concluir que el compuesto de interés es de carácter apolar y podría ser un esteroide y/o un triterpeno. Estos a pesar de tener una estructura de tipo tetracíclica y pentacíclica respectivamente, podrían presentar en su estructura algunos grupos funcionales que le confieren cierto carácter polar como grupos hidroxilo y carboxilo. Estos aportan polaridad por los átomos de oxígeno que tiene pares de electrones libres y que le permiten generar un momento dipolar a la molécula, por lo cual pueden establecer enlaces de hidrógeno.

La cromatografía automatizada, se llevó a cabo en el equipo Isolera Flash One Biotage® (figura 12) y así mismo se realizó el acondicionamiento del equipo de acuerdo con los parámetros mostrados en las tablas 1 y 2. En esta etapa de purificación fue necesario hacer dos corridas cromatográficas debido a la complejidad de la muestra, tal como se explicará más adelante.



**Figura 12.** Isolera Flash One Biotage®

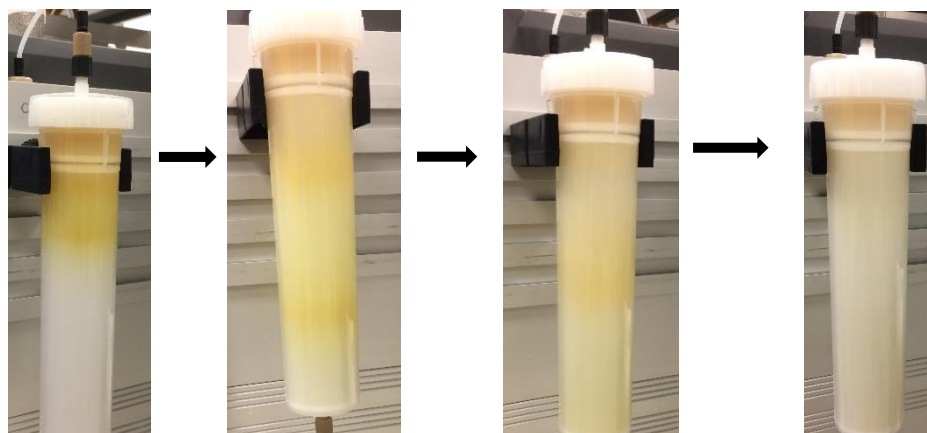
**Tabla 1.** Condiciones para la separación de compuestos presentes en el extracto de carbón activado.

<b>Equipo</b>	<b>Isolera Flash One acoplado a detector UV/VIS</b>
Cartucho	SNAP Ultra 100g
Caudal	100mL/min
Disolvente A	n-Hexano
Disolvente B	Acetato de etilo
UV1 (Seguimiento)	257nm
UV2 (Seguimiento)	357nm

**Tabla 2.** Condiciones de gradiente para la separación de compuestos presentes en el extracto de carbón activado.

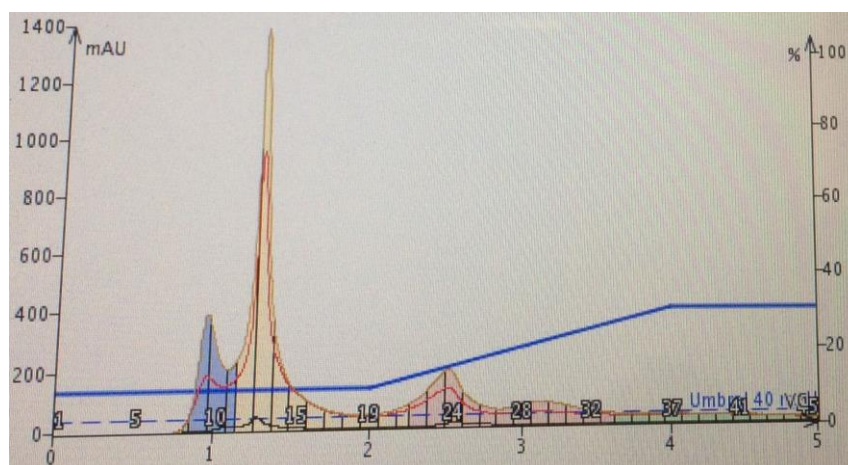
	<b>Disolvente</b>	<b>Mezcla</b>	<b>Medida (VC)</b>
Equilibrio	A/B	10%	3.0
1	A/B	10%	2.0
2	A/B	10%-30%	2.0
3	A/B	30%	1.0

Durante el desarrollo cromatográfico se puede observar que en la medida en que se va aumentando la proporción del solvente más polar en la columna, es decir, se va aumentando la cantidad de acetato de etilo, las moléculas empiezan a perder afinidad con la sílica y a ser eluidas con el solvente. La figura 13 puede dar cuenta de este evento, las fotos son sucesivas y van evidenciando cómo las sustancias son eluidas de la columna conforme aumenta la fuerza del solvente.



**Figura 13.** Desarrollo de la cromatografía en columna automatizada.

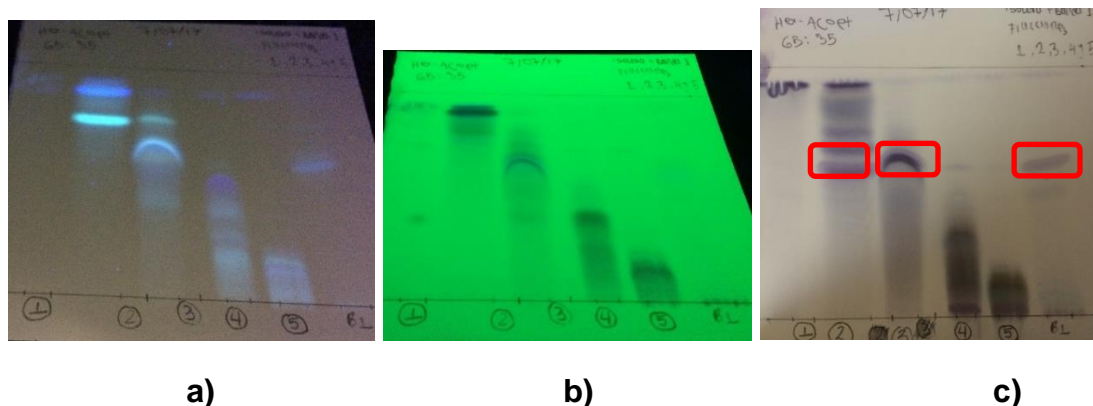
Según lo observado en el cromatograma (figura 14) se muestran 5 señales (colores) diferentes que hacen referencia a las 46 fracciones recogidas, en primera medida las fracciones 1 a 8, que se unieron y se denominaron “fracción 1” corresponden a la primera señal obtenida en el cromatograma, que es la fase de equilibrio de la columna. Las fracciones 9 a la 11 corresponden a una señal muy marcada en el eje de las unidades de absorbancia que aparece en amarillo, estas fracciones se unieron y se convirtieron en la “fracción 2”. A continuación, se unieron las fracciones 12 a la 21 y se les denominó “fracción 3” esta señal corresponde a la observada en rosado en el cromatograma. De la misma manera se unieron las fracciones 22 a la 33 (rosado) y 34 a la 46 (verde), señal 4 y 5 respectivamente.



**Figura 14.** Cromatograma obtenido en el Isolera Flash One Biotage® durante el fraccionamiento de compuestos.

Una vez separadas y concentradas las fracciones se procedió a realizar la visualización del perfil químico de cada fracción por cromatografía planar, con el fin de determinar en cuál de las fracciones se encontraba la banda de referencia, tal como se muestra en la figura 15.

Esta técnica de separación permitió un correcto fraccionamiento de los compuestos presentes en el extracto, y se evidencia además que la banda de referencia resaltada en color rojo, se encuentra dentro de las fracciones 2 y 3. Aunque se consiguió aumentar la concentración de las moléculas seleccionadas, se puede observar un número alto de contaminantes, por lo que se decidió realizar otro proceso de purificación en el equipo con las mismas condiciones cromatográficas.

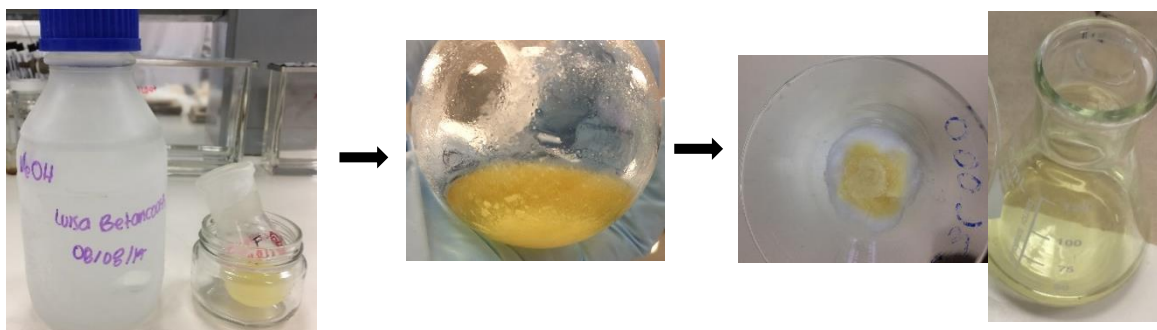


**Figura 15.** Cromatografía planar desarrollada a partir de las fracciones obtenidas vista bajo luz ultravioleta a una longitud de onda larga (365 nm) (a) y a una onda corta (254 nm) (b). Derivatizada con vainillina-ácido sulfúrico (c). Todas desarrolladas en una mezcla de solventes hexano: acetato de etilo (6,5:3,5).

### 2.5.5 Cristalización

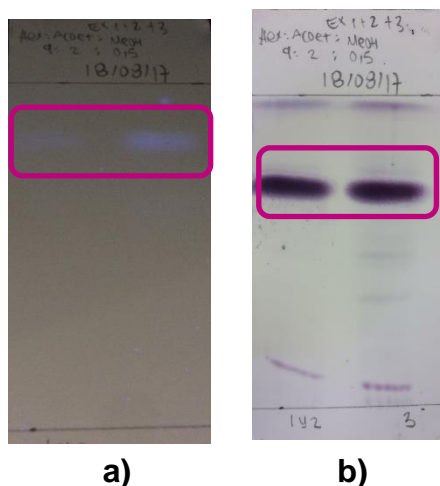
Este proceso fue llevado a cabo con las fracciones que contenían la banda de referencia en el paso anterior, de esta manera se realizó el proceso de cristalización, que se basa en la limitada solubilidad de un compuesto en un solvente, a una presión y una temperatura determinadas. Un cambio de dichas condiciones traerá como consecuencia un estado en el cual la solubilidad será menor y por tanto se dará la formación de un sólido cristalino (Engineering, 2014). En este proceso se utilizó como solvente el metanol frío (5°C), la muestra se dejó en reposo durante 12 horas, con el fin de favorecer el proceso de cristalización, debido a que a bajas temperaturas disminuye el movimiento térmico-aleatorio de las moléculas y eso trae como consecuencia la disminución de la solubilidad de la mayoría de las sustancias.

Este proceso de cristalización tiene muchas ventajas cuando se utiliza como un método de purificación debido a que cuando se lleva a cabo, se da la formación de una red cristalina de moléculas que consiste en una estructura altamente ordenada, esto evita que moléculas extrañas o impurezas se incorporen a dicha red por lo que se obtiene un producto con alto grado de pureza (Engineering, 2014).



**Figura 16.** Esquema del proceso de cristalización.

El proceso de cristalización se realizó 4 veces y los cristales obtenidos en cada procedimiento se unieron en un mismo vial. Después de eliminar por completo el solvente se tuvo el peso de los cristales equivalente a 22,1 mg. A continuación, se realizó un seguimiento por cromatografía planar de los cristales y a la fase móvil se le agregaron 0,5 mL de metanol, con el fin de variar un poco la polaridad de la misma y observar como variaba el factor de retención de los compuestos purificados, como se muestra en la figura 17.



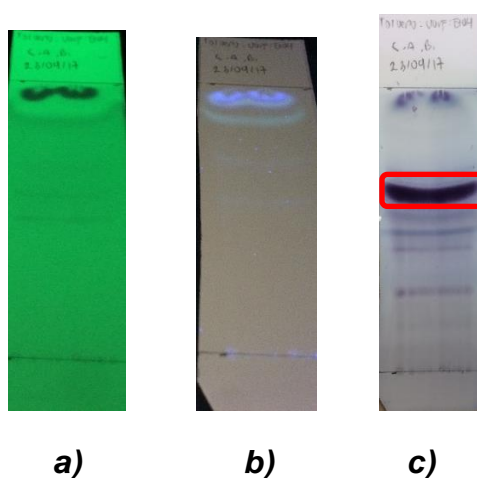
**Figura 17.** Cromatografía planar vista bajo luz ultravioleta a una longitud de onda larga (365 nm) (a) Derivatizada con vainillina-ácido sulfúrico (b). Desarrolladas en una mezcla de solventes hexano: acetato de etilo (9:2:0,5).

Como se muestra en la figura 17, se comparan dos de los procesos de cristalización con el fin de determinar si se estaba haciendo el aislamiento del mismo compuesto, de esta manera se observa el mismo factor de retención lo que dio cuenta del nivel de pureza alcanzado. Sin embargo, aún no se tenía conocimiento de las características estructurales de los compuestos purificados.

### 2.5.6 Purificación de moléculas por cromatografía planar preparativa

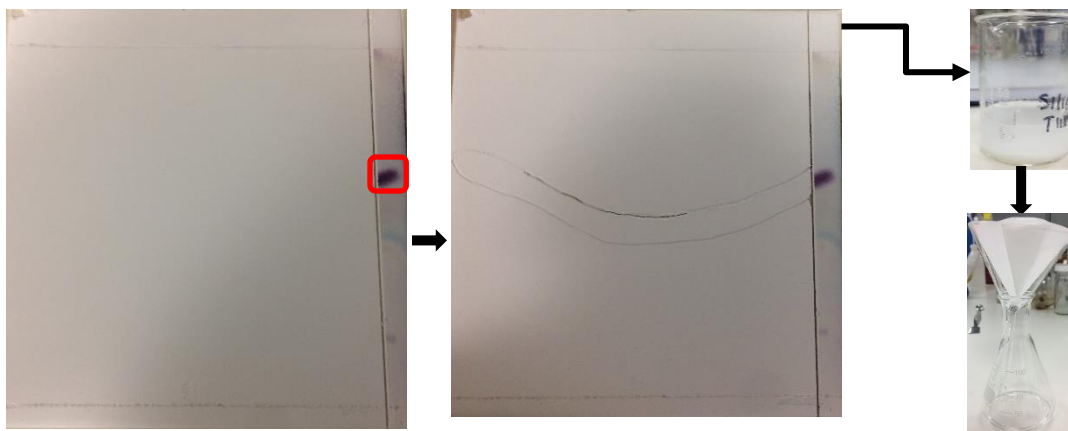
Debido a que los datos espectroscópicos pueden presentar grandes interferencias por las interferencias que acompañen a la muestra, se tomó la decisión final de realizar una última purificación, pero esta vez empleando cromatografía planar preparativa. Esta técnica emplea al igual que la cromatografía TLC pero la capa adsorbida es más gruesa, lo que permite inyecciones de mayores cantidades de muestra.

Para la elección del sistema de solventes se recurrió al libro de "Plant Drug Analysis", el cual nos sugirió como fase móvil una mezcla de los solventes Tolueno, cloroformo y etanol, en proporciones 40:40:10. El resultado es mostrado en la figura 18. (Bladt, 1996).



**Figura 18.** Cromatografía planar vista bajo luz ultravioleta a una longitud de onda corta (254 nm) (a) y a una onda larga (365 nm) (b). Derivatizada con vainillina-ácido sulfúrico (c), desarrolladas en una mezcla de solventes tolueno: cloroformo: metanol (40:40:10).

Según lo observado en la figura 18, se puede notar que se presenta un óptimo nivel de separación, es importante mencionar que en este sistema se observan varias bandas mientras que la fase móvil utilizada en la figura 17, se observa solo una. Lo anterior, se debe a un solapamiento de las bandas, debido a que a la afinidad de las moléculas representadas por la fase móvil hexano: acetato de etilo: metanol (9:2:0,5) era análoga por lo que se apreciaba solo una banda. Mientras que la afinidad de los compuestos por la fase móvil tolueno: cloroformo: metanol (40:40:10) difería de un compuesto a otro, por lo que se observaban varias bandas en la placa (figura 18), este comportamiento se debe a la similitud estructural de las moléculas cristalizadas. Así, se realizó la placa cromatográfica de 20x20cm en el sistema mencionado con anterioridad (figura 18).



**Figura 19.** Purificación de compuestos por cromatografía preparativa.

De esta manera se procedió a extraer la sílica de la placa donde se observaba la banda, para esto se derivatizó una parte de la placa cromatográfica, y se extrajo la banda resaltada en color rojo de la misma (figura 19), una vez extraída la sílica se solubilizo en metanol, se filtró y se pesó y se obtuvo un peso equivalente a 3,6 mg de muestra, cantidad suficiente para realizar un proceso de caracterización.

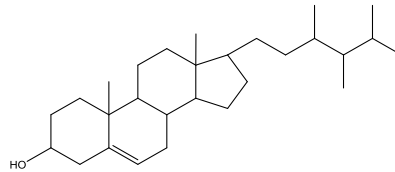
### **2.5.7 Caracterización por cromatografía de gases acoplada a masas.**

El proceso de caracterización se llevó a cabo con la técnica de espectrometría de gases acoplada a masas, en primera medida, en la cromatografía de gases se tiene una fase estacionaria, y una fase móvil que es un gas inerte, de esta manera, la muestra es sometida a altas temperaturas y volatilizada. Para esto se emplea el procedimiento de elusión; la muestra se añade a la columna y el gas puro que actúa de portador fluye continuamente (VALENCIA, 2008). Cuando ésta técnica se encuentra acoplada a espectrometría de masas, las moléculas del analito deben ser primero ionizadas para ser atraídas (o repelidas) por un apropiado campo magnético o eléctrico. El impacto electrónico, es el más común y simple, en esta técnica la fuente de ionización es calentada y bajo vacío la mayoría de las muestras son fácilmente vaporizadas e ionizadas (McNAIR, 1997).

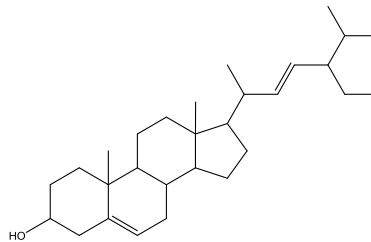
A continuación, se llevó a cabo el desarrollo cromatográfico y una vez obtenidos los espectros de masas, se compararon con la librería NIST 11 en la universidad del valle y de acuerdo con esta se encontró un porcentaje de similitud del 99,99, 99,99y 98% para ergost-5-en-3-ol (3 beta), stigmasta-5,22-dien-3-beta-ol y stigmasta-5-en-3-ol respectivamente. Es importante mencionar que cuando se planteó el proyecto, de acuerdo a lo reportado en la teoría y a trabajos desarrollados con anterioridad, se presumía que las moléculas que podrían encontrarse en mayor proporción en el extracto obtenido a partir del carbón activado proveniente del Ingenio Manuelita, eran los flavonoides. Sin embargo, durante el desarrollo de la metodología planteada se encontró que el compuesto que se encontraba en mayor proporción era de características apolares, diferente a los flavonoides

(medianamente polares). Y cuando se realizó la caracterización de estos compuestos se encontraron esteroides, ya reportados con anterioridad en la caña de azúcar (BRYCE T., 1967).

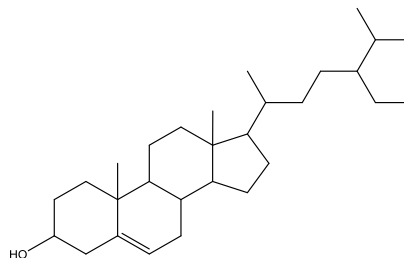
Se encontraron dos esteroides muy comunes en las plantas derivados del estigmasterol y se halló un derivado del ergosterol, un esteroide comúnmente producido en hongos, pero también puede ser sintetizado por las plantas, todas estas sustancias producidas pueden también ser adsorbidas por el carbón activado.



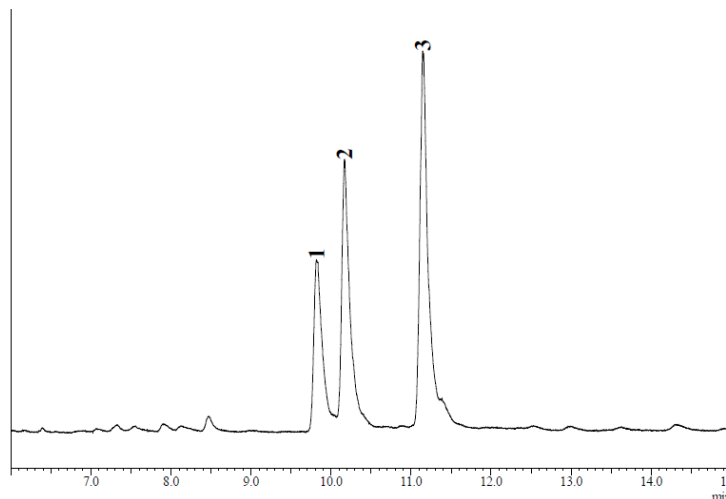
**Figura 20.** Estructura química del ergost-5-en-3-ol (3 beta).



**Figura 21.** Estructura química del stigmasta-5,22-dien-3-beta-ol.



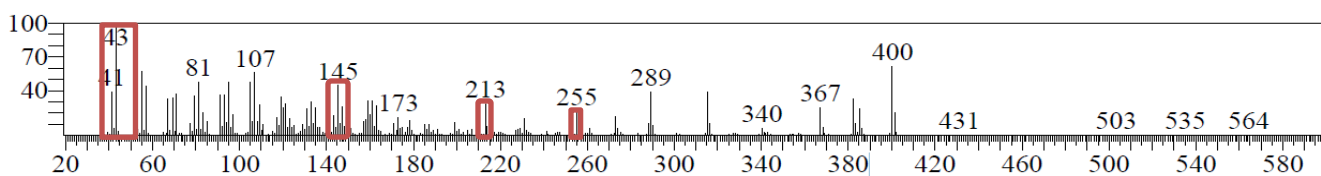
**Figura 22.** Estructura química del stigmasta-5-en-3-ol.



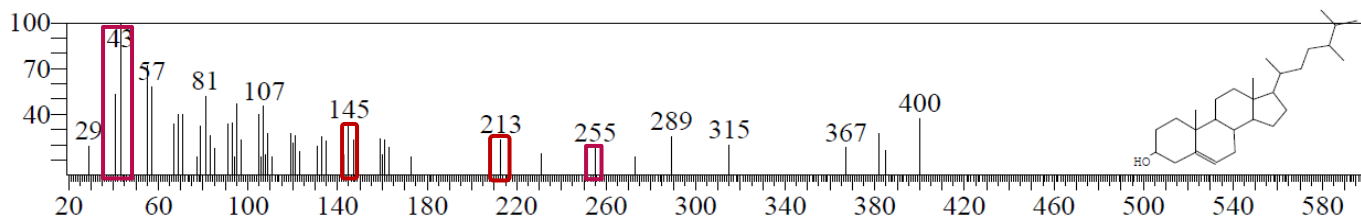
**Figura 23.** Cromatograma obtenido a partir del desarrollo cromatográfico llevado a cabo en el proceso de cromatografía de gases acoplada a masas.

De acuerdo con lo observado en la tabla 3 y en la figura 23, se pueden notar los diferentes tiempos de retención de las moléculas analizadas a continuación (figuras 20, 21 y 22), el menor tiempo de retención lo presentó el ergost-5-en-3-ol (3 beta) que fue de 9.8 minutos y el mayor tiempo de retención fue el del stigamasta-5-en-3-ol (11.1 minutos). Esto se puede explicar debido al punto de fusión de cada una de esas moléculas, es decir, en cuanto menor sea su punto de fusión tendrán la capacidad de volatilizarse más rápido y viceversa, de esta manera, van a ser arrastrados por el gas hacia la columna más fácilmente.

Por consiguiente, se muestra en las figuras 24 a la 32 los espectros de masas experimentales y teóricos de las moléculas previamente caracterizadas y sus posibles fragmentaciones.

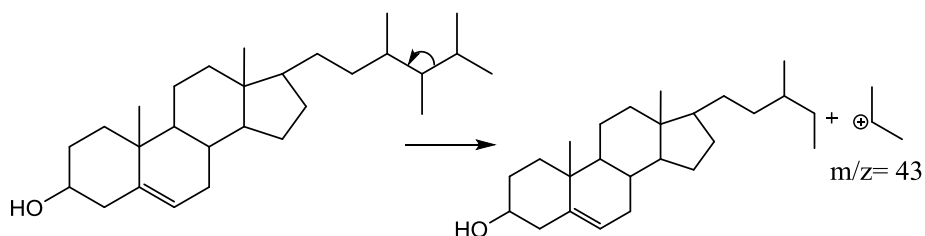


**Figura 24.** Espectro de masas obtenido experimentalmente para ergost-5-en-3-ol (3 beta).



**Figura 25.** Espectro de masas teórico del ergost-5-en-3-ol (3 beta).

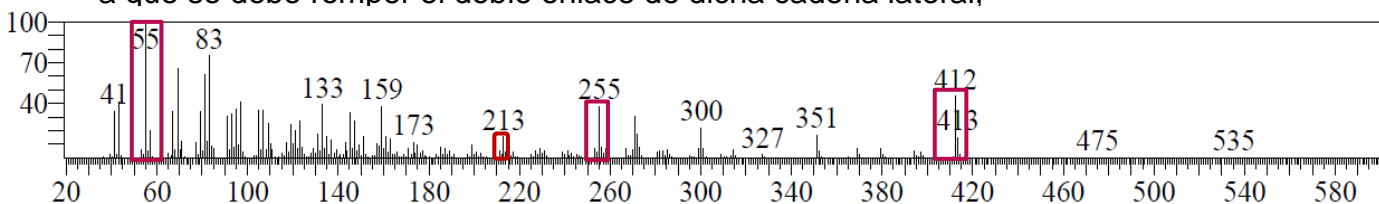
En los espectros anteriores, se pueden observar diferentes señales características que se explicaran a continuación.



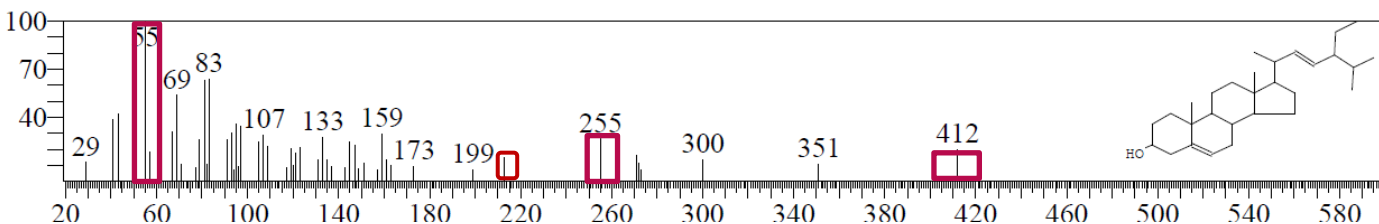
**Figura 26.** Esquema de la fragmentación del ergost-5-en-3-ol (3 beta) para generar el pico base en 43.

Con relación a lo observado en la figura 26, se puede afirmar que ocurre una ruptura heterolítica, en la cadena lateral sustituyente del anillo D y se da la formación de un carbocatión y se puede notar en el espectro que esta es la fragmentación que más ocurre en el del ergost-5-en-3-ol (3 beta). Con respecto al stigamasta-5-en-3-ol se puede notar que su pico base también es 43 y ocurre la misma fragmentación.

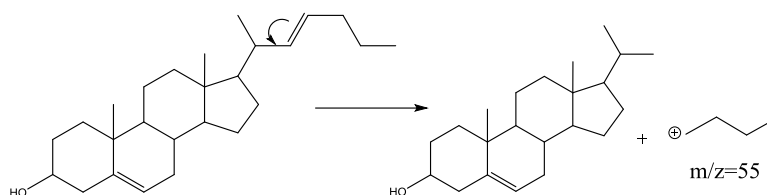
Para generar el pico base del espectro del stigamasta-5,22-dien-3-beta-ol, se puede notar en la figura 29, que la molécula se fragmenta previamente y pierde 3 carbonos y 7 hidrógenos de su cadena lateral sustituyente, que se encuentra unida al ciclo D de 5 carbonos del esqueleto ciclopentanoperhidrofenantreno. Así que para que esta fragmentación ocurra se deben tener condiciones extremas de temperatura, debido a que se debe romper el doble enlace de dicha cadena lateral,



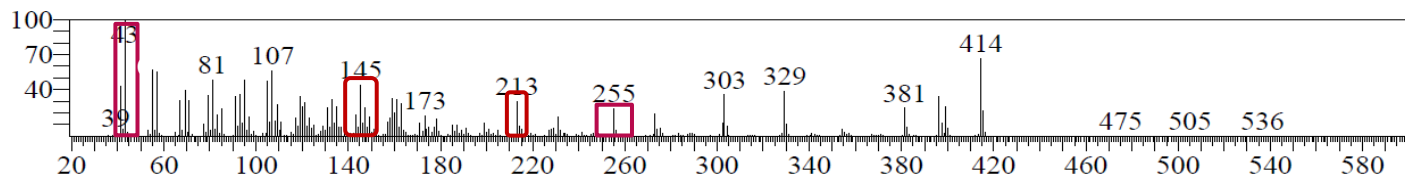
**Figura 27.** Espectro de masas obtenido experimentalmente para stigamasta-5,22-dien-3-beta-ol.



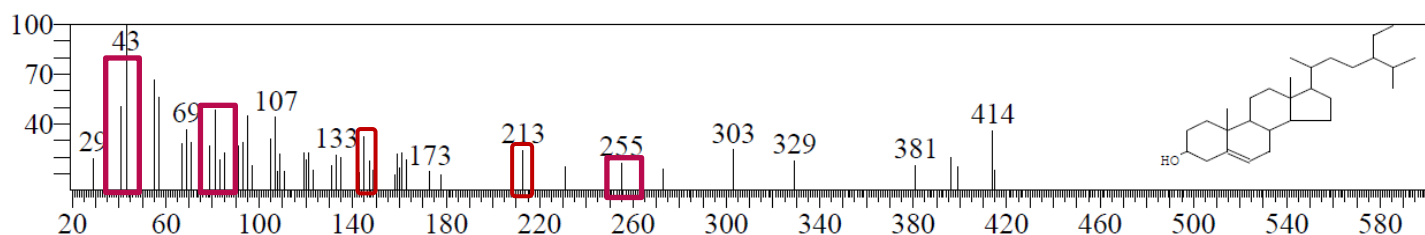
**Figura 28.** Espectro de masas teórico del stigamasta-5,22-dien-3-beta-ol.



**Figura 29.** Esquema de la fragmentación del stigmaster-5,22-dien-3-beta-ol para generar el pico base en 55.



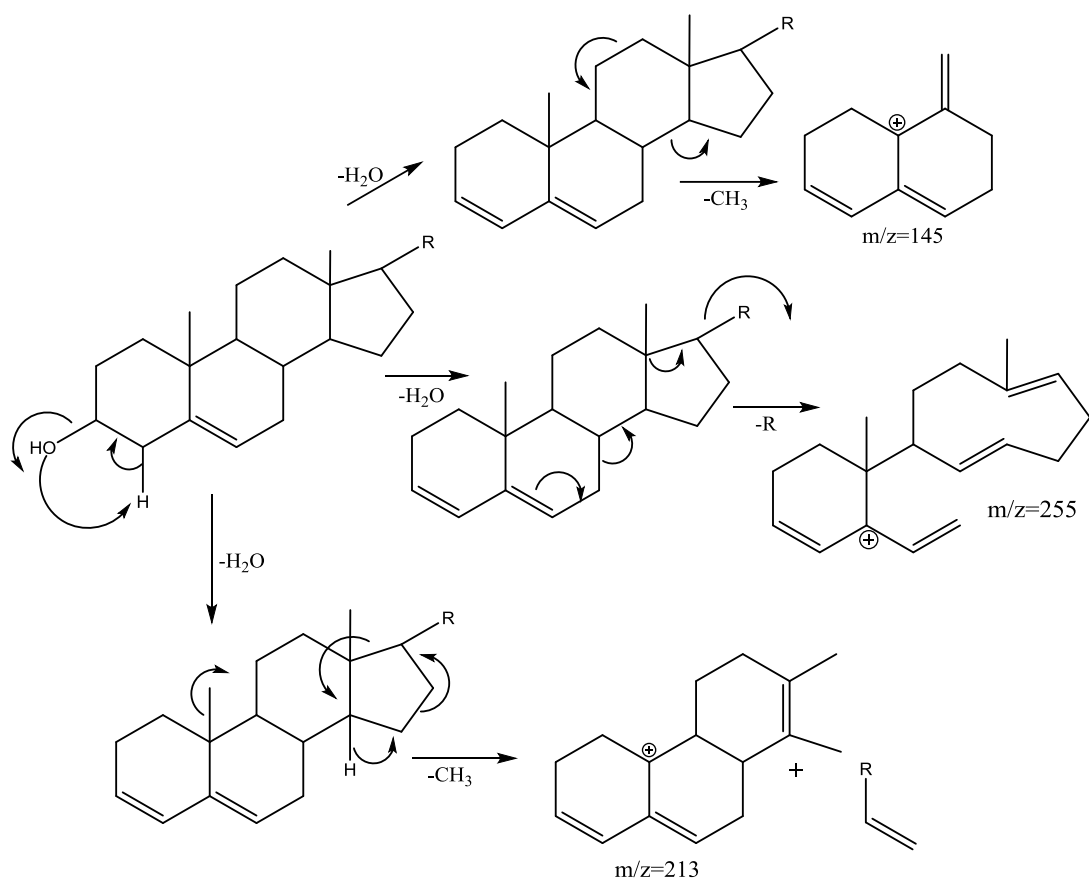
**Figura 30.** Espectro de masas obtenido experimentalmente para stigmaster-5-en-3-ol.



**Figura 31.** Espectro de masas teórico del stigmaster-5-en-3-ol.

En relación con lo observado en la figura 32, se pueden notar 3 fragmentaciones características de los tres esteroides elucidados, ya que las tres estructuras presentan el esqueleto ciclopentanoperhidrofenantreno, que se caracteriza por las fragmentaciones en 213, 255 y 145 respectivamente.

- Para generar la señal en 213, se rompe el ciclo de 5 carbonos y se pierde el sustituyente metilo unido al anillo C del esqueleto, por lo que se da formación de un carbocation en el carbono 10.
- Para originar la señal en 255 se da una reorganización del doble enlace presente en el anillo B de la molécula, lo que genera un rompimiento heterolítico de enlace entre el carbono 7 y 8 y entre el carbono 13 y 14 del anillo C de la molécula y la formación del carbocation en el carbono 5.
- La señal en 145 se debe a el rompimiento de los enlaces del carbono 8 y el carbono 11 del anillo C respectivamente, lo que genera la pérdida del anillo D del esqueleto y un carbocation en el carbono 10.



**Figura 32.** Fragmentaciones características de los esteroides previamente elucidados (Martínez A. , 2002).

**Tabla 3.** Características estructurales de las moléculas elucidadas.

Molécula	Nombre	Tiempo de retención	m/z	Área	Similitud
1	ergost-5-en-3-ol (3 beta)	9.827	43	3476259	99
2	stigmasta-5,22-dien-3-beta-ol	10.172	55	5674377	99
3	stigmasta-5-en-3-ol	11.157	43	8267626	98

## 2.6 CONCLUSIONES

- Se logró la extracción de las moléculas adsorbidas en la matriz de carbón activado proveniente del Ingenio Manuelita, haciendo uso de la planta de extracción semi-piloto.
- Las técnicas cromatográficas como: la cromatografía en columna automatizada y la cromatografía preparativa permiten alcanzar niveles óptimos de purificación de moléculas orgánicas.
- Además de las moléculas que aportan color al azúcar como los flavonoides, en la caña de azúcar se hallan lípidos insaponificables como los esteroides.

## 2.7 RECOMENDACIONES

- Establecer una técnica de extracción, ya sea variando las condiciones de la planta o la polaridad de los solventes utilizados, con el fin de excluir algunas moléculas con respecto a lo que se quiera purificar y así partir de una matriz menos compleja de compuestos.
- Tener accesibilidad a un equipo liofilizador, con el fin de facilitar las técnicas de purificación, ya que el extracto obtenido contenía agua, lo que dificultaba en muchas ocasiones el montaje de la muestra en las columnas.
- Tener estandarizadas las técnicas para la purificación de moléculas similares estructuralmente, para facilitar el proceso de purificación de las mismas.

## 2.8 REFERENCIAS

- Montoya, G., et.al. (2014). Quantitation of trans-Aconitic Acid in Different Stages of the Sugar-Manufacturing Process. *AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY*.
- Echeverry, M. (2016). Aislamiento de compuestos aromáticos a partir de torres de decoloración de un ingenio azucarero (Tesis de pregrado). *Universidad Icesi, Santiago de Cali*.
- Asocaña. (07 de mayo de 2017). *Asocaña*. Santiago de Cali. Recuperado de: <http://www.asocana.org/publico/info.aspx?Cid=215>.
- Chen, J. (2006). *Manual del Azúcar de Caña*. México DF, México: Noriega Editores.
- McNAIR, H.M. and J.M. MILLER, Basic Gas Chromatography, ed. I. JOHN WILEY & SONS. 1997
- Assuncao, J, e. a. (2008). Sugar cane juice for the bioreduction of carbonyl compounds. *Jornal Of Molecular Catalysis*, 1-2.
- BRYCE T., M. S. (1967). ISOLATION OF ARUNDOIN AND SAWAMILLETIN FROM CUBAN SUGAR CANE WAX. *Department of Chemistry, University of Glasgow*.
- Cantrill, R. (2008). PHYTOSTEROLS, PHYTOSTANOLS AND THEIR ESTERS. *Chemical and Technical Assessment*.
- CENICAÑA. (2003). *cenicaña*. Obtenido de [http://www.cenicana.org/pop\\_up/fabrica/diagrama\\_obtencion.php](http://www.cenicana.org/pop_up/fabrica/diagrama_obtencion.php)
- Electrónica, J. c. (12 de 10 de 2017). *EcuRed*. Obtenido de <https://www.ecured.cu/Esterol>
- Engineering, P. i. (2014). Crystallization. *Crystallization*. Spring.
- FEDESARROLLO. (2010). *Impacto socioeconómico del sector azucarero colombiano en la economía del sector nacional y regional*. Bogotá: La Imprenta Editores S.A.
- GOODWIN, L. G. (1966). The Biosynthesis of Sterols in Higher Plants. *Department of Biochemistry and Agricultural Biochemistry*.
- Karabin, M. e. (2015). Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. *Biotechnology Advances*, 1064-1072.

- Lichtenthalera, H., J. S. (1997). Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a. *Federation of European Biochemical Societies*.
- Pereira, M., Z. S. (2010). Cloning, mechanistic and functional analysis of a fungal sterol C24-methyltransferase implicated in brassicasterol biosynthesis. *ELSEVIER*.
- MAHAJAN O, C. M. (1980). Surface-Treated Activated Carbon for Removal of Phenol. *Separation Science and Technology*.
- Martínez, A. (2002). Esteroles. *Universidad de Antioquia*.
- Martínez, J. G. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 2-6.
- Monedero, J. (2016). Identificación y caracterización de flavonoides por espectrometría de masas en melazas residuales de un ingenio azucarero. *Icesi*.
- Oliver, A. C. S. (2005). *EL LIBRO BLANCO DE ESTEROLES VEGETALES*. España.
- Phytochemistry. (1995). En G. A. Cordell, *Phytochemistry* (págs. 1585-1828). Board.
- Bladt, S. H. W. (1996). *Plant Drug Analysis*. Springer.
- Sanabria, J. L. (2013). Desarrollo de una metodología por UPLC para la cuantificación de flavonoides en el jugo de caña de azúcar durante diferentes etapas del proceso de fabricación de azúcar. *Icesi*.
- VALENCIA, J. P. (2008). ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA DE GASES. *Universidad Tecnológica de Pereira*.
- ISO, I. S. (2016). *ISO*. Obtenido de <https://www.isosugar.org>