

**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**

JULY PAULINE LONDOÑO SANABRIA

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO CIENCIAS QUÍMICAS
PROGRAMA QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
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**

JULY PAULINE LONDOÑO SANABRIA

Trabajo de grado

**TUTOR
GUILLERMO LEÓN MONTOYA**

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO CIENCIAS QUÍMICAS
PROGRAMA QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2013**

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. RESUMEN.....	3
2. ABSTRACT	4
3. INTRODUCCIÓN	5
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	6
5. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	7
6. OBJETIVOS	16
6.1 Objetivo General:.....	16
6.2 Objetivos específicos:.....	16
7. METODOLOGÍA.....	17
7.1 Marco Lógico:.....	17
7.2 Materiales y Equipos.....	18
<i>Muestras</i>	18
<i>Reactivos y Estándares</i>	18
<i>Equipos</i>	18
7.3 Preparación del Estándar Interno	19
7.4 Preparación de las muestras (extracción en fase sólida SPE)	19
7.5 Cromatografía líquida (UPLC)	19
7.6 Análisis Cuantitativo.....	20
8. RESULTADOS	21
8.1 Preparación de la muestra	21
8.2 Análisis Cuantitativo.....	21
9. DISCUSION DE RESULTADOS.....	35
9.1 Estándar interno.....	35
9.2 Preparación de las muestras	35
9.3 Cromatografía Líquida (UPLC).....	37
9.4 Análisis Cuantitativo.....	38

10.	CONCLUSIONES.....	42
11.	RECOMENDACIONES	43
12.	BIBLIOGRAFIA.....	44

ÍNDICE DE IMAGENES

<i>Imagen 1. Proceso productivo del azúcar y otros derivados de caña. Fuente: Ingenio Manuelita</i>	9
<i>Imagen 2. a. Estructura básica de flavonoides b. Espectro Uv característico de flavonoide. Fuente (Eva de Rijke, 2006)</i>	9
<i>Imagen 3. Tipos de flavonoide. Fuente: (Eva de Rijke, 2006)</i>	10
<i>Imagen 5. Derivado de Luteolina (Colombo, 2008)</i>	11
<i>Imagen 4. Schaftosina (Derivado de apigenina) (Colombo, 2008)</i>	11
<i>Imagen 7. Derivado de Tricina (Colombo, 2008)</i>	12
<i>Imagen 6. Orientina (Colombo, 2008)</i>	12
<i>Imagen 8. Etapas de las Extracción en Fase Sólida. A. Acondicionamiento. B Carga. Lavado. D. Elución (Sigma-Aldrich, 2012)</i>	14
<i>Imagen 9. a. Cromatograma muestra extracto. b Espectros Uv de señales correspondientes a flavonoides con las bandas características.</i>	21
<i>Imagen 10. a. Cromatograma Muestra Diluido. b. Espectros Uv de señales correspondientes a flavonoides con las bandas características.</i>	23
<i>Imagen 11. a. Cromatograma muestra alcalizado. b. Espectros Uv de señales correspondientes a flavonoides con las bandas características.</i>	24
<i>Imagen 12.a. Cromatograma muestra clarificado. b. Espectros Uv de señales correspondientes a flavonoides con las bandas características</i>	25
<i>Imagen 13. a. Cromatograma muestra filtrado. b. Espectros Uv de señales correspondientes a flavonoides con las bandas características.</i>	26
<i>Imagen 14. a. Cromatograma muestra jarabe. b. Espectros Uv de señales correspondientes a flavonoides con las bandas características.</i>	27
<i>Imagen 15. a. Cromatograma muestra Miel. b. Espectros Uv de señales correspondientes a flavonoides con las bandas características.</i>	29
<i>Imagen 16. Estructura química y Espectro Uv Diosmina</i>	35
<i>Imagen 17. Estructura Química Cartucho Strata X</i>	36
<i>Imagen 18. Flavonoide mayoritario (derivado apigenina)</i>	38
<i>Imagen 19. Flavonoide identificado como Orientina</i>	39
<i>Imagen 20. Flavonoide derivado de tricina</i>	39

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Índice de importancia en el mercado mundial del Azúcar. Fuente: Asocaña, 2012</i>	7
<i>Tabla 2. Máximos de absorción Uv características de flavonoides reportados en caña de azúcar</i>	12
<i>Tabla 3. Máximos de absorción Uv características de flavonoides reportados en caña de azúcar.</i>	13
<i>Tabla 4. Matriz Marco Lógico</i>	17
<i>Tabla 5. Gradiente de Solventes</i>	19
<i>Tabla 6. Resultados evaluación de solución de lavado. Donde se observa que a medida que aumenta el porcentaje de solvente orgánico, mejora la recuperación de los flavonoides.</i>	21
<i>Tabla 7. Flavonoides muestra Extracto</i>	31
<i>Tabla 8. Flavonoides en muestra Diluido</i>	31
<i>Tabla 9. Flavonoides muestra Alcalizado</i>	32
<i>Tabla 10. Flavonoides muestra Clarificado</i>	32
<i>Tabla 11. Flavonoides muestra Filtrado</i>	32
<i>Tabla 12. Flavonoides muestra Jarabe</i>	33
<i>Tabla 13. Flavonoides muestra Miel</i>	33

ÍNDICE DE GRAFICAS

<i>Grafica 1. Comparación de eficiencia columnas hidrofóbicas.</i>	15
<i>Grafica 2. Flavonoides totales.</i>	34
<i>Grafica 3. Distribución de flavonoides en las diferentes muestras del proceso de fabricación del azúcar.</i>	40

1. RESUMEN

Se ha identificado en el contenido de la caña de azúcar la presencia de flavonoides, un grupo de metabolitos secundarios de las plantas a los cuales se les confiere una gran capacidad antioxidante. Actualmente Colombia es uno de los países más importantes del mercado azucarero a nivel mundial y sus cultivos se encuentran concentrados en el departamento del Valle del Cauca, abarcando más de doscientas mil (200.000) hectáreas; sin embargo, los ingenios azucareros tienen poca información sobre estos compuestos y es necesario realizar investigaciones para empezar aprovecharlos.

Este proyecto realiza la valoración del contenido de flavonoides en el jugo de caña de azúcar en cada una de las etapas del proceso de producción del azúcar, lo que permite diagnosticar e identificar sobre cuál de estas contiene mayor concentración de estos metabolitos, y así proponer el aprovechamiento de estos compuestos sin ver afectada la fabricación de los principales productos derivados de la caña (azúcar, panela, etanol, etc.); lo que podría significar mayores ingresos en la economía departamental.

Con el objetivo de identificar la presencia de flavonoides, se desarrolló una metodología de valoración por estándar interno en la cual como tratamiento de la muestra se implementó la técnica de extracción en fase sólida (SPE) y para el análisis cuantitativo se utilizó cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento (UPLC) acoplado a un detector de arreglo de diodos Uv (PDA UV).

Los resultados del contenido de flavonoides totales en los diferentes jugos, jarabes extractos y mieles fueron: Extracto: 99mg/L, Alcalizado: 48mg/L, Clarificado 77mg/L, Diluido 116mg/L, Filtrado, 22mg/L, Jarabe 2808mg/L, Miel 14404mg/L. Estos resultados permiten establecer las mejores matrices para la extracción y aprovechamiento de estos compuestos en otros sectores económicos relacionados.

Palabras Claves: Flavonoides, Jugo de caña de Azúcar, UPLC, SPE

2. ABSTRACT

In the content of sugarcane has been identified the presence of flavonoids. The flavonoid is a secondary group of plants, which ones have a high antioxidant capacity. Currently, Colombia is one of the most important countries in the global sugar market and its crops are concentrated in the department of Valle del Cauca, covering more than two hundred thousand (200,000) acres. However, the sugar mills have little information about these compounds. Reach is needed to begin to take advantages of them.

This project makes the valuation of the content of flavonoids in the sugarcane juice in each of the stages of the sugar production process, allowing to diagnose and identify which of these have higher concentration of these metabolites; and thus, propose the use of these compounds without seeing affected the production of the main products derived from cane (sugar, brown sugar, ethanol, etc..) which could mean higher income in the economy department.

With the objective to identify the presence of flavonoids in the sugar cane, it has been developed an evaluation methodology for internal standard which, as treatment of the sample, it was implemented the technique: The Solid Phase Extraction (SPE). For quantitative analysis, it was used Ultra High Performance Liquid Chromatography (UPLC) coupled to a diode array detector UV (UV PDA).

The results of total flavonoids content in different juices, syrups and honey extracts were: Extract: 99mg / L, alkalized: 48mg / L, Clarified 77mg / L, Diluted 116mg / L, Filtering, 22mg / L, Syrup 2808mg / L , Honey 14404mg / L. These results allow establishing the best matrices for the extraction and use of these compounds in other related economic sectors.

Keywords: Flavonoids, sugarcane juice, UPLC, SPE

3. INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar *Saccharum officinarum* (variedad cultivada en Colombia), es una planta perteneciente a la familia de las *poáceas* y hoy en día es el cultivo de mayor producción en el mundo. De acuerdo con los datos de la FAO (Food and Agriculture Organization), en 2010 se produjeron 1.685 millones de toneladas de caña de azúcar, el doble de la producción de maíz, que es el segundo producto agrícola del mundo en importancia (Asocaña, 2012)

Dada la gran importancia de la caña de azúcar tanto a nivel nacional como internacional, se están realizando diferentes investigaciones para obtener el mayor provecho posible de estas plantaciones. Además de los azúcares presentes en el jugo, existen otros constituyentes químicos de naturaleza orgánica e inorgánica, representados por sales de ácidos orgánicos, minerales, polisacáridos, proteínas, compuestos fenólicos entre otros; algunos de estos, como los flavonoides (un tipo de compuestos fenólicos) presentan diferentes actividades farmacológicas las cuales han despertado el interés de la industria azucarera al pensar en la posibilidad de obtener nuevos productos a partir de estos cultivos, sin la necesidad de afectar los procesos productivos ya establecidos y sin representar alto costo para la industria.

Para dar una indicación general de la atención dedicada al estudio de los flavonoides en los últimos 5 años, más de 300 artículos fueron escritos en el análisis de las plantas, principalmente para caracterizar y cuantificar sus componentes por razones medicinales o taxonómicas. Los flavonoides son metabolitos secundarios que están presentes en la caña de azúcar y son considerados como los pigmentos naturales más abundantes e importantes en esta, ya que son útiles como marcadores bioquímicos y presentan propiedades químicas favorables para el proceso azucarero.

Este proyecto tiene como objetivo valorar el contenido de flavonoides en el jugo de caña de azúcar en cada una de las etapas del proceso industrial de la fabricación del azúcar; Para lo cual se desarrolló una metodología de valoración por estándar interno, y para tratamiento de la muestra se implementó la técnica de Extracción en Fase Sólida (SPE) y en el análisis cuantitativo se utilizó Cromatografía Líquida de Ultra- Alto Rendimiento (UPLC) acoplado a un detector matriz colector de fotodiodos Uv (PDA UV).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las plantas son una fuente abundante de compuestos químicos y sustancias activas, que han sido usadas por el hombre desde hace muchos años; actualmente la extracción de diferentes metabolitos secundarios de las plantas ha sido de importante uso para la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica dado que a estos se les han atribuido diferentes actividades farmacológicas.

Colombia es uno de los países más importantes del mercado azucarero a nivel mundial y sus cultivos se encuentran concentrados en el departamento del Valle del Cauca, abarcando 47 municipios y 223.905 hectáreas (Asocana, 2012). A partir de estos cultivos se han generado importantes productos para uso humano, el azúcar, la panela, el biocombustible, el etanol son algunos de ellos, que son de gran relevancia para la economía departamental y Nacional; sin embargo, existen otros compuestos presentes en la caña de azúcar que aún no han sido aprovechados.

Los flavonoides son un tipo compuestos que por su estructura química con grupos hidroxilo, tienen la propiedad de quelación de algunos metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante (Martínez, 2002). Es por esta razón que en el hombre desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo y tienen efectos terapéuticos en diversas patologías; sin embargo el organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos (Colombo, 2006)

En investigaciones recientes se ha identificado en la caña de azúcar la presencia de flavonoides (Colombo, 2006) (Colombo, 2008) (Li X. S., 2010) (Ordoñez, 2009), no obstante los datos reportados con respecto a la cantidad presente de estos compuestos en la caña de azúcar y sus derivados son pocos, lo que genera la necesidad de hacer más investigaciones respecto a estas plantaciones, sus productos y los procesos industriales llevados a cabo.

Este trabajo valora el contenido de Flavonoides en el jugo de caña de azúcar en cada una de las etapas del proceso productivo del azúcar, lo que permite identificar cual producto intermedio presenta mayor concentración de estos, para en estudios posteriores poder aprovechar estas moléculas sin que se vea afectada la producción de azúcar y otros derivados de la caña, generando así mayores beneficios para la economía departamental y nacional.

5. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

La industria Azucarera genera gran impacto socioeconómico en Colombia puesto que este se encuentra entre los países más importantes del mercado azucarero mundial, Su producción está concentrada en el departamento del Valle del Cauca (*ver Tabla 1*) y durante los últimos diez años el área neta sembrada en caña de azúcar se ha mantenido relativamente constante, pasando de 205 mil hectáreas en el 2002 a 224 mil hectáreas en el 2012 (Asocaña, 2012). No obstante para el 2007 los ingenios azucareros emplearon alrededor de 6.643 trabajadores, y mientras que el salario promedio mensual por trabajador de los ingenios azucareros fue de \$2,6 millones, el salario promedio de las industrias manufactureras fue \$1,3 millones de pesos mensuales (Fedesarrollo, 2010).

Tabla 1. Índice de importancia en el mercado mundial del Azúcar. Fuente: Asocaña, 2012

	Índice	Puesto
Brasil	16,75	1
UE	9,25	2
India	8,25	3
China	4,75	4
Tailandia	4,25	5
EE.UU.	4,00	6
Rusia	3,25	7
Australia	3,00	8
Indonesia	2,25	9
México	2,00	10
Pakistán	1,75	11
Sudáfrica	1,50	12
Emiratos Árabes	1,50	13
Colombia	1,25	14
Egipto	1,25	15
Irán	1,25	16
Rep. Corea	1,25	17
Malasia	1,25	18
Guatemala	1,00	19

El proceso de fabricación del azúcar consta de varios pasos (*ver imagen 1*) y en cada uno de estos se van transformando y eliminando diferentes componentes que pueden ser usados para en productos de gran interés para las industrias cosméticas, farmacéuticas y alimenticias. Las etapas del proceso son:

“Preparación de la caña, Romper o desfibrar las celdas de los tallos por medio de picadoras y desfibradoras.

Molienda: Proceso de extracción de la sacarosa que consiste en pasar la caña preparada por un tándem de molinos y mediante presión se extrae el jugo de la caña. Cada molino está equipado con una turbina de alta presión. El bagazo del último molino es usado como combustible en las calderas para generar vapor o como materia prima en la elaboración de papel. El jugo proveniente de los molinos pasa a los tanques de alcalización para regular su acidez y evitar la destrucción de la sacarosa. Este proceso ayuda a sedimentar la mayor parte de las impurezas que trae el jugo.

Calentamiento y clarificación: El jugo alcalizado se calienta hasta una temperatura cercana a la de ebullición (105°C) y se pasa a los clarificadores, proceso en el cual se retiran los sólidos insolubles del jugo, quedando el jugo claro. Las impurezas sedimentadas pasan a los filtros rotatorios al vacío, los cuales están cubiertos con finas mayas metálicas que dejan pasar el jugo y retienen la cachaza que es utilizada como abono en la plantación.

Evaporación y Cristalización: El jugo clarificado pasa a evaporación donde se le extrae el 80% de agua hasta obtener jarabe. Luego pasa a la cristalización de la sacarosa, que se lleva a cabo en tachos al vacío donde se obtiene una mezcla de cristales de sacarosa y miel. Los cristales de sacarosa se separan de la miel en centrifugas, estas mieles son utilizadas como materia prima en la producción de alcohol etílico. El azúcar retenido en las centrifugas se disuelve con agua caliente y recibe el nombre de licor o Jugo diluido el cual se envía a la refinería para continuar el proceso (Manuelita S.A, 2013)

Los flavonoides son una familia de metabolitos secundarios de las plantas que cumplen la función de dar resistencia a la fotooxidación de la luz ultravioleta del sol y dar color a estas o a sus flores (Jeffrey B. Harborne, 2000). Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpropanos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos aromáticos (A y B) ligados a través de una cadena C3 de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (*ver imagen 2.a*).

Imagen 1. Proceso productivo del azúcar y otros derivados de caña. Fuente: Ingenio Manuelita

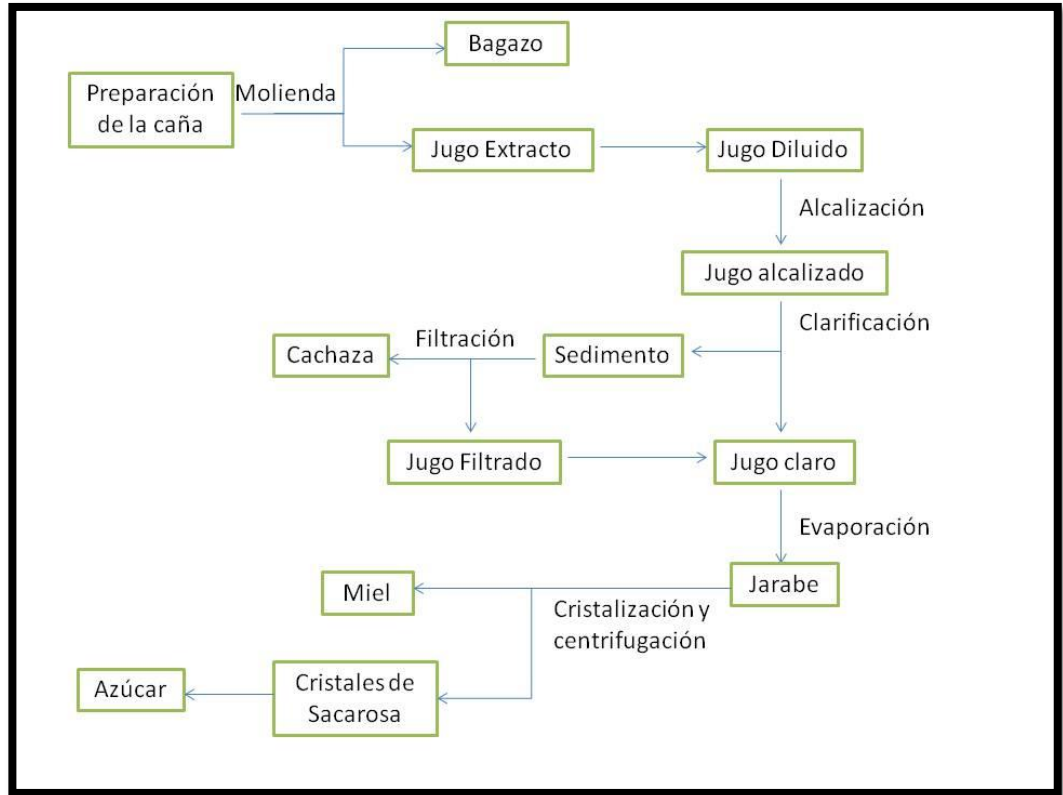
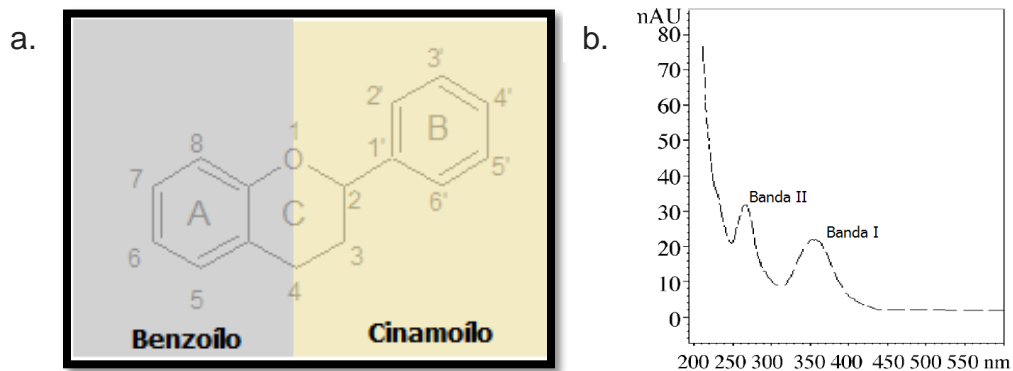


Imagen 2. a. Estructura básica de flavonoides b. Espectro Uv característico de flavonoide. Fuente (Eva de Rijke, 2006)

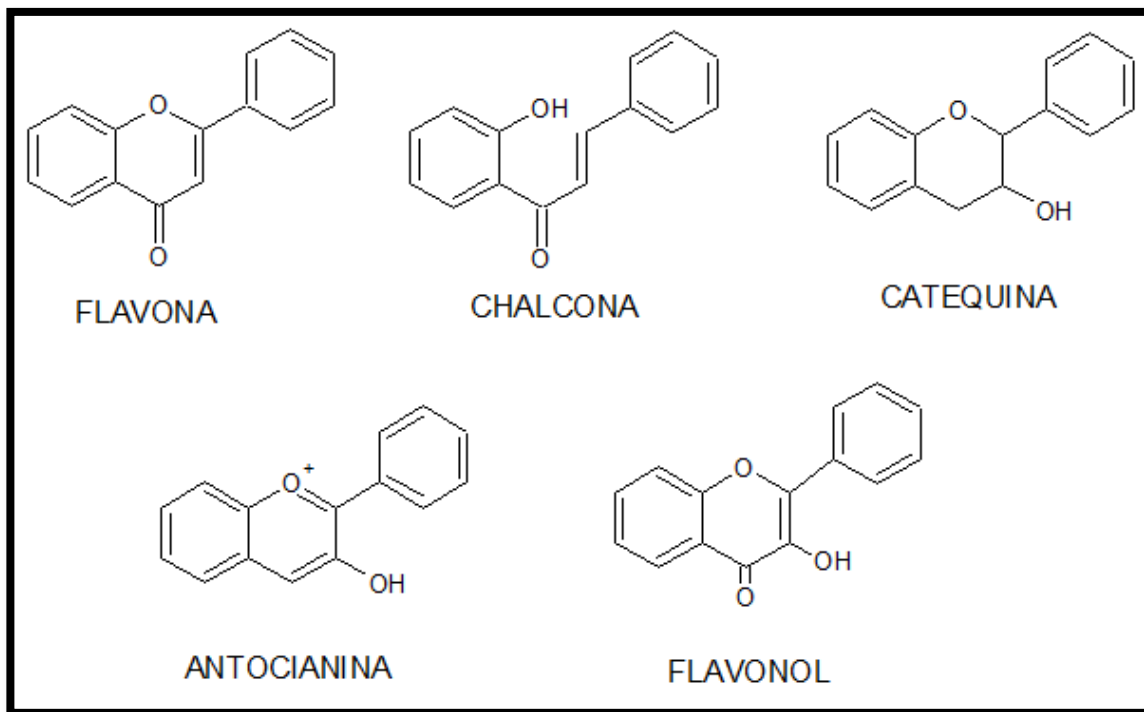


Como se describió anteriormente, todos los flavonoides contienen al menos un anillo aromático, lo que hace que absorban eficientemente la luz ultravioleta. Su estructura se encuentra subdividida en dos porciones, la función cinamoilo

(proveniente de la ruta del ácido shikimico) y la porción benzoílo (proveniente de la ruta del acetato) que le atribuyen a la molécula sus características espectrales. La banda II que se encuentra en el rango de 240 a 285 nm, se debe al anillo aromático A, funcionalidad benzoílo; y La banda I de mayor longitud de onda, en el rango de 300-390nm, se encuentra asociada a la funcionalidad de la parte cinamoílo y varía de acuerdo al patrón de sustitución y la conjugación del anillo C (ver imagen 2)

Los flavonoides se han clasificado de acuerdo a las variantes estructurales que presenta la cadena central (ver Imagen 3): Chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, antocianidinas, catequinas, etc. En las plantas, los flavonoides están presentes a menudo como O- o C- glucósidos. Los O-glucósidos tienen sustituyentes de azúcar unidos a un grupo hidroxilo de la aglicona, normalmente se encuentra en la posición 3 o 7, mientras que la C-glucósidos tienen grupos de azúcar unido a un carbono de la aglicona, normalmente 6-C o C-8 (Eva de Rijke, 2006). Los flavonoides se conocen como glucósidos cuando contienen uno o más grupos de azúcar y como agliconas cuando ningún grupo azúcar está presente.

Imagen 3. Tipos de flavonoide. Fuente: (Eva de Rijke, 2006)



El estudio de los flavonoides en la caña de azúcar se viene realizando desde hace unos años en países dependientes de la economía azucarera como lo son Brasil, China y Colombia, donde se han realizado previas cuantificaciones e identificación de flavonoides en caña de azúcar. Sin embargo es importante resaltar que existen diferentes variedades de caña y que Brasil y Colombia cultivan la misma *S. officinarum*, pero en China se cultiva la variedad *S. sinensis* Roxb.

En Colombia en un estudio sobre la calidad de la caña de azúcar se describe que las principales flavonas presentes en la caña de azúcar son las derivadas de tricina, apigenina y luteina, (ver imagen 4, 5 y 6) los cuales son compuestos colorantes de carácter ligeramente ácido que persisten durante la etapa de clarificación (proceso industrial del azúcar) (Larrahondo, 1995).

Años después en la Universidad del Valle se realiza un estudio del contenido de compuestos fenólicos en diferentes variedades de caña de azúcar (Ordoñez, 2009) donde se reporta que la cantidad de flavonoides totales en las hojas de caña de azúcar utilizando la metodología HPLC oscila entre 0.020 mg/g y 1.39 mg/g acuerdo a la variedad de caña. En las yemas de caña el contenido de fenoles resultó estar alrededor de 1.5 a 2.0 veces más alto que las hojas de caña en las variedades más destacadas, Mientras que los tejidos vegetales con bajas concentraciones de fenoles fueron las raíces. Y por el método espectrofotométrico UV/VIS, muestra que el contenido total de flavonoides en las variedades evaluadas fue de 33 a 449 mg/100 g equivalentes en rutina. Con un promedio de 321 mg/100 g para hojas, de 33 a 108 mg/100 g, con un promedio de 57 mg/100 g, para raíces y de 98 a 165 mg/100g, con un promedio de 142 para yemas.

Imagen 5. Schaftosina (Derivado de apigenina) (Colombo, 2008)

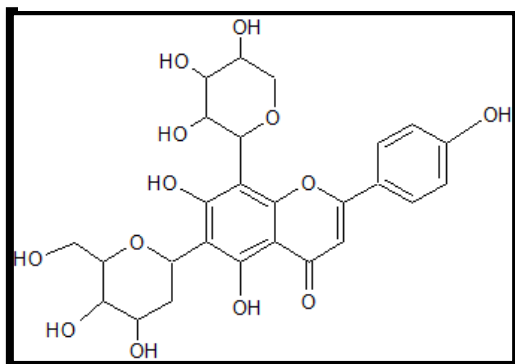
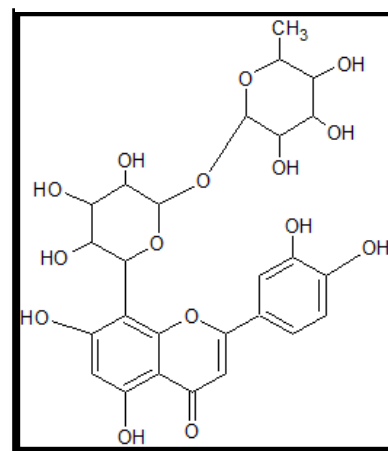


Imagen 4. Derivado de Luteolina (Colombo, 2008)



En Brasil en la Universidad de Sao Paulo se ha realizado la identificación de algunas de las moléculas de los flavonoides presentes en caña de azúcar mediante el uso de cromatografía líquida (HPLC) acoplada a espectrometría de masas (Colombo, 2006, 2008, 2005) (ver imagen 4,5,6 y7) y se reporta la presencia de flavonoides como O-glicosidos y C-glicosidos, con máximos de absorción Uv característicos (ver tabla 2). También se ha realizado la cuantificación del contenido de flavonoides en hojas, bagazo y jugo comercial de caña (Colombo, 2006) y se obtuvo que el contenido en hojas y bagazo es alrededor de 1,70 y 0,38 mg de flavonoides/g de material vegetal hojas y bagazo respectivamente; y en los jugos comerciales alrededor de 0,6 mg de flavonoides/mL.

Imagen 7. Orientina (Colombo, 2008)

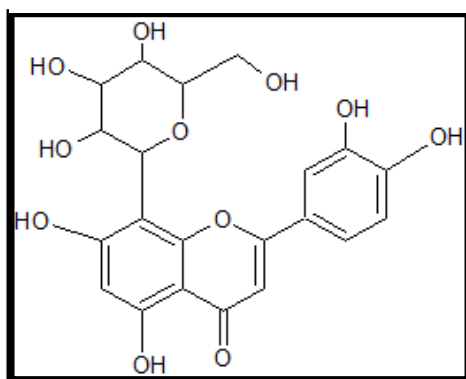


Imagen 6. Derivado de Tricina (Colombo, 2008)

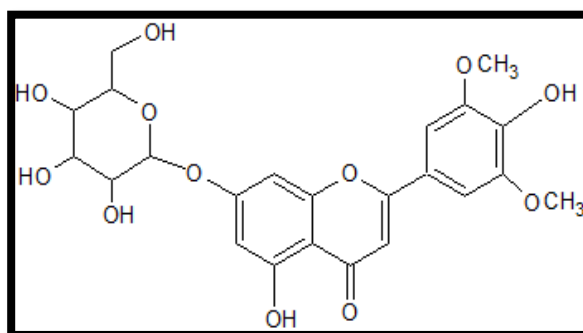


Tabla 2. Máximos de absorción Uv características de flavonoides reportados en caña de azúcar (Colombo, 2005)

	Flavonoids	UV spectra (nm)	
		Band I	Band II
1	Diosmetin-8-C-glycoside-arabinoside	321	270
2	Diosmetin-8-C-glicoside	350	260
3	Tricin-7-O-rhamnosilgalactoronide	328	270
4a, 4b	Tricin-4'-O-(<i>threo</i> or <i>erythro</i> guaiacylglyceryl) ether-7-O-glucopyranoside	340	270
5a, 5b	Tricin-4'-O-(<i>threo</i> or <i>erythro</i> guaiacylglyceryl) ether	348	260

Tabla 3. Máximos de absorción Uv características de flavonoides reportados en caña de azúcar. (Colombo, 2006)

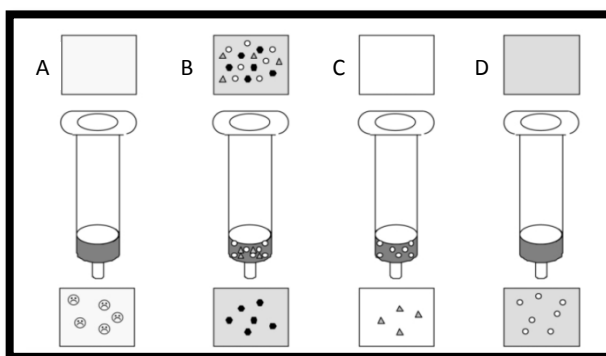
	Compound	Band I	Band II
1	Tricin-7- <i>O</i> -neohesperidoside	351	265
2	Luteolin-8- <i>C</i> -(rhamnosylglucoside)	348	260
3	Vitexin	334	270
4	Orientin	324	242
5	Tricin-7- <i>O</i> -glycoside	346	253
6/7	Schaftoside/isochaftoside	330	269
8	4',5'-Dimethyl-luteolin-8- <i>C</i> -glucoside	351	270

Por su parte en China se cuantificó la cantidad de flavonoides y antocianinas totales en muestras vegetales de *S. Sinensis Roxb* por medio del método HPLC (Li X. S., 2010). Donde el contenido de flavonoides en las hojas de la caña de azúcar, alrededor de 3,85 mg de flavonoides/g de material vegetal seco, era considerablemente más alto que los reportados en las hojas de caña de azúcar en Brasil. Por otra parte, en la *Universidad Sichuan*, por metodología HPLC, se realizó un análisis cuantitativo de flavonoides y antocianinas durante el proceso industrial de fabricación del azúcar a partir de la caña de azúcar *S. Sinensis Roxb*, (Li X. S., 2011), estudio similar al que se desarrolla en este proyecto. En este se reporta que la mayor cantidad de flavonoides se encuentra en el extracto crudo del jugo de caña de azúcar, y que a medida que avanza el proceso industrial la cantidad de flavonoides en jugo va disminuyendo.

Para la cuantificación de compuestos, existen diversas técnicas de análisis cuantitativo: método de adiciones, de estándar externo, de estándar interno, de normalización interna, y de dilución isotópica. El método de estándar interno es el más adecuado para esta investigación, ya que consiste en añadir a la muestra una cantidad conocida de una sustancia patrón llamada estándar interno, la cual no está presente en la muestra (es decir diferente a los analitos a determinar), pero de gran analogía química a las especies que se desean analizar y que no reacciona con ninguno de estos. Las señales de los analitos se comparan con la señal del patrón interno, en función de la concentración en la que se encuentran estos, se extrapolan los datos para de este modo obtener la concentración de los analitos.

Para el desarrollo de este método es necesario realizar una preparación de las muestras antes de llevarlas al equipo de separación y análisis. La extracción en Fase sólida (SPE) es un método que utiliza una fase sólida y una fase líquida para aislar uno, o un tipo, de analito a partir de una solución (Sigma-Aldrich, 2012). SPE es una técnica más eficiente que el tratamiento por extracción líquido-líquido, ya que SPE permite mayor recuperación de los compuestos de interés, es rápida, no necesita del uso de objetos de vidrio, la utilización de solventes es reducida, y puede ser automatizada, lo que garantiza resultados más reproducibles. El procedimiento general de SPE consiste en acondicionar el cartucho, cargar una solución en la fase sólida, lavar los componentes no deseados, y luego eluir los analitos de interés con otro solvente (*ver imagen 8*)

Imagen 8. Etapas de las Extracción en Fase Sólida. A. Acondicionamiento. B Carga. Lavado. D. Elución (Sigma-Aldrich, 2012)

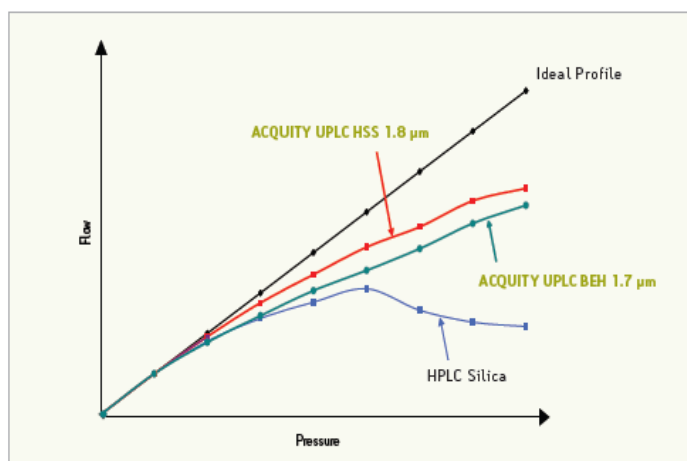


La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC High Performance Liquid Chromatography) es una de las técnicas de separación más ampliamente usadas, es idónea para separación de especies no volátiles o termolábiles y de gran aplicabilidad a sustancias de interés en la industria, la ciencia y la sociedad, tales como proteínas aminoácidos, fármacos, ácidos nucleicos, carbohidratos, compuestos fenólicos entre muchos otros (Skoog, Holler, & Crouch, 2008). Muchos artículos sobre HPLC se han publicado en los últimos años, sin embargo el tiempo de corrido de las muestras por esta técnica es muy largo y el avance tecnológico se ha visto en la necesidad de buscar nuevos equipos que apliquen los mismos principios cromatográficos pero que disminuyan los tiempos de análisis. La cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia, UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) realiza la separación de moléculas utilizando columnas de relleno con partículas más pequeñas lo que lleva a tiempos de corridos más corto, con igual o superior resolución (Swartz, 2005) .

La columna HSS T3 (High Strength Silica) es una fase de alquilo C18 trifuncional como ligando, lo que a diferencia de una columna C18 normal, esta es diseñada

para retener y separar fuera de moléculas hidrofóbicas, moléculas orgánicas polares y solubles en agua; además de presentar compatibilidad con fases móviles acuosas. Al igual que una columna C18 soporta altas presiones (15000psi/1000bar). Y su proceso de rematado terminal T3 característica es mucho más eficaz que el rematado terminal trimetil silano usado tradicionalmente en otras columnas. Este tipo de columna presenta el perfil más cercano al comportamiento ideal de una columna UPLC (Waters, 2009).

Grafica 1. Comparación de eficiencia columnas hidrofóbicas. (Waters, 2009)



Los detectores UV, VIS, y el PDA se clasifican como detectores de absorbancia y proporcionan una buena sensibilidad para compuestos que absorben luz. El Detector de UV es un detector muy comúnmente utilizado para el análisis por cromatografía líquida, sin embargo este solo permite elegir longitudes de onda entre 195-370 nm. Hay detectores que proporcionan la selección de longitud de onda más amplia, que abarca tanto las gamas UV y VIS (195 ~ 700 nm) llamado detector UV / VIS. El Detector matriz colector de fotodiodos permite detectar y cuantificar concentraciones bajas de analitos en las muestras y comparar los espectros a distintas longitudes de onda (200 a 800 nm) y en un amplio intervalo de concentraciones con una sola inyección de la muestra, lo que hace más rápido los análisis, ya que en otros detectores las longitudes de onda se seleccionan antes de la inyección (Skoog, Holler, & Crouch, 2008).

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General:

Valorar el contenido de flavonoides en el jugo de caña de azúcar en cada parte del proceso de producción del azúcar.

6.2 Objetivos específicos:

- Implementar la SPE (extracción en fase sólida) como método para el tratamiento de la muestras de jugo.
- Identificar los parámetros adecuados para la cuantificación por cromatografía líquida de alta eficiencia (UPLC, Ultra Performance Liquid Chromatography).

7. METODOLOGÍA

7.1 Marco Lógico:

El desarrollo del presente proyecto se basó en siguiente esquema general de trabajo. *Tabla 4.*

Tabla 4. Matriz Marco Lógico

Objetivos General Valorar el contenido de flavonoides en el jugo de caña de azúcar en cada parte del proceso de producción del Azúcar.		
Objetivo específico 1: Implementar SPE (Extracción en fase sólida) como método para el tratamiento de la muestra.		
Actividad	Indicadores	Supuestos
Identificar el mejor cartucho para la extracción.	Trabajar con cartucho que brinde resultados eficientes	Se dispone del cartucho que mayor recuperación del analito presenta.
Determinar el mejor solvente o mezcla de solvente a utilizar en cada paso de la extracción por SPE.	Encontrar el solvente adecuado para acondicionar el cartucho.	Se dispone de los solventes adecuados.
	Encontrar el solvente adecuado para realizar el lavado.	
	Encontrar el solvente adecuado para realizar la elución de los analitos.	
Evaluar si el pH tiene influencia en la metodología	El pH influencia en la SPE	Se dispone de soluciones ácidas y básicas que permitan variar el pH.
	El pH no influencia en la SPE	
Objetivo Especifico 2: Identificar los parámetros adecuados para la cuantificación por cromatografía líquida de ultra eficiencia (UPLC, Ultra Performance Liquid Chromatography).		
Actividad	Indicadores	Supuestos

Determinar cuál es la mejor fase móvil o gradiente de solventes para obtener separación de los flavonoides.	Identificar fase móvil con las propiedades adecuadas para eluir los analitos.	Se dispone de los solventes adecuados.
Determinar los parámetros adecuados para obtener un corrido óptimo	El flujo de la fase móvil es el adecuado.	Se dispone del equipo UPLC.
	La cantidad de inyección de la muestra es adecuada.	
	Identificar el tiempo de corrido óptimo.	
Identificar flavonoides por sus bandas de absorción.	Espectros Uv con bandas de absorción características de los flavonoides.	Disponer de detector Uv en el UPLC.
	Espectros Uv Con bandas de absorción diferentes a las características de los Flavonoides.	

7.2 Materiales y Equipos

Muestras

Las muestras consistieron en jugo de caña de azúcar de siete (7) diferentes etapas del proceso de producción del azúcar, las cuales fueron donadas por el Ingenio Manuelita (ingenio azucarero de la región) del proceso productivo del día 26 de octubre de 2012.

Reactivos y Estándares

Acetonitrilo grado HPLC, metanol grado HPLC, ácido Fórmico grado HPLC, DMSO grado HPLC, agua desionizada (Equipo Sartorius stedim Biotech)

Estándar Interno de Diosmina con potencia del 96% donado por Tecnoquímicas.

Equipos

UPLC Waters–Acquity H-Class con detector PDA. RapidVap

7.3 Preparación del Estándar Interno

Se preparó una solución madre de 1mg/ml en DMSO y a partir de esta se realizó una solución estándar de diosmina 50ppm en DMSO.

7.4 Preparación de las muestras (extracción en fase sólida SPE)

Se tomaron las muestras correspondientes a jugo Alcalizado, Clarificado, Diluido, Extracto, y Filtrado y se filtraron por membranas de 0.22micras. Las muestras correspondientes a Jarabe y Miel se les realizaron una dilución en agua 1 en 5 y 1 en 10 respectivamente.

Para la extracción en fase sólida de las muestras se acondicionó el cartucho (STRATA-X 33 μ m 200mg/3mL de Phenomenex) previamente con 1,0 ml de metanol y 1,0 ml de agua. Luego se realizó la carga de las muestras (2ml). Los compuestos de interferencia se eluyeron en 3,0 ml de agua y las fracciones flavonoides se obtuvieron mediante elución en 2,0 ml de metanol. Los extractos fueron llevados a sequedad en el equipo RapidVap.

Las muestras fueron re-suspendidas en filtradas por membrana 0,22 y posteriormente inyectadas en el equipo UPLC. Las muestras se prepararon y analizaron por triplicado.

7.5 Cromatografía líquida (UPLC)

En el análisis por UPLC se empleo ácido fórmico en agua al 0,05% (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B) con un flujo de 0.4 ml/min a 40°C, y el gradiente mostrado en la siguiente tabla

Tabla 5. Gradiente de Solventes

Tiempo (Minutos)	%A	%B
0.50	99	1
7,00	80	20
11,00	65	35
11,10	35	65
12,00	0,0	100

Se utilizó la columna Acquity UPLC HSS T-3 1.8um 2.1 x 100mm. Se inyectaron 3 μ L de cada muestra. Finalmente la detección se realizó a una longitud de onda de 350nm.

7.6 Análisis Cuantitativo

La cuantificación fue llevada a cabo mediante integración de los picos con el software Empower 3.0 usando el método de estándar interno. El área de los picos se representa en los siguientes resultados, y la correspondiente concentración de flavonoides se calculó sobre la base de la concentración del estándar de diosmina adicionado a cada muestra, los resultados calculan como flavonoides totales (expresado como diosmina *mg*)/L de jugo de caña de azúcar.

8. RESULTADOS

8.1 Preparación de la muestra

En el análisis de las mejores condiciones para el tratamiento de la muestra por SPE se realizó un experimento para evaluar la solución que usada en la etapa de lavado presentó mayor recuperación de los compuestos de interés.

Tabla 6. Resultados evaluación de solución de lavado. Donde se observa que a medida que aumenta el porcentaje de solvente orgánico, mejora la recuperación de los flavonoides.

	AUC*	Recuperación (mg/L)
Metanol 100%	309	0,052
Metanol 50%	161424	27,216
Metanol 10%	314148	52,966

* **AUC:** Área bajo la curva.

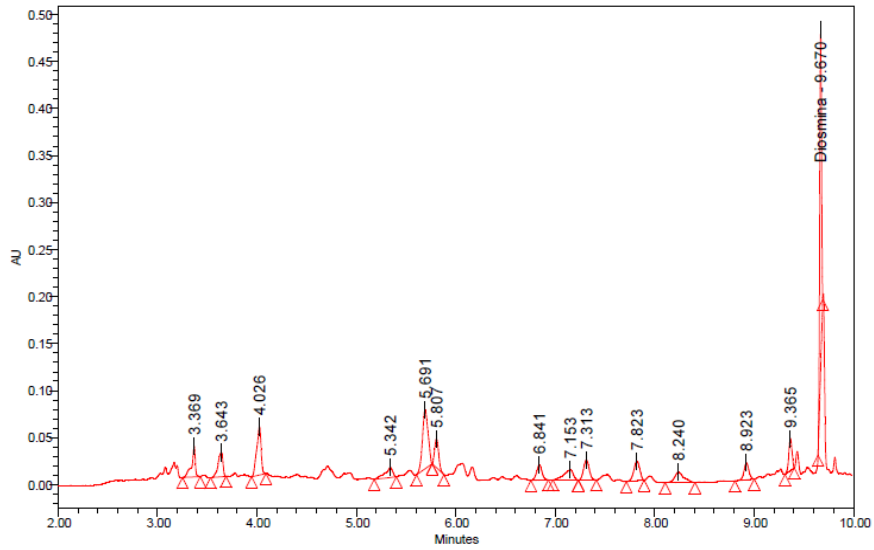
8.2 Análisis Cuantitativo

Aplicando la metodología ya antes descrita se obtuvo para las muestras de cada etapa del proceso de fabricación del azúcar un cromatograma con corridos de doce (12) minutos a una longitud de onda de 350nm.

A continuación se presentan los cromatogramas obtenidos y los espectros Uv de las señales que por sus características, corresponden a flavonoides.

Imagen 9. a. Cromatograma muestra extracto. b Espectros Uv de señales correspondientes a flavonoides con las bandas características.

a.



b.

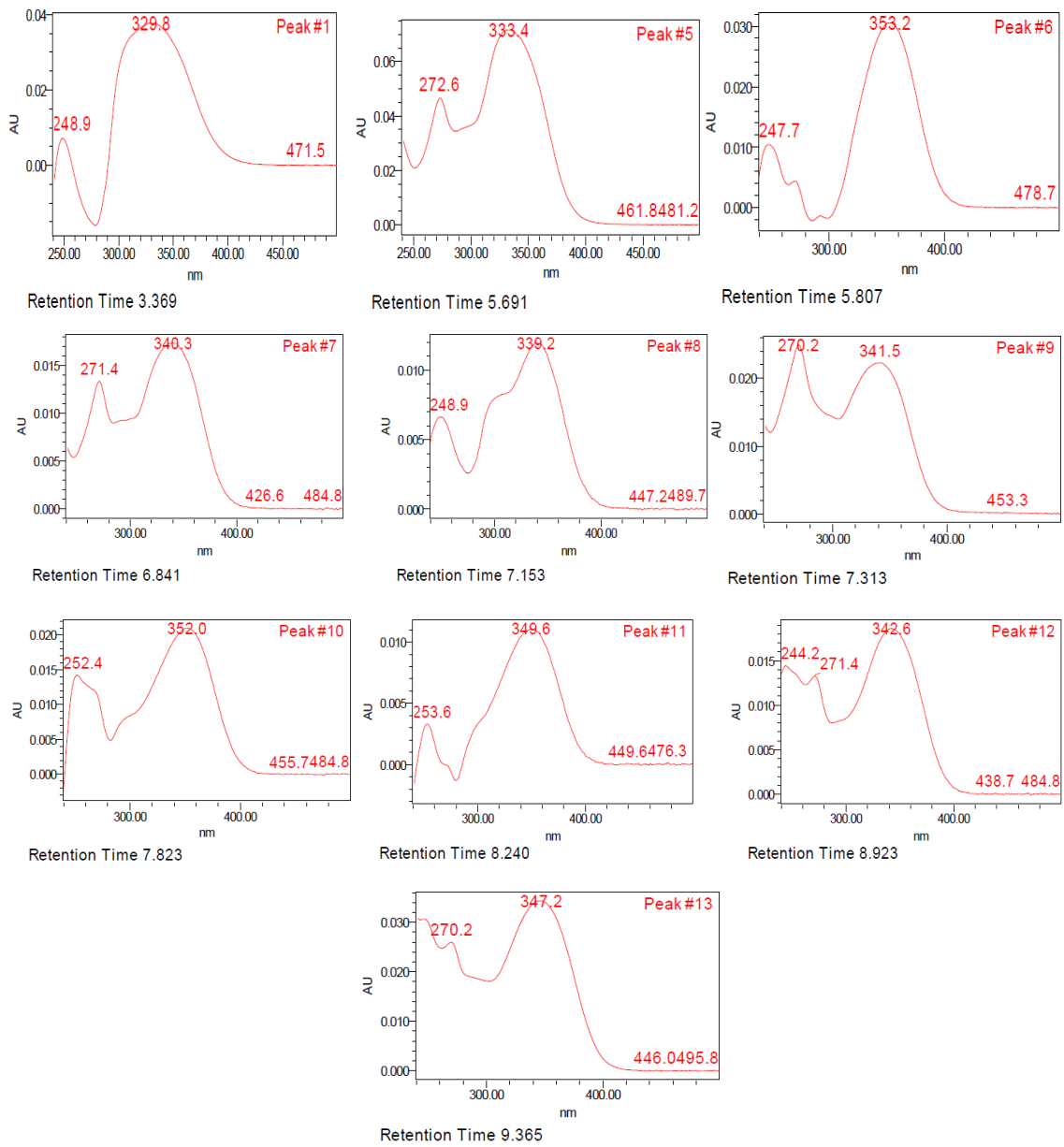
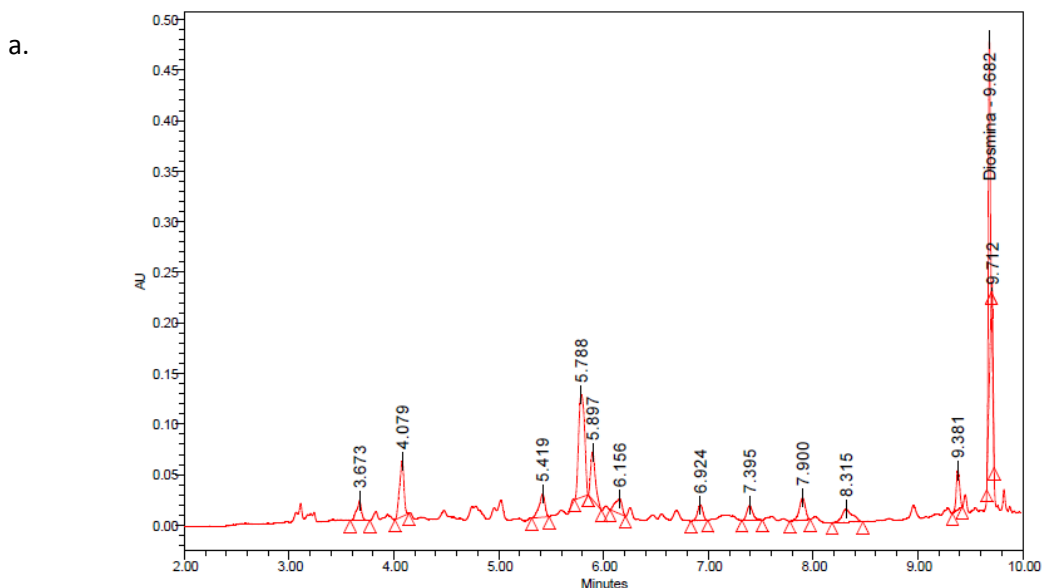


Imagen 10. a. Cromatograma Muestra Diluido. b. Espectros Uv de señales correspondientes a flavonoides con las bandas características.



b.

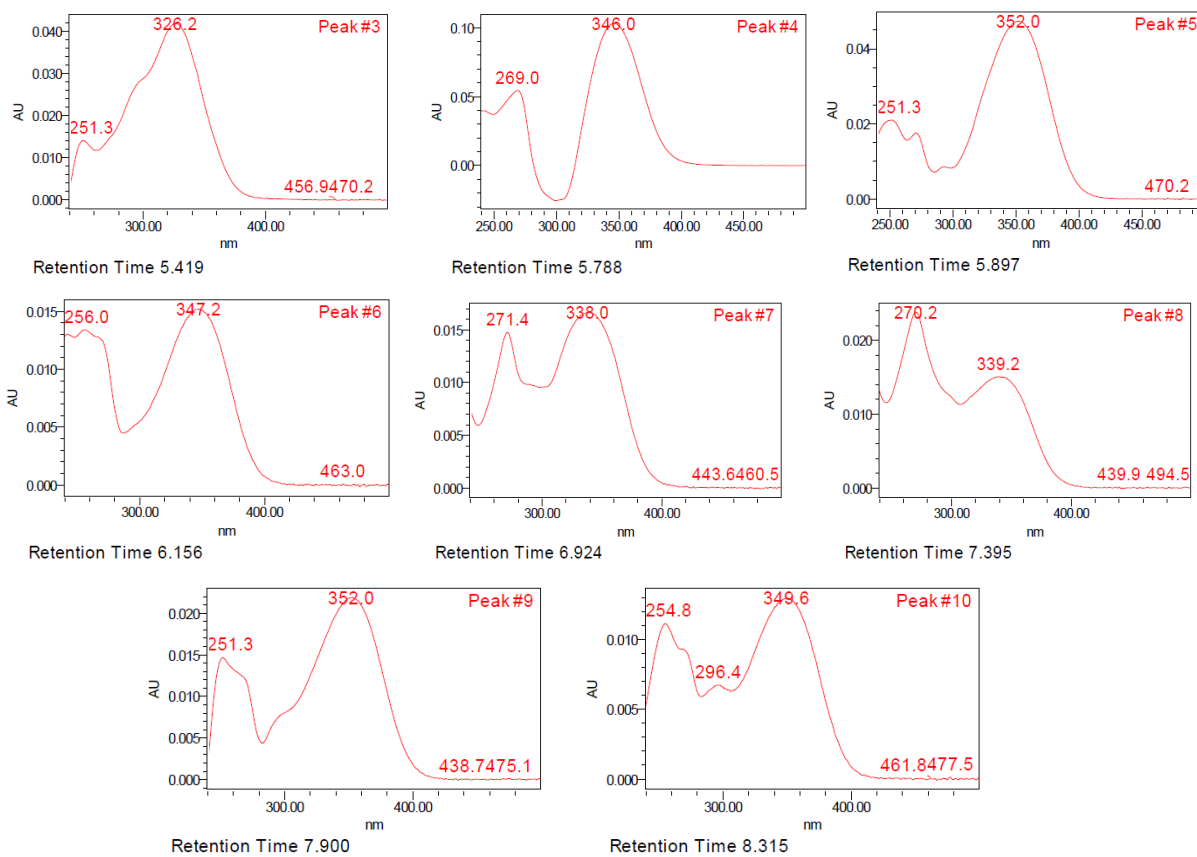


Imagen 11. a. Cromatograma muestra alcalizado. b. Espectros Uv de señales correspondientes a flavonoides con las bandas características.

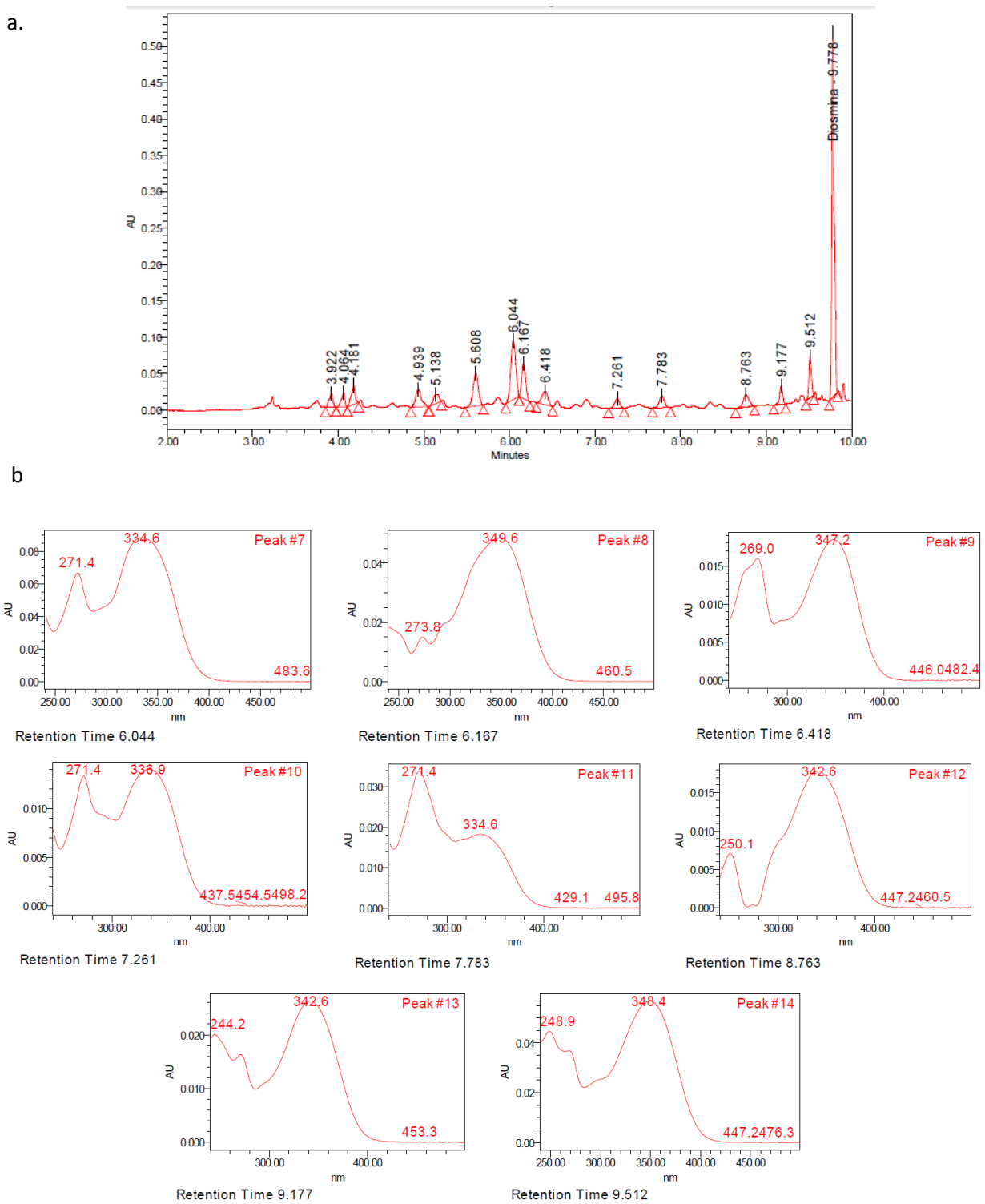


Imagen 12.a. Cromatograma muestra clarificado. **b.** Espectros Uv de señales correspondientes a flavonoides con las bandas características

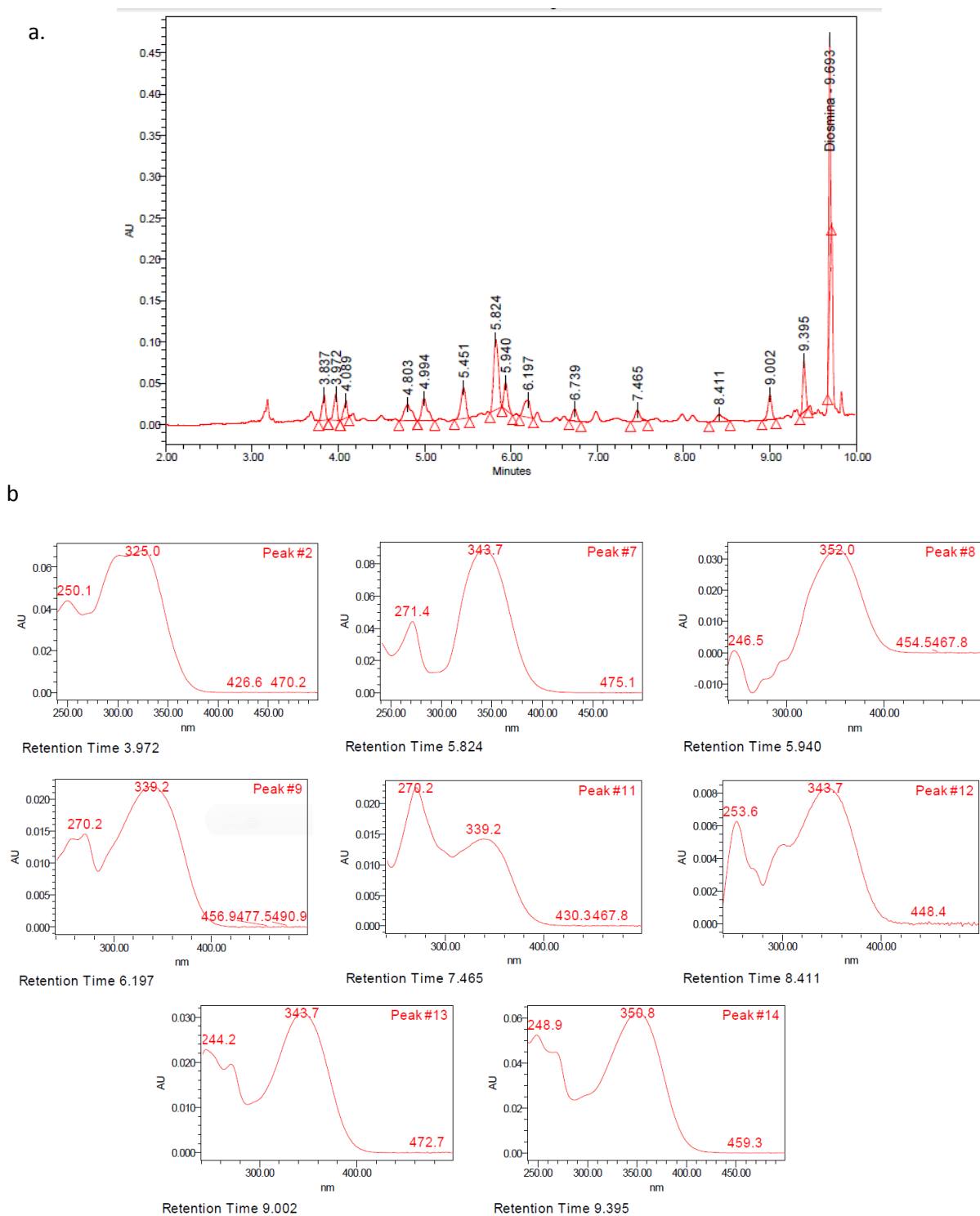


Imagen 13. a. Cromatograma muestra filtrado. b. Espectros Uv de señales correspondientes a flavonoides con las bandas características.

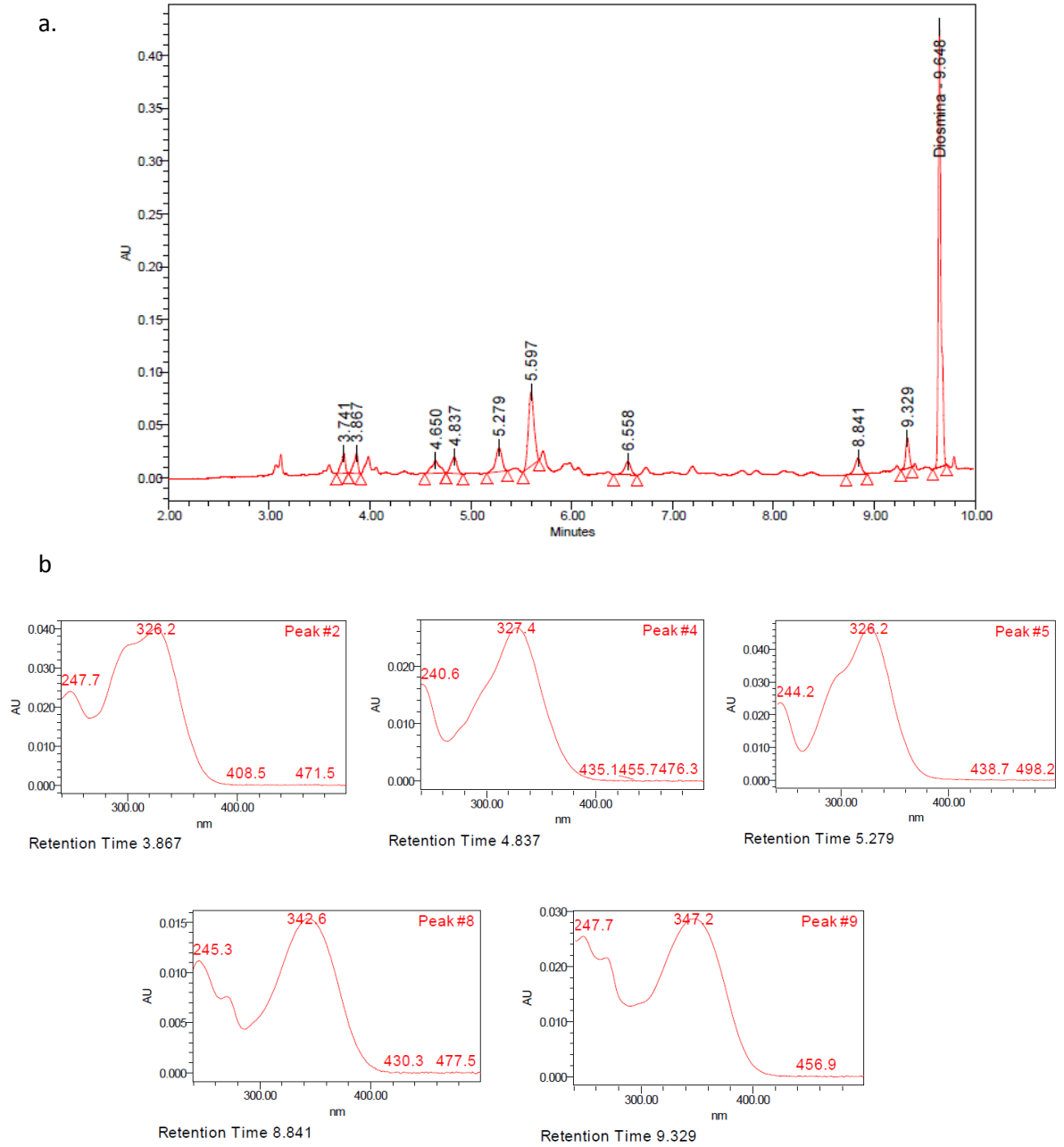
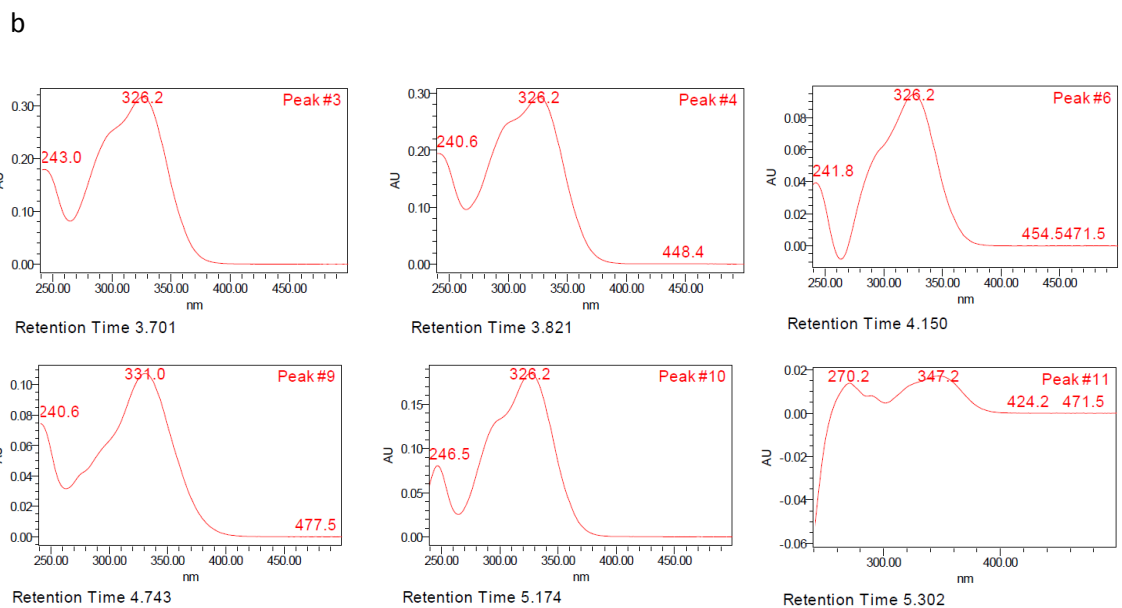
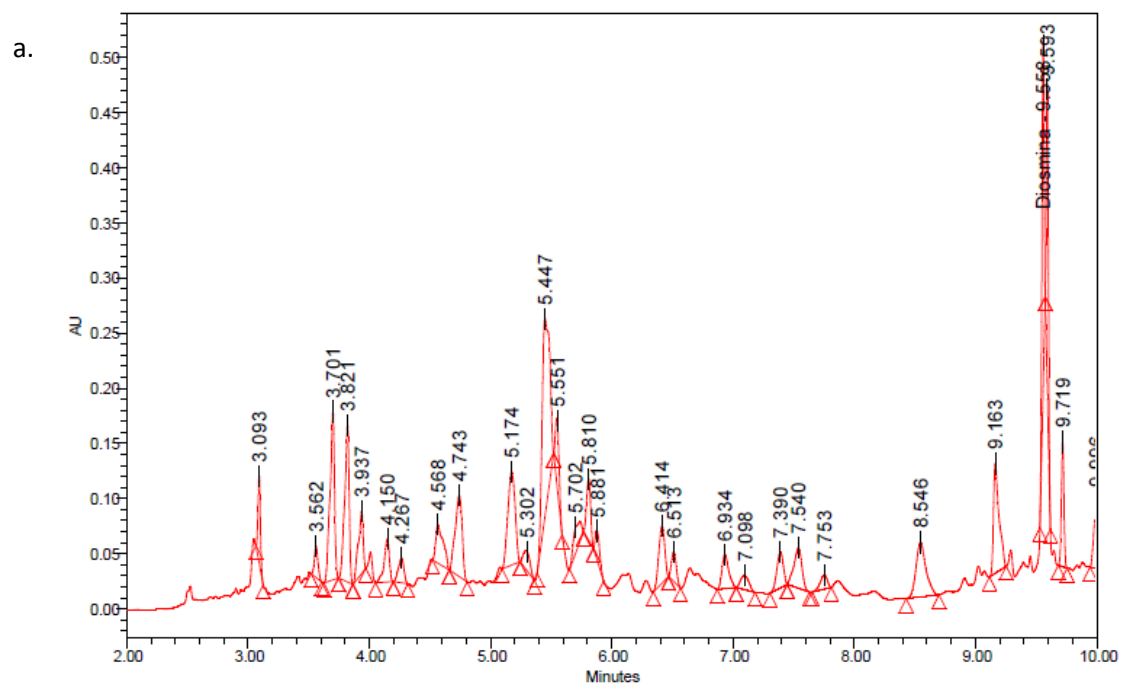


Imagen 14. a. Cromatograma muestra jarabe. b. Espectros Uv de señales correspondientes a flavonoides con las bandas características.



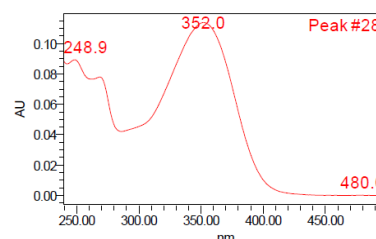
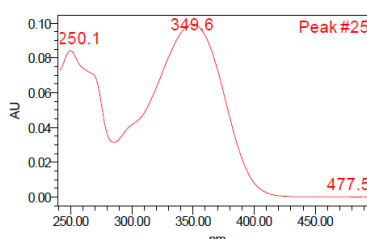
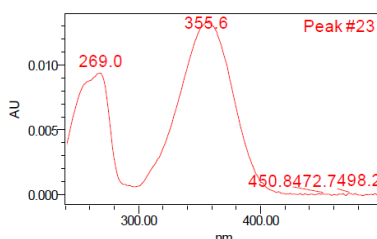
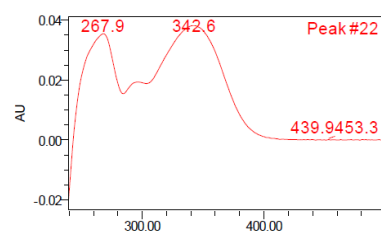
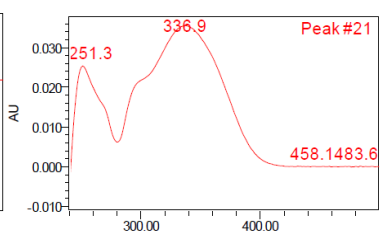
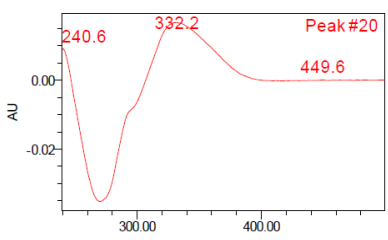
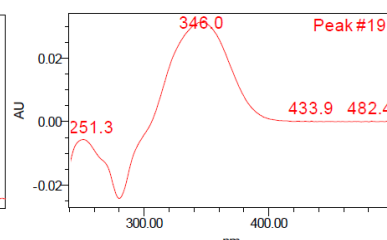
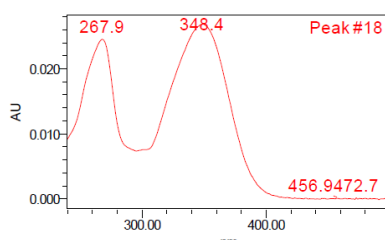
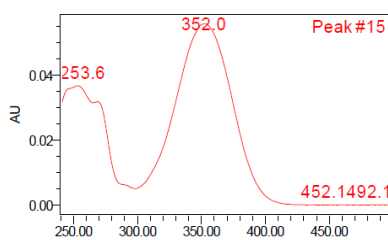
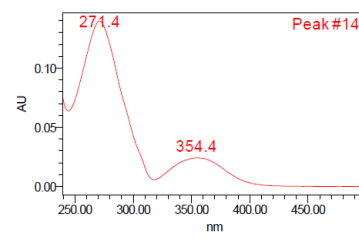
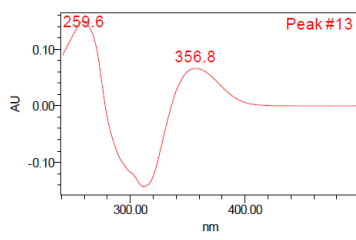
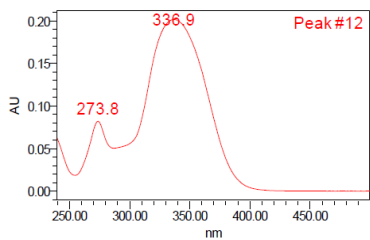
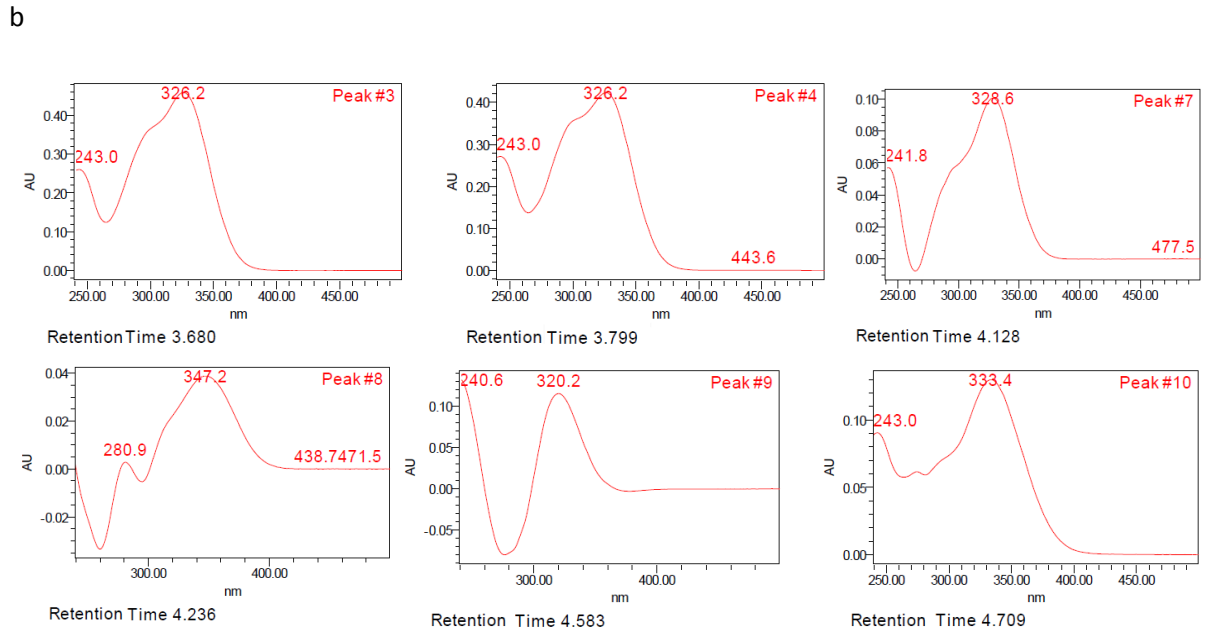
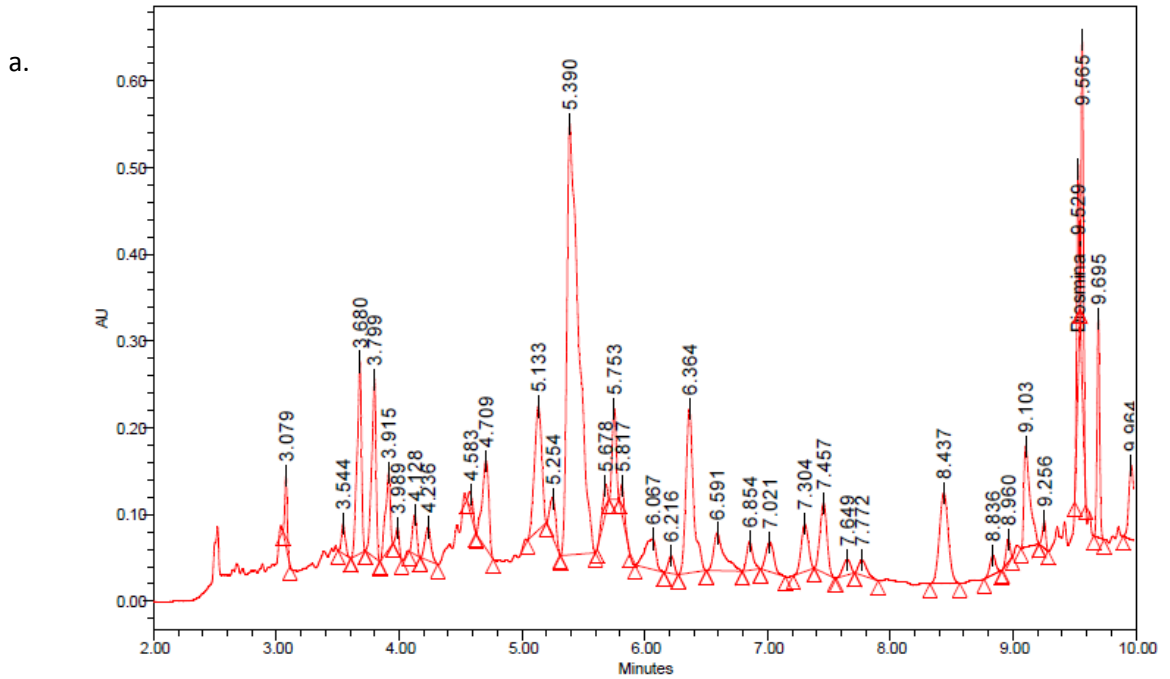
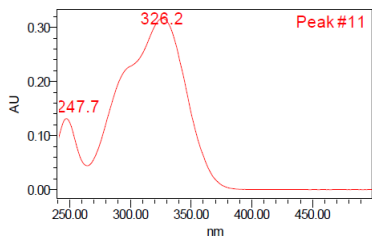
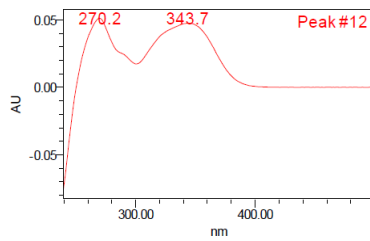


Imagen 15. a. Cromatograma muestra Miel. b. Espectros Uv de señales correspondientes a flavonoides con las bandas características.

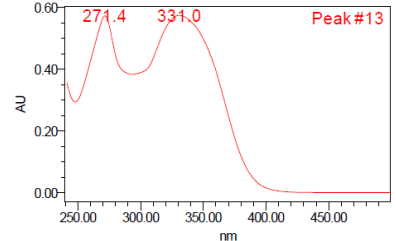




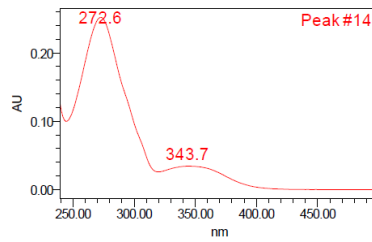
Retention Time 5.133



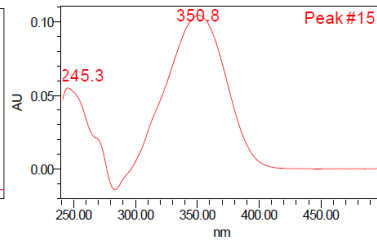
Retention Time 5.254



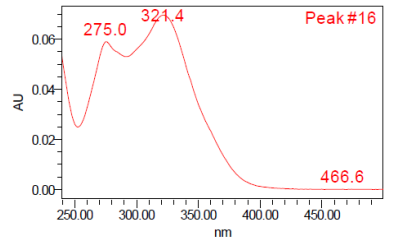
Retention Time 5.390



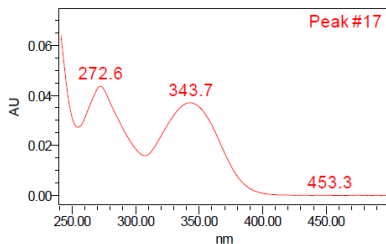
Retention Time 5.678



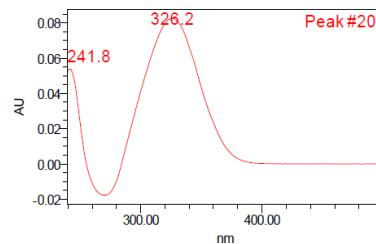
Retention Time 5.753



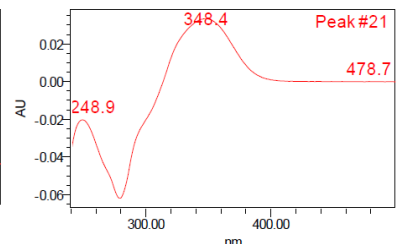
Retention Time 5.817



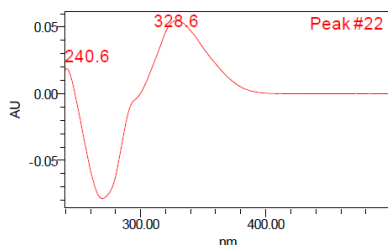
Retention Time 6.067



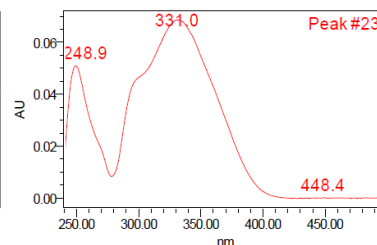
Retention Time 6.591



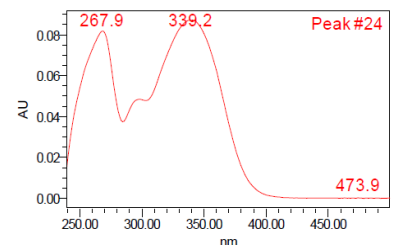
Retention Time 6.854



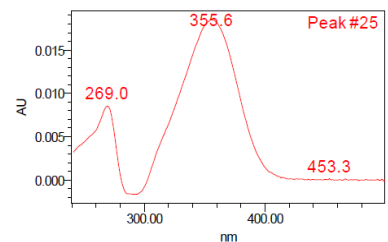
Retention Time 7.021



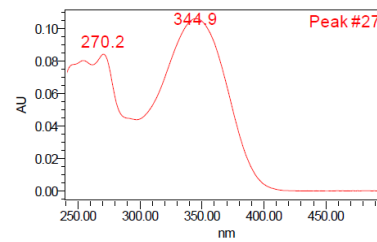
Retention Time 7.304



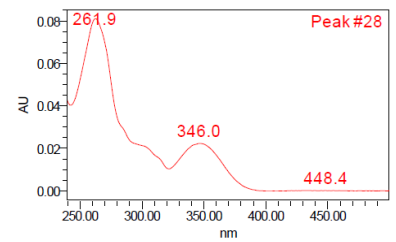
Retention Time 7.457



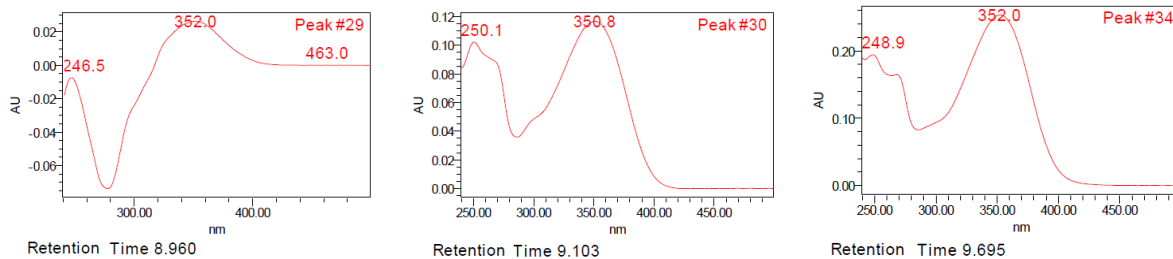
Retention Time 7.649



Retention Time 8.437



Retention Time 8.836



Empleando Diosmina como estándar interno a una concentración de 50mg/L, y con el software Empower 3.0 del Equipo UPLC, se cuantificaron las señales que sus espectros Uv corresponden a las bandas características de Flavonoides (mostrados anteriormente), y se expresaron como miligramos de Diosmina por litro. A continuación se muestran los datos obtenidos.

Tabla 7. Flavonoides muestra Extracto

Tiempo de retención	Cantidad (mg/L)
3,369	9,00
5,691	26,63
5,807	7,73
6,841	6,97
7,153	8,02
7,313	9,12
7,823	9,27
8,240	7,60
8,923	6,67
9,365	7,93
Total	98,95

Tabla 8. Flavonoides en muestra Diluido

Tiempo de retención	Cantidad (mg/L)
5,419	6,9
5,788	36,6
5,897	8,5
6,156	9,2
6,924	6,6
7,395	7,1
7,900	9,5
8,315	9,5
Total	93,93

Tabla 9. Flavonoides muestra Alcalizado

Tiempo de retención	Cantidad (mg/L)
6,044	16,5
6,167	7,7
6,418	4,5
7,261	2,6
7,783	3,4
8,763	4,0
9,177	3,1
9,512	5,8
Total	47,65

Tabla 10. Flavonoides muestra Clarificado

Tiempo de retención	Cantidad (mg/L)
3,972	6,7
5,824	26,6
5,94	8,3
6,197	8,5
7,465	4,5
8,411	4,5
9,002	7,3
9,395	10,4
Total	76,74

Tabla 11. Flavonoides muestra Filtrado

Tiempo de retención	Cantidad (mg/L)
3,867	3,4
4,837	4,2
5,279	6,1
8,841	4,0
9,329	4,1
Total	21,69

Tabla 13. Flavonoides muestra Jarabe

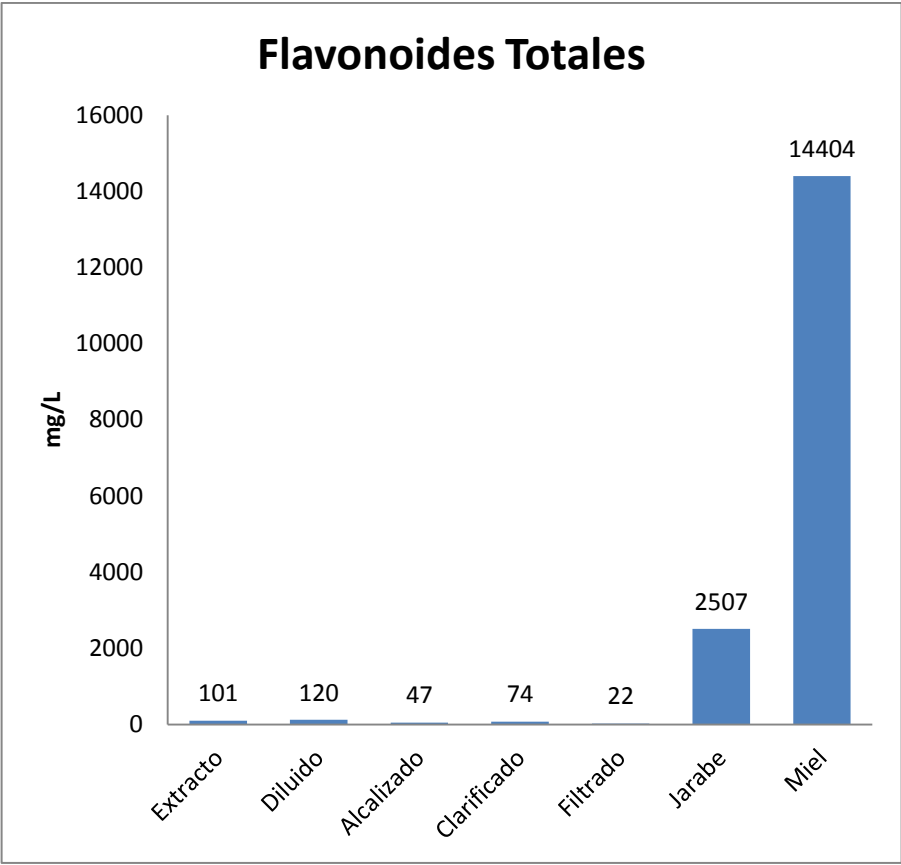
Tiempo de retención	Cantidad (mg/L)
3,701	56,5
3,821	52,8
4,15	18,0
4,743	37,9
5,174	56,1
5,302	10,9
5,447	97,2
5,551	28,7
5,702	11,1
5,881	27,5
6,513	10,9
6,934	16,0
7,098	8,0
7,39	16,9
7,54	22,2
7,753	18,3
9,163	48,2
9,719	24,5
Total	561,52

Tabla 12. Flavonoides muestra Miel

Tiempo de retención	Cantidad (mg/L)
3,68	87,2
3,799	80,1
4,128	17,3
4,236	21,5
4,583	10,1
4,709	55,1
5,133	91,7
5,254	22,7
5,39	542,3
5,678	16,0
5,753	38,1
5,817	12,2
6,067	34,3
6,591	42,3
6,854	19,9
7,021	26,3
7,304	35,1
7,457	50,0
7,649	12,5
8,437	83,3
8,836	11,4
8,96	9,5
9,103	63,4
9,695	58,5
Total	1440,43

Para la muestra de Jarabe y miel se realiza la corrección en las cantidades de las diluciones realizadas antes de la extracción en fase sólida. Y se obtienen los siguientes resultados.

Grafica 2. Flavonoides totales. Donde se observa que a mayor concentración de flavonoides se presenta en la muestra de correspondiente a Miel.



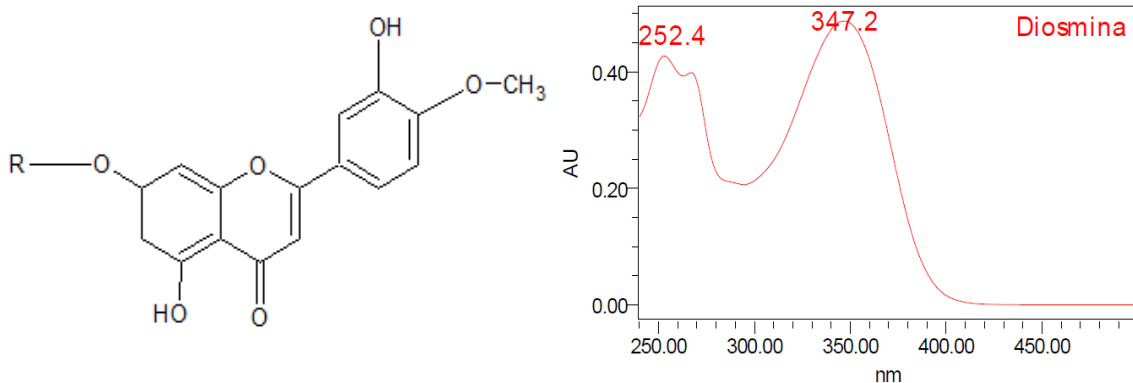
9. DISCUSION DE RESULTADOS

9.1 Estándar interno

Como se mostró anteriormente los flavonoides se clasifican por su estructura química en diversos subgrupos, la diosmina es un flavonoide extraído de las rutáceas que por su estructura química (tipo flavona) se asemeja mucho a los flavonoides presentes en la caña de azúcar; lo que la hace considerar como molécula adecuada para ser usada como estándar interno (Escobar Blanco, 2010).

Por otro lado el espectro Uv de la diosmina (Imagen 16), también fue considerado a la hora de elegirlo como estándar interno, ya que con el detector PDA en las mismas condiciones cromatográficas que las aplicadas en el análisis de los extractos de caña de azúcar, mostró un perfil muy similar a los flavonoides de caña de azúcar (dos bandas de absorción, λ_{max} , alrededor de 253 y 350 nm).

Imagen 16. Estructura química y Espectro Uv Diosmina



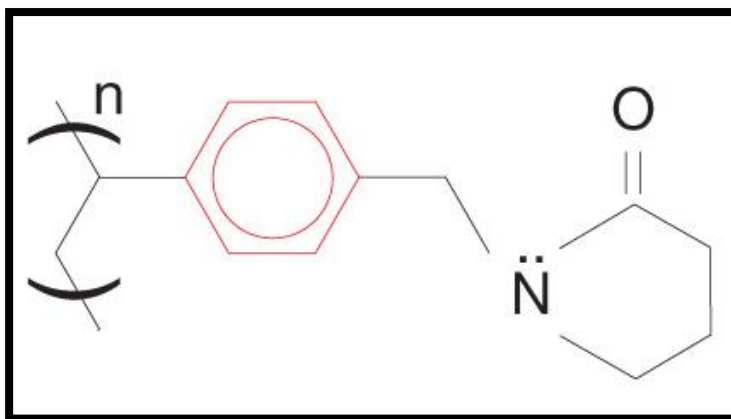
9.2 Preparación de las muestras

El jugo de la caña de azúcar es una matriz difícil debido a la gran cantidad de metabolitos que posee y al alto contenido de compuestos solubles en agua, como los azúcares. Es por eso que la preparación de la muestra cumple un papel muy importante en el desarrollo de esta metodología de cuantificación, ya que de ella depende la eficacia del análisis cromatográfico.

El cartucho STRATA X de Phenomenex consiste en una fase reversa con un adsorbente polimérico (Imagen 17) que da una fuerte retención a los compuestos neutros, ácidos o básicos. Sin embargo el buen desempeño de este, depende de

las condiciones en las que se realice, durante cada una de las etapas de la extracción en fase sólida.

Imagen 17. Estructura Química Cartucho Strata X



Para la etapa de acondicionamiento del cartucho se busca remover el aire presente y preparar el relleno para recibir la carga de la muestra, se compone de dos sub-etapas; la primera donde se activan los ligandos absorbentes y generalmente se utiliza el solvente en el que se eluirá la muestra en este caso metanol o el que se usara en mayor proporción durante la extracción y la segunda donde se equilibra la capa del adsorbente en este caso con agua.

En la etapa de carga de la muestra los flavonoides por su estructura química altamente carbonada realizan interacciones tipo Van der Waals con el polímero del cartucho, quedándose retenidos fácilmente en este, sin embargo es necesario que la velocidad de goteo en esta etapa sea baja para que la interacción analito con polímero sea mayor.

En el lavado se eliminan aquellas moléculas que no son de interés. Por tanto es necesario encontrar un solvente o una solución que presente alta afinidad por estas moléculas y rompa los enlaces que se hayan formado entre estas y el polímero del cartucho, sin arrastrar consigo los flavonoides. Por tanto se evaluó la recuperación de los metabolitos de interés en extracción con lavados de agua-metanol a diferentes concentraciones, para de este modo eliminar componentes polares y medianamente polares.

El experimento se realizo con los siguientes parámetros:

Se preparó un estándar de Diosmina de 250ppm y se le realizó SPE:

- Acondicionamiento con 1mL de metanol y 1mL de agua,
- 1mL carga del estándar de Diosmina 250ppm,
- Lavado con 3mL de metanol al 10%, 50% 100%.
- Elución con 2mL metanol el cual se recolecto y se llevo a un balon de 10mL con Agua. (Se lleva a 10 mL para obtener una concentración final de 50ppm de Diosmina)

Los resultados obtenidos (*tabla 6*) son coherentes puesto que a medida que se aumenta el porcentaje de solvente es menor la recuperación de los metabolitos, ya que este arrastra en el lavado parte de los compuestos de interés. Por tanto la mejor solución para realizar el lavado fue metanol al 10%.

En esta etapa también es importante tener en cuenta la velocidad de goteo para lograr completa anulación de las interacciones Van der Waals entre los componentes a eliminar y el polímero.

En la etapa de elución es importante el volumen de solvente para eluir, el cual está directamente relacionado con la masa de adsorbente en el cartucho de SPE, para este caso con una masa de polímero adsorbente de 200mg el proveedor (Phenomenex) sugiere 2mL (Phenomenex, 2013) con los cuales se obtuvo buenos resultados. El solvente usado fue metanol ya que por su polaridad era el más adecuado y ha sido reportado en anteriores estudios de flavonoides en jugo de caña de azúcar (Colombo, 2006) (Ordoñez, 2009).

9.3 Cromatografía Líquida (UPLC)

La optimización del procedimiento de separación por UPLC para el análisis cuantitativo fue un proceso difícil debido al perfil cromatográfico altamente complejo, que mostró varias señales de flavonoides en los cromatogramas. Se probaron diferentes proporciones de solventes para la fase móvil (diferentes gradientes).

Para la elución de flavonoides generalmente se usa en gradiente sistemas de disolventes binarios, con agua que contenga buffer acetato o formiato, y metanol o acetonitrilo como modificador orgánico. (Eva de Rijke, 2006). Pero la elección de los solventes a usar se realizó según estudios anteriores de flavonoides en jugo de caña de azúcar (Colombo, 2006) solvente A: Acido fórmico 0.05%, solvente B: Acetonitrilo.

Las muestras se analizaron a una temperatura de 40 °C ya que temperaturas altas son recomendadas porque reducen los tiempos de análisis y dan resultados más reproducibles; Adicional a esto trabajos anteriores con flavonoides en caña han obtenido buenos resultados trabajando a estas temperaturas (Colombo, 2008)

9.4 Análisis Cuantitativo

El contenido individual y total de flavonoides para cada muestra fue calculado usando el software Empower 3.0 teniendo en cuenta solo las señales cuyo espectro Uv tuviese las características típicas de un flavonoide, banda I con máximos de absorción de 300-380nm y banda II con máximos de absorción de 240-280nm, y que sus áreas fuesen mayores a 50000 unidades de integración

En las *tablas 7-13* se muestra detalladamente la cantidad obtenida por cada señal (flavonoide) en cada uno de los cromatogramas y permite identificar la presencia de un flavonoide mayoritario en las muestras; el cual a partir de los máximos de absorción reportados en la literatura *Ver tabla 2 y 3*, se puede llegar a identificar.

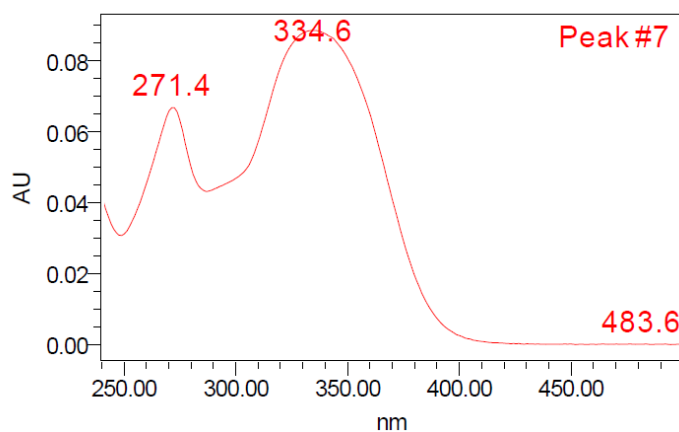


Imagen 18. Flavonoide mayoritario (derivado apigenina)

Los máximos de absorción del componente mayoritario presentan las características típicas de los derivados de la apigenina y acuerdo a lo reportado en Brasil (Colombo, 2006) se podría decir que corresponde a la Vitexina con bandas de absorción teóricas de 334nm–270nm, o la apigenina 8 - C - α -L-Arabinósido 6 - C - β -D-Glucósido (Schafoside) con 330nm-269nm

Otros flavonoides que aunque no se encuentran en gran concentración en las muestras, por medio de sus espectros Uv se realizó una posible identificación de las moléculas.

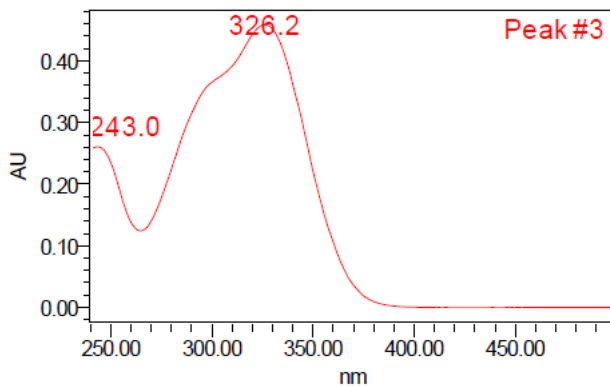


Imagen 19. Flavonoide identificado como Orientina

De acuerdo con lo reportado (Colombo, 2006), los máximos de absorción mostrados por este flavonoide *Ver Imagen 19*, corresponde a la orientina (Flavonoide derivado de luteína) con bandas de absorción teóricas 324nm-242nm.

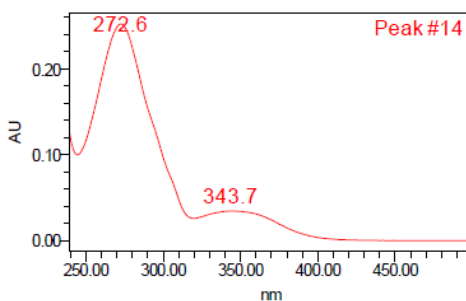


Imagen 20. Flavonoide derivado de tricina

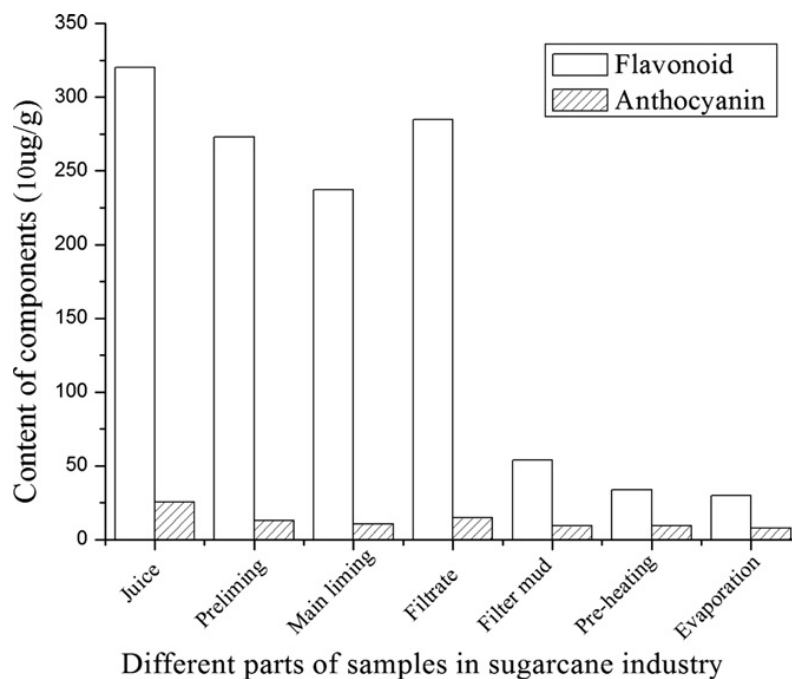
De acuerdo con lo reportado (Colombo, 2006), los máximos de absorción mostrados por este flavonoide *Ver Imagen 20*, corresponde a un derivado de tricina con bandas de absorción teóricas 340nm-270nm.

Para los otros derivados de luteína y tricina reportados en la caña, no fue posible realizar una identificación certera ya que los máximos de absorción reportados son similares entre ellos, por lo cual es necesario utilizar otras técnicas analíticas de identificación, como espectrometría de masas, espectroscopía infrarrojo entre otras.

Al analizar la *gráfica 2*. se puede observar la variación el contenido total de flavonoides en cada etapa del proceso de fabricación del azúcar, permitiendo

identificar que la mayor concentración de flavonoides en jugo se encuentra en la muestra de miel, y generando la idea de que a medida que avanza el proceso de fabricación del azúcar se van eliminando otros componentes y la concentración de flavonoides aumenta.

En el estudio realizado en *Schuan University* en China (Li X. S., 2011) sobre el contenido de flavonoides durante el proceso industrial de fabricación del azúcar, se reportó que la mayor cantidad de flavonoides está presente en el extracto de caña (jugo obtenido del proceso de molienda), y que a medida que el proceso industrial avanza, la cantidad de estos compuestos va disminuyendo considerablemente *Ver grafica 3.*



Grafica 3. Distribución de flavonoides en las diferentes muestras del proceso de fabricación del azúcar. (Li X. S., 2011)

La metodología desarrollada en el estudio en China consiste en, una preparación de la muestra por extracción en fase líquida empleando n-butanol como solvente, y el análisis cuantitativo realizado por cromatografía HPLC, empleando una columna C18 y como fase móvil ácido fórmico 0,1% y metanol. La eficiencia de esta metodología, a diferencia de la desarrollada en este trabajo, es muy baja. Primero por el tratamiento de la muestra, ya que la extracción en fase líquida no permite gran recuperación de los analitos aunque se haya utilizado n-butanol, un solvente

muy adecuado y utilizado por la afinidad que presenta con estos metabolitos, además su reproducibilidad es muy poca. Por otro lado el uso de una columna C18 no presenta gran retención de los compuestos y compatibilidad con la fase móvil acuosa, como la columna HSS-T3 antes descrita.

En los resultados expuestos en este trabajo se muestra que la concentración de flavonoides va aumentando a medida que avanza el proceso de fabricación, lo cual es coherente al irse eliminando el agua y otros componentes en el proceso; sin embargo es importante considerar los resultados mostrados por la *Schuan University* en China, así la metodología usada por ellos no haya sido muy eficiente, los resultados obtenidos pueden considerarse en la industria azucarera de Colombia, ya que presentan proceso de fabricación del azúcar semejantes. Por tanto se concluye finalmente que a medida que parte de los flavonoides se van perdiendo a medida que avanza el proceso de fabricación, como lo muestra *Schuan University*, sin embargo se van eliminando otros componentes, que hace que los flavonoides estén en mayor concentración en las etapas finales del proceso.

10. CONCLUSIONES

1. Siendo el jugo de caña de azúcar una matriz tan compleja (por la gran cantidad de compuestos que contiene), se implementó la metodología de preparación de la muestra por SPE, la cual permitió el desarrollo de un análisis cuantitativo eficiente, ya que sin gastar mucho tiempo en la preparación de la muestra, y sin invertir mucho dinero en grandes cantidades de solventes se logro dar una aproximación a la cantidad de flavonoides en cada producto intermedio del proceso de fabricación del azúcar.
2. Se identificaron los parámetros cromatográficos adecuados para el análisis cuantitativo de flavonoides e identificación de algunos de estos metabolitos, sin la necesidad de emplear detectores costosos.
3. Los contenidos más representativos de flavonoides se presentan en las muestras de jarabe y miel, con cantidades de 2808mg/L y 14404mg/L respectivamente.
4. El flavonoide mayoritario observado en la mayoría de las muestras analizadas, corresponde a un derivado del núcleo de apigenina, pudiendo corresponder esta a vitexina ó schaftosido.

11.RECOMENDACIONES

El desarrollo de una metodología de valoración del contenido de flavonoides en Jugo de caña de azúcar es una investigación que abre puertas al aprovechamiento de residuos orgánicos generados por la producción de azúcar, ya que al identificar en qué etapa del proceso de fabricación del azúcar hay mayor concentración de flavonoides, se genera en la industria azucarera la necesidad de optimizar el proceso productivo del azúcar, trayendo no solo beneficios para los ingenios Azucareros si no para toda la región.

Sin embargo, es importante resaltar que los resultados aquí presentados son solo una pequeña parte de todos los estudios que se deben hacer antes de poder aprovechar estos metabólicos. Uno de los pasos a seguir sería validar la metodología desarrollada en este proyecto, donde se demuestre estadísticamente que este es idóneo para el análisis cuantitativo que se buscaba.

También teniendo en cuenta que la muestra de jugo Miel es la que presenta mayor concentración de flavonoides y es usada como materia prima en el proceso de obtención de etanol (CENICAÑA, 2013), podrían desarrollarse estudios que permitieran optimizar estos procesos industriales para aprovechar los flavonoides sin afectar otros productos industriales.

12. BIBLIOGRAFIA

- Asocana. (9 de 2012). *Asocana*. Obtenido de <http://www.asocana.org/publico/info.aspx?Cid=215>
- Asocaña. (2012). *Informe Anual 2011-2012*. Cali.
- CENICAÑA. (Mayo de 2013). *CENICAÑA*. Obtenido de Proceso de obtencion etanol: http://www.cenicana.org/pop_up/fabrica/diagrama_etanol.php
- Colombo, R. (2005). On-line identification of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) methoxyflavones by liquid chromatography–UV detection using post-column derivatization and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 51-59.
- Colombo, R. (2006). Determination of flavonoids in cultivated sugarcane leaves, bagasse, juice. *Journal of Chromatography*, 118–124.
- Colombo, R. (2006). On-line Identification of Further Flavone C- and O-Glycosides. *Phytochemical Analysis*, 337–343.
- Colombo, R. (2008). Study of C- and O-glycosylflavones in Sugarcane Extracts using Liquid Chromatography-Exact Mass Measurement Mass Spectrometry. *Sociedade Brasileira de Química*, 483-490.
- Escobar Blanco, M. (2010). *Extracción de compuestos fenólicos de las*. Ciudad de Mexico.
- Eva de Rijke, P. O. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 31-63.
- Fedesarrollo. (2010). *Cuaderno Numero treinta y uno: Impacto socioeconómico del sector azucarero colombiano en la economía nacional*.
- Jeffrey B. Harborne, C. A. (2000). Advances in Flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 481-504.
- Larrahondo, J. E. (1995). Calidad de la caña de azúcar. En CENICAÑA, *El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia* (págs. 337-354). Cali.
- Li, X. S. (2010). Determination and comparison of flavonoids and anthocyanins in Chinese sugarcane tips, stems, roots and leaves. *Journal of separation science*, 1216–1223.
- Li, X. S. (2011). Quantitative analysis and recovery optimisation of flavonoids and anthocyanins in sugar-making process of sugarcane industry. *Food Chemistry*, 150-157.

- Manuelita S.A. (4 de Abril de 2013). *Manuelita*. Obtenido de <http://www.manuelita.com/index.php?p=manuelitaazucarybioetanolcolombia/procesoproductivo/procesoproductivoazucar&>
- Martínez, S. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 271-278.
- Ordoñez, S. (2009). Implementación de un método analítico rápido de extracción y análisis cuantitativo de flavonoides y fenoles totales en variedades de caña de azúcar. Cali, Colombia.
- Phenomenex. (Mayo de 2013). *Phenomenex*. Obtenido de www.phenomenex.com
- Sigma-Aldrich. (Noviembre de 2012). *Sigma-Aldrich*. Obtenido de <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>
- Skoog, D. A., Holler, F., & Crouch, S. R. (2008). *Principios de análisis instrumental 6ta ed.* cengage.
- Swartz, M. (Octubre de 2005). *chromatographyonline*. Obtenido de <http://www.chromatographyonline.com/lcgc/data/articlestandard/lcgc/242005/164646/article.pdf>
- Waters. (2009). ACQUITY UPLC Column solution.



APROBADO POR:

(Nombre Correspondiente)
Evaluador Externo.
Julián A. González

(Nombre Correspondiente)
Evaluador Externo.
Giovanni Rojas

(Nombre Correspondiente)
Director del Proyecto.

Guillermo L. Montoya

(Nombre Correspondiente)
Director ó Co-Director del Proyecto.