

**IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO RÁPIDO DE
EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS CUANTITATIVO DE FLAVONOIDES
Y FENOLES TOTALES EN VARIEDADES DE
CAÑA DE AZÚCAR**

SONIA PATRICIA ORDOÑEZ MARÍN

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA
PROGRAMA DE POSTGRADO EN CIENCIAS – QUÍMICA**



Cali, 2009

**IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO RÁPIDO
DE EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS CUANTITATIVO DE
FLAVONOIDES Y FENOLES TOTALES EN VARIEDADES
DE CAÑA DE AZÚCAR**

SONIA PATRICIA ORDOÑEZ MARÍN

**Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar al título de
MAESTRÍA EN QUÍMICA**

CECILIA A. DE PLATA, M.Sc.

Codirectora

JESÚS E. LARRAHONDO, Ph.D.

Director

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA DE POSTGRADO EN CIENCIAS – QUÍMICA**

Cali, 2009



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
ACTA DE SUSTENTACIÓN DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE
MAESTRIA EN CIENCIAS-QUIMICA

Jurado conformado por los doctores:

WISTON QUIÑONES, Universidad de Antioquia, Medellín
JUNIOR EMIRO SANDOVAL, Universidad del Valle

El día Viernes 12 de Junio de 2009 a las 2:00 PM. se llevó a cabo la sustentación del Trabajo de Investigación "**IMPLEMENTACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO RÁPIDO DE EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS CUANTITATIVO POR HPLC-UV DE FLAVONOIDES TOTALES EN VARIEDADES DE CAÑA DE AZÚCAR**", presentada por la estudiante **SONIA PATRICIA ORDOÑEZ MARIN**, código 0703715, Plan 7173, candidata a grado para la próxima ceremonia.

RESULTADO DE LA EVALUACIÓN:

- APROBADA
- MERITORIA
- LAUREADA

Regístrese esta calificación.

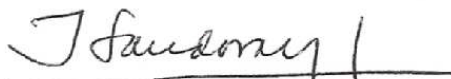
- REPROBADA: La estudiante debe matricularse en esta actividad
 - PENDIENTE: La estudiante debe acoger las recomendaciones y presentar nuevamente el documento ante el jurado.
 - Requiere. No requiere nueva sustentación.
- El plazo para nueva sustentación y/o presentación del documento es de: Un mes (1 mes)

OBSERVACIONES

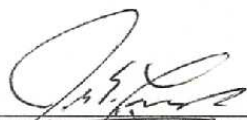
Santiago de Cali, 12 de Junio de 2009.



WISTON QUIÑONES
JURADO



JUNIOR EMIRO SANDOVAL
JURADO



JESUS E. LARRAHONDO
DIRECTOR



CECILIA A. DE PLATA
CODIRECTORA



NORBERTO BENITEZ
COORDINADOR DE LA SUSTENTACIÓN

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA DE POSTGRADO EN CIENCIAS – QUÍMICA

SONIA PATRICIA ORDOÑEZ MARÍN

**IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO RÁPIDO DE
EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS CUANTITATIVO DE FLAVONOIDES Y
FENOLES TOTALES EN VARIEDADES DE CAÑA DE AZÚCAR**

TEMAS

- Separación y cuantificación de compuesto fenólicos de valor agregado en caña de azúcar.
- Extracción en fase sólida (SPE).
- Validación de la técnica cromatográfica HPLC para la determinación de flavonoides totales.

Dedico este trabajo a ti Águila que con tu ejemplo, cariño, confianza, dedicación, condescendencia y apoyo incondicional logré culminar mis estudios y la presente tesis.

A mi padre Alirio Ordóñez (q.e.d) por estar en mi alma y corazón amparando siempre mi camino.

A mi madre Myriam por su apoyo, fe, cariño y fortaleza, aún cuando existieron adversidades.

A mis hermanas Sandra y Angélica por estar conmigo en los momentos más difíciles.

“Lo que con mucho trabajo se adquiere mas se ama”

Aristóteles

AGRADECIMIENTOS

Quisiera que las próximas líneas sirvan como reconocimiento a las personas e instituciones que han hecho posible la realización de esta tesis. A todas ellas, quiero agradecer de todo corazón la ayuda dispensada:

A mi director, Dr. Jesús Eliécer Larrahondo, por su guía y lo mucho que me ha enseñado.

A la Dra. Cecilia de Plata, por transmitirme su tesón en el trabajo cotidiano, además por su ayuda en la gestión del préstamo de equipos, materiales e instalaciones para llevar a término la parte experimental.

Al Dr. Alonso Jaramillo por su experiencia compartida en la técnica de HPLC, también por su estímulo y apoyo constantes para el desarrollo de este trabajo.

Al los compañeros e integrantes del laboratorio de proteínas y enzimas-metabolismo y nutrición de la Universidad del Valle: Carolina, Guillermo, Milton, Mildred y Nhora por su unidad y apreciable colaboración.

Al instituto de inmunología de la Universidad del Valle y laborantes del área de Química Analítica, por su compañerismo y préstamo de los equipos para la cuantificación de los metabolitos.

Al Dr. Alberto Palma, Bioestadístico de CENICAÑA, por su apoyo incondicional y vivacidad compartida en el análisis estadístico durante la validación por HPLC.

A mis grandes amigos del laboratorio de calidad de caña y suelos de CENICAÑA: Roberto, Luis, Carlos, Oscar, Myriam y Liliana, por su carisma y motivación para esta investigación en el sector azucarero.

Al Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia (CENICAÑA) bajo la dirección de los doctores Álvaro Amaya y Nohra Pérez, por la financiación en el estudio exploratorio de nuevos productos de valor agregado en caña de azúcar y la proyección de la investigación en el área nutracéutica.

A los Jurados de la tesis por su acertadas y oportunas correcciones para fortalecer esta memoria de investigación.

El agradecimiento es extensivo a todos los docentes de la Universidad del Valle, por enseñarme todo aquello que hoy muestro en esta memoria.

A mi familia, cuya tesis es también vuestra.

A todos de corazón

Sonia

TABLA DE CONTENIDO

	Pag
Resumen	1
1.0 Introducción	2
2.0 Objetivos	4
2.1 Objetivo general del proyecto.....	4
2.2 Objetivos específicos.....	4
3.0 Antecedentes	5
3.1 Flavonoides de la caña de azúcar.....	5
3.1.1 Clases de flavonoides.....	5
3.2 Antocianinas.....	7
3.2.1 Extracción y fraccionamiento de antocianinas.....	10
3.3 Flavonas y flavonoles	11
3.3.1 Flavonoles.....	13
3.3.2 Flavonas.....	14
3.4 Aislamiento e identificación de los flavonoides.....	19
3.5 Estudios sobre nuevos productos en la agroindustria Azucarera.....	21
3.6 Revisión de las técnicas analíticas de separación y cuantificación de compuestos fenólicos.....	24
3.6.1 HPLC en la caracterización de flavonoides	25
3.6.2 Detección de flavonoides mediante TLC	27
4.0 Justificación	29
4.1 Funciones y acciones de los flavonoides como metabolitos..... bioactivos	30
5.0 Metodología analítica	33
5.1 Muestras.....	33
5.2 Materiales y equipos.....	33
5.2.1 Técnicas cromatográficas.....	33
5.2.1.1 Cromatografía en capa fina (TLC).....	33
5.2.1.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).....	34
5.2.2 Equipos utilizados.....	35

	Pag
5.2.3	Estándares de flavonoides..... 35
5.3	Técnicas analíticas de extracción y separación de los metabolitos secundarios de estudio..... 36
5.4	Cuantificación de compuestos fenólicos por espectroscopía..... 38 UV/VIS
5.4.1	Empleo de la espectroscopia UV/VIS..... 38
5.4.2	Determinación de fenoles totales..... 38
5.4.3	Determinación de flavonoides totales..... 39
5.4.4	Determinación de antocianinas (o antocianos totales)..... 40
5.5	Validación de la técnica de HPLC para la cuantificación..... 41 de flavonoides y fenoles totales en material vegetal de variedades de caña de azúcar
5.6	Caracterización y cuantificación de flavonoides totales vía HPLC..... 42
5.6.1	Calibración..... 42
5.6.2	Condiciones cromatográficas..... 43
5.6.3	Optimización y criterio de eficiencia del método cromatográfico..... 44
5.6.4	Proceso de cuantificación..... 46
5.7	Determinación del contenido de flavonoides y fenoles en diferentes tipos de azúcares..... 46
6.0	Análisis de resultados..... 47
6.1	Proceso de extracción y aislamiento de compuestos..... 47 fenólicos en extractos de la caña de azúcar
6.2	Efecto del tiempo de sonificación en la extracción de compuestos fenólicos totales en tejidos foliares de caña de azúcar..... 48
6.3	Cuantificación de compuestos fenólicos totales por espectroscopía UV/VIS..... 50
6.4	Cuantificación de flavonas y flavonoles en extractos vía HPLC..... 54
6.5	Validación del método cromatográfico HPLC para cuantificación de flavonoides totales..... 64
6.6	Optimización y criterio de eficiencia del método cromatográfico..... 65
6.7	Flavonoides y fenoles en diferentes tipos de azucares..... 67

	Pag
7.0 Conclusiones y recomendaciones.....	70
8.0 Referencias bibliográficas.....	76
Anexos 1	80
Anexos 2.....	92
Anexos 3.....	95
Anexos 4.....	97
Anexos 5.....	99
Anexo 6.....	105

LISTADO DE TABLAS

	Pag
Tabla 1. Algunos ejemplos de flavonas y sus metil éteres.....	11
Tabla 2. Algunos ejemplos de flavonoles y sus metil éteres.....	12
Tabla 3. Principales flavonoides y/o sus derivados presentes en la caña de azúcar.	14
Tabla 4. Derivados del tricino en la caña de azúcar.....	15
Tabla 5. Algunos derivados de los grupos luteolina y apigenina reportados en la agroindustria azucarera.....	16
Tabla 6. Patrones de hidroxilación en algunos flavonoides.....	18
Tabla 7. Revisión general de productos y/o derivados de la caña de azúcar.....	23
Tabla 8. Estructura y λ_{UV} máxima para confirmación de compuestos en <i>S. officinarum</i> L. Gramineae.....	45
Tabla 9. Niveles de antocianinas observadas en cortezas de diferentes variedades de caña de azúcar.....	52
Tabla 10. Valores de R_f obtenidos vía cromatografía en capa fina (HPTLC) para los principales flavonoides, presentes en Hojas de caña de azúcar (Variedad CC 85-92).....	55
Tabla 11. Contenido de flavonoides totales en extracto metanólico de hojas de caña de azúcar obtenido por sonicación a 2 minutos. (Método cromatográfico de alta resolución).....	62
Tabla 12. Valores de factor de retención (K') del estudio de eficiencia del método cromatográfico.....	66
Tabla 13. Valores de factor de resolución (R_s) del estudio de eficiencia del método cromatográfico.....	66

Tabla 14.	Contenido promedio de fenoles, flavonoides y potasio Total en azúcares crudos, orgánicos y no orgánicos (Ingenio Providencia).....	69
Tabla 15.	Valores observados en los contenidos de fenoles, flavonoides y potasio en azúcares crudos, orgánicos y no orgánicos (Ingenio Providencia).....	69
Tabla 16.	Resumen de los parámetros, estadísticos del criterio del criterio de linealidad para las curvas de calibración de los flavonoides).....	81
Tabla 17.	Reproducibilidad del método a partir de una muestra de hojas de caña de azúcar (Variedad CC 84-56).....	86
Tabla 18.	Criterios de aceptación.....	86
Tabla 19.	Porcentajes de recuperación en los análisis cuantitativos de los flavonoides rutina y quercetina en muestras de hojas de caña de azúcar (Variedad CC 85-92).....	88
Tabla 20.	Resultado estadístico del porcentaje de recuperación	88
Tabla 21.	Resultado estadístico del estudio de aceptación del criterio t para exactitud en la determinación del contenido de un flavonoides (rutina) en un extracto de hojas de caña de azúcar.....	89
Tabla 22.	Parámetros para el cálculo de los límites de detección y cuantificación de flavonoides via HPLC (método isocrático).....	91

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.	Estructuras y numeración de las principales clases de flavonoides.....	6
Figura 2.	Estructuras generales de flavonas y flavonoles.....	13
Figura 3.	Efecto del tiempo de sonicación en la extracción de fenoles totales.....	49
Figura 4.	Contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides en algunas variedades comerciales de caña de azúcar (concentración expresada como equivalentes de ácido gálico para fenoles totales y equivalentes de rutina para flavonoides, en mg/100 g de planta).....	50
Figura 5.	Contenido de flavonoides totales en extractos de yemas y raíces de diferentes variedades de caña de azúcar.....	54
Figura 6.	Espectrogramas de absorción UV-VIS de una mezcla de NA, RU, QUE, LU, APIG. (a) para NA: naringina; (b) APIG: apigenina; (c) LUT: luteolina; (d); RU: Rutina (e) QUE: Quercetina	56
Figura 7.	a) Cromatograma HPLC-UV de mezcla de estándares de NA, RU, QUE, LU y APIG. Elución isocrática (fase móvil: metanol – Acetonitrilo - agua (35:15:50) conteniendo 1.0% de ácido acético) Detección UV a 350 nm b) Cromatograma HPLC - UV de extracto de raíces variedad CC 93-3895. Detección UV a 350 nm.	58
Figura 8.	Cromatograma HPLC-UV de extracto de hojas CC 84-75. Detección UV a 350nm.....	59
Figura 9.	Cromatografía HPLC-UV de extracto de hojas CC 84-75. Detección UV a 280 nm.....	60

Figura 10. Cuantificación total de flavonoides en hojas de caña de azúcar determinados vía HPLC.....	63
Figura 11. Descomposición térmica de las antocianinas presentes en la caña de azúcar.....	68
Figura 12. Curva de calibración para el flavonoide naringina (NA) en el rango de concentración de 2.5-100 ppm.....	82
Figura 13. Curva de calibración para el flavonoide rutina (RU) en el rango de concentración de 2.5-100 ppm.....	82
Figura 14. Curva de calibración para el flavonoide quercetina(QUE) en el rango de concentración de 2.5-100 ppm.....	83
Figura 15. Curva de calibración para el flavonoide apigenina (APIG) en el rango de concentración de 2.5-100 ppm.....	83
Figura 16. Curva de calibración para el flavonoide luteolina (LUT) en el rango de concentración de 2.5-100 ppm.....	84

ACRÓNIMOS

HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
UV / VIS	Espectrofotometría ultravioleta (UV) y visible (VIS)
RP	Fase reversa
MS	Espectrometría de masas
NMR	Resonancia magnética nuclear
GC	Cromatografía de gases
TLC	Cromatografía de capa fina (o delgada)
ODS	Octadecilsilil
CC	Cenicaña Colombia (Variedades de caña)
MZC	Mayagüez Colombia (Variedad de caña)
V	Venezuela (Variedad de caña)
POJ	Pro-Ost - Java (Variedad de caña de azúcar)
HPTLC	Cromatografía de capa fina de alta eficiencia
SPE	Extracción en fase sólida

RESUMEN

En Colombia, con el objetivo de explorar y estudiar productos agroindustriales se efectuó un estudio de implementación de técnicas rápidas de extracción y cuantificación de flavonoides y fenoles en hojas, raíces y yemas de diferentes variedades de caña de azúcar, basadas en cromatografía líquida (HPLC) y espectrofotometría (UV/VIS). Igualmente, se evaluó el contenido de fenoles y flavonoides totales, como agentes antioxidantes de interés comercial en diferentes tipos de azúcares.

Los resultados cromatográficos y espectrofotométricos indicaron que los contenidos de flavonoides difieren con la variedad, encontrándose un rango de flavonoides totales entre 0.080 y 1.40 mg/g de material vegetal. Entre los principales flavonoides detectados vía HPLC y de acuerdo con los estándares comerciales disponibles, se pueden mencionar la rutina, la quercetina, luteolina, naringina y apigenina.

Los contenidos de fenoles y flavonoides totales en los azúcares orgánicos y crudos superaron a los presentes en el azúcar blanco comercial. Los flavonoides se encontraron en el rango de 27 y 100 mg/kg en los azúcares orgánicos, niveles que son comparables al de otras fuentes nutricionales.

Palabras claves: Caña de azúcar, fenoles, flavonoides, cromatografía líquida (HPLC), espectrofotometría (UV/VIS), azúcares, tejidos vegetales.

1. INTRODUCCIÓN

Colombia, al igual que Brasil, es hoy en día uno de los más importantes productores de caña de azúcar como fuente de azúcar y más recientemente, a partir del 2005, para la producción de etanol como agente oxigenante de la gasolina.

La creciente apreciación de los altamente diversos efectos biológicos de los metabolitos secundarios o compuestos químicos presentes en las plantas con propiedades funcionales o tecnológicas, han cobrado gran importancia en los mercados de alimentos, farmacéuticos y cosméticos.

Entre los metabolitos secundarios reportados en la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* Sp., Gramineae), compuestos fenólicos como ácidos fenólicos y derivados C-glicosílicos, están ampliamente distribuidos en flores, hojas, corteza, azúcar y han sido aislados desde materiales del proceso azucarero¹. Sin embargo, la producción de flavonoides en las plantas depende no solamente de varios factores externos tales como el clima, condiciones de cultivo e interacciones ecológicas, pero también de variaciones entre las especies o variedades.^{2,3}

Entre los compuestos orgánicos presentes en plantas de importancia nutricional, los flavonoides han sido objeto de varios estudios debido a la correlación entre sus propiedades antioxidantes y su potencial para prevenir desordenes cardiovasculares, cáncer y otras enfermedades asociadas con el estrés oxidativo causado por los radicales libres y otras especies reactivas del oxígeno.⁴

Varias investigaciones han estado orientadas al diseño y desarrollo de métodos eficientes, económicos y favorables al ambiente para la extracción de flavonoides y de otros antioxidantes de origen vegetal, presentes en mezclas muy complejas. Técnicas basadas en HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia) con detección UV o de arreglos de diodos, al igual que otras tales como HPLC-UV-MS, han sido empleadas para obtener información de los compuestos presentes en extractos vegetales.⁵

A pesar del gran potencial de las técnicas disponibles, la identificación y cuantificación de los flavonoides en variedades y tejidos vegetales de la caña de azúcar, mediante técnicas rápidas y sencillas, es un gran desafío y tarea, en vista del gran número de flavonoides y de sus glicósidos. En este contexto, las extracciones asistidas por ultrasonido y mediciones basadas en HPLC-UV y espectrofotométricas, especialmente UV, fueron estudiadas y evaluadas para las condiciones del Sector Azucarero Colombiano.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO

Proponer alternativas y procedimientos que permitan dar valor agregado al azúcar, caña de azúcar y productos relacionados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar los productos y/o derivados de la caña de azúcar con potencialidad comercial.
- Desarrollar técnicas analíticas para extracción y caracterización de metabolitos secundarios tales como fenoles y/o flavonoides, en variedades de caña de azúcar de Colombia.
- Evaluar una técnica espectrofotométrica para determinar los compuestos fenólicos, como metabolitos de valor agregado o importancia en el cultivo de la caña de azúcar.
- Implementar y validar una metodología analítica por cromatografía líquida HPLC-UV que permita detectar y cuantificar los principales flavonoides presentes en materiales vegetales y productos de la caña de azúcar.

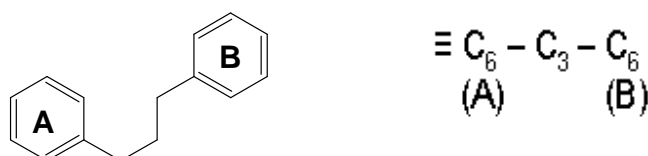
3. ANTECEDENTES

3.1 Flavonoides de la caña de azúcar

Flavonoides (del latín *flavus*, "amarillo"), son una clase de pigmentos naturales en la planta de caña. Ellos son extraídos cuando la caña es triturada, presentando importantes implicaciones en estrategias de cultivo de caña y en los pasos de remoción del color en la producción de azúcar.

3.1.1 Clases de flavonoides

Cinco clases de flavonoides: antocianinas, catequinas, chalconas, flavonoles y flavonas, se han reportado en la caña de azúcar y en sus productos. Todos estos metabolitos secundarios tienen en común un esqueleto hidrocarbonado $C_6-C_3-C_6$ con dos anillos aromáticos designados como A y B.



Cada tipo de flavonoide se distingue por sus diferentes estados de oxidación en la cadena C_3 . Las estructuras generales y numeración para cada clase de flavonoide se muestran en la **Figura 1**.

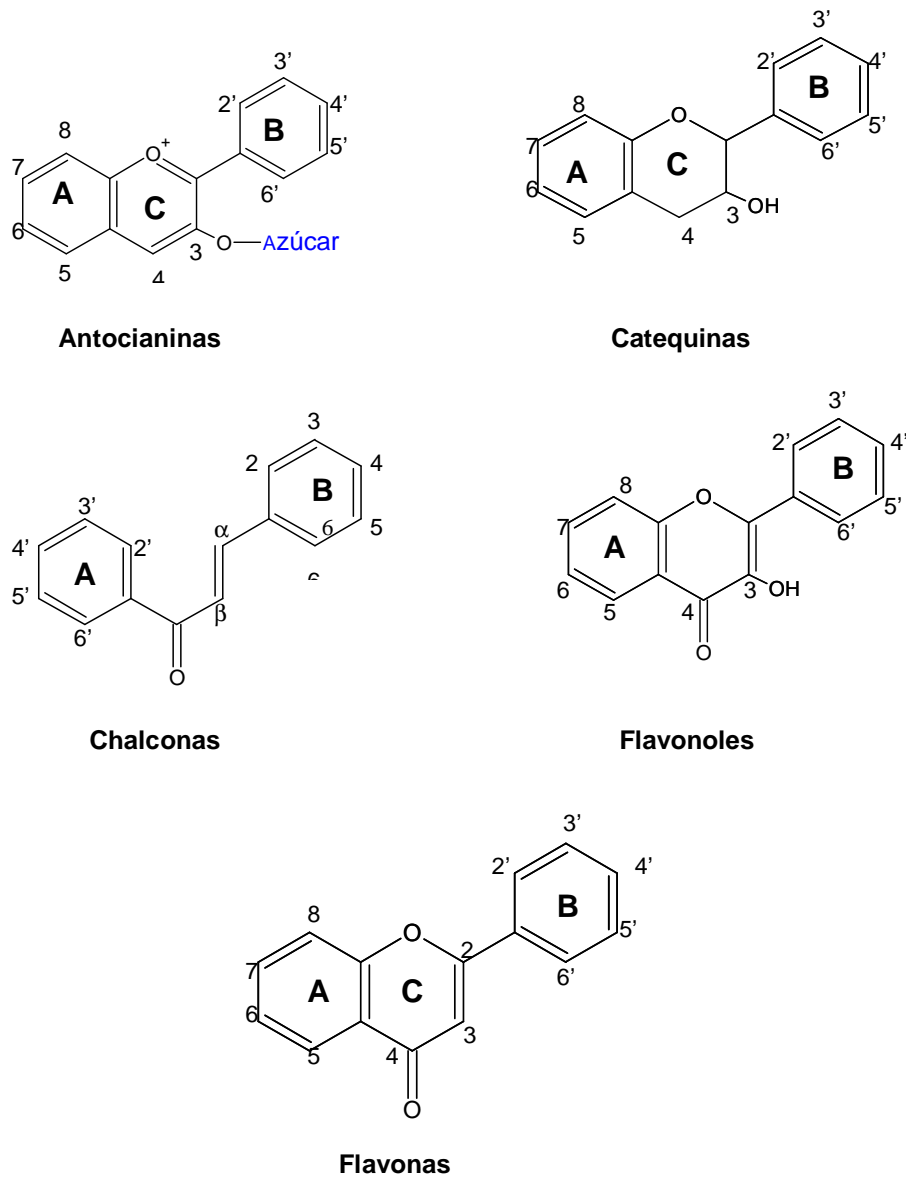
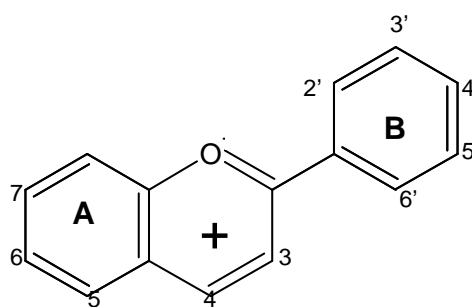


Figura 1. Estructuras y numeración de las principales clases de flavonoides

3.2 Antocianinas

Las antocianinas (del griego *anthos*: "flor" + *kyáneos*: "azul"), son uno de los grupos mas antiguamente conocidos de los pigmentos hidrosolubles que se hallan en las vacuolas de las células vegetales. Desde el punto de vista químico, las antocianinas pertenecen al grupo de los flavonoides y sus funciones en las plantas son múltiples, desde la protección de la radiación ultravioleta hasta la atracción de insectos polinizadores.⁶

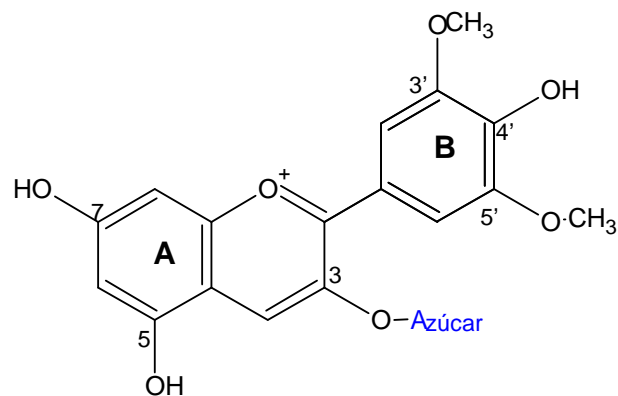
Estos compuestos son responsables de la amplia gama de pigmentos rojos, violeta y azul que se presentan en los tejidos vegetales de caña de azúcar y en otras plantas. Las agliconas o sea los residuos o estructuras libres de azúcares, llamados antocianidinas, son de carácter iónico y tienen una estructura común denominada catión flavilium (I)



I

I..Estructura catión flavilium

Las antocianinas son sales polifenólicas del catión flavilium (también denominado 2-fenilcromenilio), enlazadas a unidades de azúcares, las cuales se originan de seis antocianidinas denominadas pelargonidin, cianidin, delphinidin, peonidin, petunidin y malvidin (Por ejemplo, **estructura II**). Estos compuestos difieren en la posición y número de grupos hidróxidos en el anillo B, pero todos tienen una unidad de azúcar enlazada a la posición 3, la cual incrementa la solubilidad de estos metabolitos secundarios en el agua.



II

II..Estructura glicósido del malvidin

Con excepción del grupo petunidin en las antocianinas, representantes de todos los otros grupos han sido encontrados en la caña de azúcar. Investigadores australianos fueron los primeros en aislar un pigmento púrpura de la corteza de la variedad de caña de azúcar: “Púrpura de Mauricio”¹. Smith y Hall⁷ identificaron tentativamente las antocianinas de la variedad NCo 310 como derivados del luteolidin. La aglicona de este

pigmento se denomina también como 3-deoxiantocianidin debido a la ausencia de un grupo hidroxilo en la posición 3. Estos mismos investigadores observaron que las concentraciones más altas de antocianinas se presentan en los puntos de crecimiento de las variedades de caña de azúcar⁷. Ellos encontraron que estos compuestos, detectados en los jugos de caña de azúcar, sin embargo, no estaban presentes en muestras del proceso azucarero después de la etapa de clarificación. No obstante, Tu y Onna⁸ habían reportado la posible presencia de antocianinas en cristales de azúcares crudos. Ellos basaron su identificación en valores de R_f (cromatografía de papel) comparados con compuestos conocidos. Pero, es posible que Tu y Onna (1959) detectaron leuco-antocianinas (compuestos sin color), los cuales se convirtieron en antocianinas por medio de un tratamiento de separación e identificación con una solución ácida (por ejemplo, ácido clorhídrico diluido).

Timberlake⁹ investigó los efectos de pH y temperatura en función de la estructura y estabilidad de las antocianinas, demostrando que la acidez tiene un efecto protector sobre la molécula. Además, incrementos de temperatura resultan en pérdida del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y apertura del anillo con la consecuente producción de chalconas incoloras.

3.2.1 Extracción y fraccionamiento de Antocianinas

La extracción de antocianinas se efectúa comúnmente a temperatura ambiente con metanol previamente acidificado. El empleo de una solución ácida mantiene las antocianinas en su forma más estable como ion flavilium pero puede causar degradación de las antocianinas aciladas.

El empleo de metanol con 1% de HCl puede inducir una hidrólisis parcial de las antocianinas aciladas, mientras que 0.1% de HCl en metanol no causa degradación. Algunos investigadores han reportado, con éxito, el empleo de acetona (60%) en agua como un extractante de antocianinas de las uvas.¹⁰

El fraccionamiento de flavonoides de extractos de uvas y del vino ha sido efectuado mediante extracción líquido-líquido o extracción en fase sólida (SPE). La extracción líquido-líquido mediante agua y éter etílico permite la recuperación de monómeros de flavonol y agliconas de flavonoles en la fase orgánica, mientras que las antocianinas, glicósidos de flavonoles y proantocianidinas permanecen en la fase acuosa. Los cartuchos SPE, C18 Sep – Pak™ permite separaciones similares con reducción de volúmenes de solvente y tiempo de fraccionamiento. Sucesivas eluciones con éter etílico, acetato de etilo y metanol permite también la separación de monómeros y oligómeros de flavonoles, los cuales son recuperados respectivamente, en el éter etílico y acetato de etilo, mientras que polímeros de proantocianidinas y antocianinas son eluidos juntos con el metanol.

3.3 Flavonas y Flavonoles

La distribución de algunas flavonas y flavonoles, con sus metil éteres se resumen en las **Tablas 1 y 2**. Como se observa, el número de especies vegetales que acumulan estos compuestos se han venido incrementando con el desarrollo de la investigación científica.

Tabla 1. Algunos ejemplos de flavonas y sus metil éteres^a

Flavonas	Nombre trivial	Fuente Vegetal
di-O-sustituidas 5, 7 - di-OH	C Risina	Varias. Ej: <i>Artemisia campestris</i> (partes aéreas)
tri-O-sustituidas 5, 7, 4' - tri-OH	Apigenina	Varias. Ej: <i>Petroselinum</i>
5, 7 - di-OH y 4'-OMe	Acacetina	Varias plantas (Ej: Robinia)
tetra-O-sustituidas 5, 6, 7, 4' - OH	Escutelareína	Centaurea jacea (partes aéreas) <i>Duranta plumieri</i> (tallos)
5, 7, 4' - tri OH y 6 - OMe	Hispidulina	Muchas plantas Fam. <i>Compositaceae</i>
5, 7, 3', 4' - tetra - OH	Lutedina	Muchas fuentes vegetales (Ej: Reseda)
5, 7, 3' - tri OH y 4'-OMe	Diosmetina	<i>Artemisia iwayomogi</i> , <i>A. molinieri</i> (Fam. <i>Compositaceae</i>). Partes aéreas)

^a Fuente: *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications*.
Edited by O. M. Andersen et al. (2006)

Tabla 2. Algunos ejemplos de flavonoles y sus metil éteres^a

Flavonoles	Nombre trivial	Fuente Vegetal
<p>Tri-O-sustituidos</p> <p>3, 5, 7 - tri-OH</p>	Galangina	<p>Varias.</p> <p>Ej: <i>Baccharis viminea</i> (partes aéreas) Especies Fam. <i>Compositaceae</i></p>
<p>Tetra-O-sustituidos</p> <p>3, 5, 7, 4' - tetra-OH</p>	Kaemferol	Varias. Ej: <i>Delphinium</i>
<p>Penta -O-sustituidas</p> <p>3, 5, 7, 8, 4' - penta-OH</p> <p>3, 5, 7, 3', 4' - penta-OH</p> <p>3, 5, 7, 3', 4' - tetra-OH y 7-OMe</p>	<p>Herbacetina</p> <p>Quercetina</p> <p>Ramnetina</p>	<p>Fam. <i>Compositaceae</i> (Ej: <i>Ozothamnus spp</i>)</p> <p>Varias (Ej: <i>Quercus</i>)</p> <p><i>Artemisia campestris</i> (Fam. <i>Compositaceae</i>)</p>
<p>Hexa -O-sustituidos</p> <p>3, 5, 7, 8, 3', 4' - hexa-OH</p>	Gossipetina	<i>Gossypium</i>

^aFuente: *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications.*
Edited by O. M. Andersen et al. (2006)

Los representantes más abundantes de los flavonoides naturales son las flavonas y flavonoles (**Figura 2**). Se han aislado tanto libres como en forma de glicósidos y están distribuidos en todos los órganos de las plantas de una gran variedad de géneros y familias.

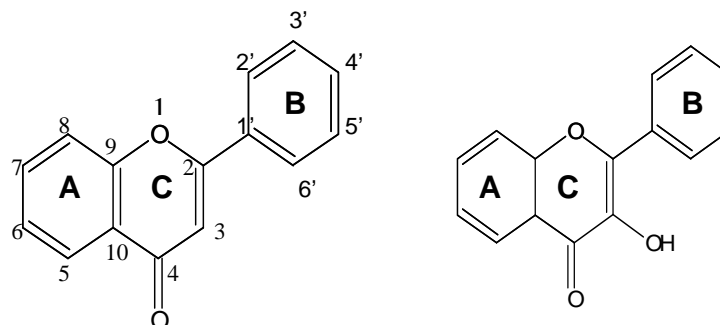


Figura 2. Estructuras generales de flavonas y flavonoles

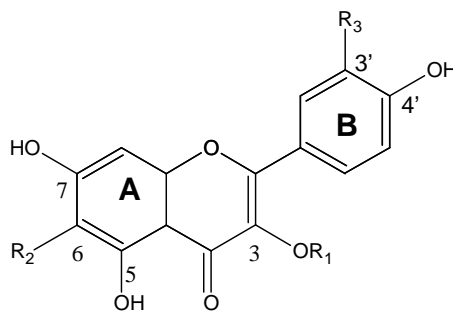
Los compuestos más frecuentes de estos grupos son: apigenina y apiína (7-O-apioglucósido), luteolina y sus glicósidos, quercetina (de mayor abundancia) y rutina (3-O-rutinósido), kaemferol y sus glicósidos, donde generalmente la unidad de azúcar se encuentra en el anillo A (**Figura 2**).

3.3.1 Flavonoles

En un estudio efectuado por Farber y Carpenter ¹¹ se reportó la presencia de tres flavonoles (**Tabla 3**) sobre la base de los valores de R_f (cromatografía de capa fina), desplazamiento electroforético y comparación con compuestos conocidos. La estructura fundamental de este grupo de flavonoides, al igual que su fuente o tejidos de caña de azúcar, se describe en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Principales flavonoides y/o sus derivados presentes en la caña de azúcar.

Compuestos	R ₁	R ₂	R ₃	Fuente
Quercetina	H	H	OH	Corteza de caña de azúcar
Rutina	Rutinosa	H	OH	Hojas de caña de azúcar
Kaemferol	H	H	H	Azúcar cruda
Quercetagenin 3,6 - dimetil eter	CH ₃	OCH ₃	OH	Flores de caña de azúcar



III

III. Estructura básica de un flavonol y su patrón de derivados en caña de azúcar

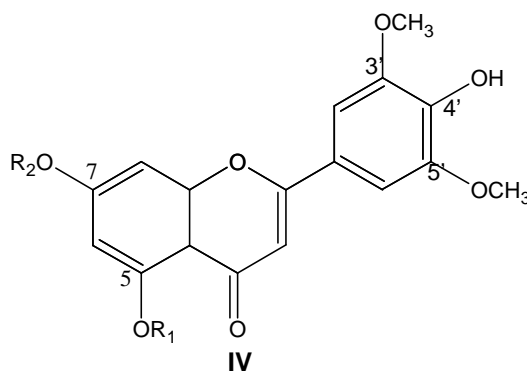
3.3.2 Flavonas

Más de 20 flavonas han sido identificadas en el género *Saccharum* y en productos como el azúcar, todos ellos derivados de los grupos tricino, luteolina y apigenina.

El grupo tricino de los pigmentos vegetales está ampliamente distribuido en la familia *Gramineae*, de la cual la caña de azúcar es un miembro importante. La aglicona del tricino ha sido detectada al menos en 16 de los 20 géneros de la familia *Gramineae*, donde en el género *Saccharum* (grupo botánico que incluye las variedades de caña de azúcar) se han identificado derivados del tricino en hojas y material coloreado de las meladuras ¹ (**Tabla 4**).

Tabla 4. Derivados del tricino en la caña de azúcar

Compuestos	R ₁	R ₂	Fuente
Sulfato de potasio del Tricin 7 - glucósido (T - 7GS)	H	Glu - SO ₃	Hojas
Tricin 7 - glucosil - glucósido (T - 7GG)	H	Glu - glu	Hojas
Tricin 7 - Rhamnosil - glucósido (T - 7RG)	H	Rha - glu	Hojas
Tricin 5 - glucósido	Glu	H	Hojas
Tricin 7 - (2 ^o Rhamnosil) - α - galacturonido	H	Rha - galur	Meladura
Tricin 7 - glucosido	H	Glu	Meladura



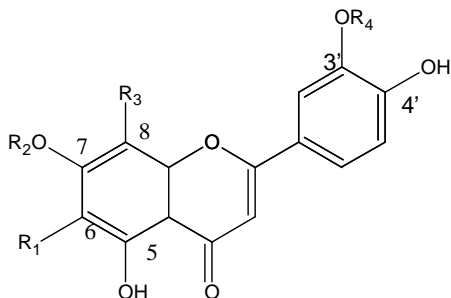
IV. Estructura básica de los derivados del grupo tricino, todos O-glucosidos

El grupo luteolino y apigenino de los pigmentos ocurren principalmente como C-O glicósidos en la caña de azúcar; así por ejemplo, algunos de los azúcares están enlazados al anillo A por medio de enlaces C-C en las posiciones 6 u 8, o en ambas. Las estructuras básicas, al igual que algunos ejemplos de los compuestos de los grupos luteolino y apigenino identificados en la caña de azúcar se describen en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Algunos derivados de los grupos luteolina y apigenina reportados en la agroindustria azucarera^a

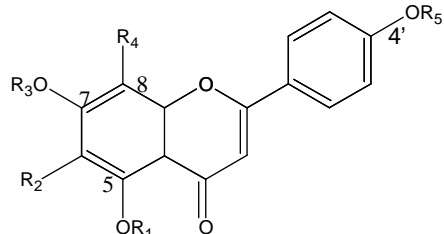
Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Fuente
Grupo Luteolina						
Luteolin G - C - Glucósido	Glu	H	H	H	-	Hojas
Luteolin G - C - Glucosil - 7 - 0	Glu	Glu	H	H	-	Hojas
Glucosido (0 - 7 G) 6 - metoxiluteolin	CH ₃ O	H	H	H	-	Meladura
Grupo Apigenina						
Apigenin 5 - 0 - metil eter	CH ₃	H	H	H	H	Flores
Apigenin 5 - 0 metil eter 4' - 0 - galactosido	CH ₃	H	H	H	Gal	Corteza
Apigenin 5, 7- 0 - dimetil eter 4' - 0 - glucosido	CH ₃	H	CH ₃	H	Glu	Corteza y hojas
Apigenin 6 - C - glucosido	H	Glu	H	H	H	Hojas

^aFuente: Peter Smith y Nancy H. Paton. *Sugar Tech. Rev.*, 12 (1985) 117 – 142



V

Grupo Luteolino



VI

Grupo Apigenino

A pesar de la diversidad de flavonoides identificados en tejidos de caña de azúcar y en materiales del proceso azucarero, tales como la meladura, la mayoría de estos compuestos conforman los siguientes patrones de hidroxilación, donde los grupos hidroxilos pueden encontrarse en forma libre o sustituida (**Tabla 6**). De esta manera, tenemos:

- i) Todos están hidroxilados en las posiciones 5 y 7 del anillo A.
- ii) El anillo B tiene tres patrones de hidroxilación (4'; 3', 4'; 3', 4', 5')

Tabla 6. Patrones de hidroxilación en algunos flavonoides

Clase de Flavonoide	Patrón de Hidroxilación		
	4'	3' 4'	3' 4' 5'
Antocianinas	Pelargondina	Cianidina	Malvidina
Flavonas	Apigenina	Luteolina	Tricino

Los patrones comunes de hidroxilación en las diferentes clases de flavonoides indican que estos compuestos tienen también precursores comunes durante su biosíntesis en plantas como la caña de azúcar¹.

Más recientemente, Renata Colombo y otros investigadores^{3,12,13} en el Brasil, reportaron la presencia de glicósidos de flavonas en extractos de hojas, bagazo y jugos de caña de azúcar de variedades naturales y transgénicas. Mediante técnicas cromatográficas (HPLC–UV) y espectrometría de masas (MS) estos investigadores demostraron la presencia de glicósidos de metoxiflavonas y de sus agliconas. Las hojas de caña de azúcar analizadas en Brasil (2006) demostraron ser una fuente importante de flavonoides, con un promedio de 1.10 mg de flavonoides totales por gramo de material vegetal (hojas frescas). Además, se reportó un contenido de flavonoides de 0.6 mg /mL en jugos de caña de azúcar, el cual fue comparable a otras fuentes de alimentos ricos en flavonoides³.

3.4 Aislamiento e identificación de los flavonoides

Como los compuestos fenólicos, los flavonoides son por lo general, altamente polares y esta propiedad es aprovechada para su aislamiento. Se ubican preferentemente en las vacuolas y por tanto son hidrofílicos. Sin embargo, la extracción con agua o solventes acuosos pueden presentar desventajas como es la co-extracción de otros compuestos hidrosolubles difíciles de separar: azúcares, péptidos o enzimas. Mediante solventes acuosos no es posible aislar aquellos flavonoides ocluidos en los cloroplastos y otros organelos, pues se requiere de solventes lipídicos. Los polifenoles, a menos que sean totalmente esterificados o eterificados, son solubles en solventes polares (como por ejemplo metanol o etanol) y los glicósidos lo son en agua⁶.

A pesar de las posibles desventajas o dificultades que puedan tener el empleo de solventes polares, los flavonoides, debido a su alta solubilidad en agua, se pueden extraer de los tejidos de la caña de azúcar mediante maceración o ultrasonido, con soluciones de metanol o agua³. Los extractos acuosos resultantes han sido purificados mediante SPE seguido de análisis cromatográfico (TLC o HPLC). Las diferentes técnicas cromatográficas, además de reducir el tiempo de separación, simplifican los análisis y tratamientos previos.

El empleo de fases reversas (RP-8 y RP-18) en HPLC y de mezclas de metanol-agua o acetonitrilo-agua tanto para las agliconas como para los glicósidos de los flavonoides presentes en tejidos vegetales y materiales del proceso azucarero de la caña de azúcar, han sido reportados tanto por investigadores australianos¹.

La espectroscopia UV ha sido utilizada con éxito en la caracterización y cuantificación de flavonoides en las plantas¹. Las máximas absorciones de los flavonoides no sólo varían de acuerdo con el estado de oxidación del anillo central (anillo C), sino además con número y posición de los grupos oxigenados (OH, OR), como resultado de los diferentes sistemas conjugados.

Para las flavonas y los flavonoles la banda I (transiciones electrónicas $n \rightarrow \pi^*$) se encuentra entre 320 y 380 nm mientras que la banda II (transiciones electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$) se localiza entre 240 y 270 nm. Sin embargo, estos valores cambian con el solvente, siendo menores en agua que en metanol (o etanol) y sufren un corrimiento del máximo de absorción a mayores longitudes de onda en medio ácido. Al aumentar el número de grupos hidróxilos conjugados con el sistema insaturado, la máximo de absorción también se desplaza a mayores longitudes de onda⁶.

3.5 Estudios sobre nuevos productos en la agroindustria azucarera

La caña de azúcar es un material extremadamente versátil. A partir de ella, se obtiene principalmente la sacarosa en forma de cristales de azúcar comercial como producto principal. A Mayo de 2007, en Colombia se obtuvo una producción de 17.503.116 quintales de azúcar, con un rendimiento comercial promedio de 11.6%.¹⁴ A partir del año 2005 se inició la producción de alcohol carburante, con una proyección de 300 millones de litros de etanol/año, distribuido principalmente en cinco ingenios azucareros colombianos¹⁵. Otros subproductos como la cachaza, vinaza (proveniente de la producción de etanol) y residuos de post-cosecha (hojas y cogollos picados) se incorporan en el suelo como bioabonos o fertilizantes¹⁶. Por otra parte, las mieles (final, virgen) que se producen (11.414 toneladas métricas, dato del 2004) en el proceso azucarero en Colombia están destinadas a la producción de alcohol, alimentación animal y elaboración de otros productos de interés industrial como vinagre, levaduras, etc.¹⁷ Existen, sin embargo, otros productos o subproductos derivados reportados en la literatura¹⁸ para la agroindustria azucarera, tales como las dextranas, gomaxantana, sorbitol, glicerol, ceras xilitol, anti-fungicidas, ácido láctico, glutamato monosódico, etc. que merecen un estudio especial desde el punto de vista de su mercado potencial, bajo las condiciones de Colombia (oferta/demanda nacional e internacional). Otros productos de buen mercado y de interés comercial es el ácido cítrico, que tiene el azúcar como uno de sus principales insumos y cuya

tecnología ampliamente conocida es utilizada en Colombia por la empresa Sucromiles. Los plásticos biodegradables a partir de la caña de azúcar y la síntesis de sucroesteres como agentes surfactantes han llamado la atención de inversionistas e investigadores¹⁸ (**Tabla 7**). La creciente atención en productos de interés medicinal y/o fito nutrientes, tales como los flavonoides, ha sido estimulada por sus potenciales beneficios en la salud humana.

Estudios previos han mostrado que la caña de azúcar, es una fuente potencial de flavonoides, principalmente en la forma de C-glucósidos¹. Mas recientemente en Brasil se han evaluado y reportado los resultados del análisis cuantitativo de flavonoides en hojas, jugos y bagazo de caña de azúcar de variedades transgénicas. Así, por ejemplo, estos estudios demostraron un contenido total de flavonoides de 1.705 mg/g en muestras de hojas y de 0.695 mg/g en muestras de jugo comercial.³

La terapéutica clínica ha reconocido el importante papel de los flavonoides como agentes anti-oxidantes¹⁹. Como se mencionó anteriormente,^{1,3} en la caña de azúcar se han reportado flavonoides, de los cuales varios han sido identificados también en ciertos vinos²⁰. El empleo de flavonoides como agentes farmacéuticos para la prevención de la arterosclerosis, anti-inflamatorios, anti-virales y anti-cancerígenos ha sido reconocido, evaluado y reportado por diferentes agencias o institutos de salud humana (**Tabla 7**).

Tabla 7. Revisión General de Productos y/o Derivados de la Caña de Azúcar

Origen y/o fuente	Productos principales	Uso y actividad	Mercado actual y potencial	Método de análisis	Valor comercial (si se conoce)
- Caña - Hojas - Tallos (jugos) - Raíces - Azúcar Cruda o morena - Mielles o extractos	Flavonoides Tricinol (Tx, T7GS) Apigenino Luteololno Antocianinas Glicósidos de flavonoides Isoflavonas Fenil - Propanoides	Marcadores genéticos Anti - oxidantes Prevención de la aterosclerosis Anti - inflamatorios naturales Anticancerígenos Anti-virales, etc. Disminución de la fragilidad capilar. Protección de las plantas de la radiación UV. Agentes protectores contra el ataque de patógenos. Actividades de NodD proteínas (fijación de N y factores de reconocimiento para especies de Rhizobia)	Material base para la elaboración de medicamentos. Ej: Flavin 7 (previene enfermedades malignas)	HPLC HPTLC GC / MS Detectores: UV RMN (necesario disponer o estudiar otros métodos)	Ej: Eyesight con flavonoides US \$4.95 / paquete (5 tabletas) Mercado global de fitonutrientes US\$94 millones en el 2000 hasta US\$ 114 millones en el 2008.
Azúcar	Polisacáridos y glicoproteínas. Sucroesteres vía síntesis química.	Asociados con el potencial floc en bebidas no alcohólicas. Tensoactivos o surfactantes (para control de plagas, cosméticos, alimentos, industria farmacéutica).	Calidad del azúcar (su presencia no es buena). Importante detectar el problema. Sectores agrícola, alimentos y farmacéutico.	Métodos cromatográficos. (necesario explorar otros métodos).	Control de calidad del azúcar Desarrollo Tate and Lyle. Prod. 2600 t/año US\$ 10.5/Kg
Tallos Cachaza	Policosanol	Suplemento nutricional. Protector cardiovascular (disminución de los niveles de colesterol).	Producto farmacéutico natural.		
Tallos Hojas Raíces Flores	Terpenoides (sesquiterpenos)	Reguladores del crecimiento y asociación con la microflora del suelo (presencia en las raíces).		Cromatográficos	

3.6 Revisión de las técnicas analíticas de separación y cuantificación de compuestos fenólicos

Las separaciones preparativas de flavonoides de fuentes naturales son todavía materia de desafío y estudio. No existe un método general, sencillo y directo para la extracción de productos naturales como los flavonoides, a pesar de la disponibilidad de técnicas cromatográficas modernas. Cada problema particular de separación de compuestos de origen natural tiene que ser considerado y evaluado y en este aspecto los flavonoides no son una excepción. Sin embargo, algunos procedimientos de separaciones analíticas de flavonoides están disponibles dentro de trabajos de rutina. Así por ejemplo, hoy en día, se reporta el empleo de técnicas basadas en el empleo de GC y HPLC.

La actual tendencia es hacia el empleo de múltiples técnicas tales como HPLC-UV-MS y HPLC-UV-NMR, las cuales tienen un amplio potencial en investigación de extractos vegetales²¹, pero que bajo las circunstancias de nuestro medio son de alto costo. En un principio, TLC fue una de las técnicas de separación de mayor empleo para la caracterización de compuestos fenólicos. Sin embargo, la mayoría de los actuales trabajos en tejidos vegetales reportan aplicaciones cualitativas y cuantitativas de HPLC en los análisis de extractos vegetales. La cromatografía de gases, por otra parte, es

en general poco práctica, debido a la baja volatilidad de muchos compuestos fenólicos y a la necesidad de disponer o sintetizar derivados volátiles.

3.6.1 HPLC en la caracterización de flavonoides

El método de preferencia para análisis cualitativo y cuantitativo de flavonoides es HPLC. Desde su introducción en el año 1970, HPLC fue utilizada para todas las clases de flavonoides y cientos de aplicaciones han sido publicadas¹⁰. En los trabajos analíticos de HPLC para una determinada subclase de flavonoides (flavonas, flavonoles, isoflavonas, antocianinas, etc), la fase estacionaria, el solvente (fase móvil) y el gradiente (cuando ha sido utilizado) han sido optimizados. Una muy alta proporción de separaciones de flavonoides se efectúan mediante fases enlazadas de octadecilsilil (ODS, RP-18 o C18). Algunos análisis han reportado también el empleo de fases enlazadas de octasilil (RP-8 o C8), pero estos son menos comunes. Los glicósidos de flavonoides son eluidos antes que sus agliconas mediante estas fases y flavonoides que poseen mas grupos hidroxilos son eluidos antes que sus análogos menos sustituidos. Como solventes son comunes las mezclas de acetonitrilo-agua o metanol-agua, con o sin pequeñas cantidades de un ácido orgánico (por ejemplo ácido acético). Estas mezclas son compatibles con gradientes y detección UV. Ocasionalmente se han empleado otros solventes tales como tetrahidrofurano, isopropanol, o n-propanol. Los modificadores ácidos son necesarios para suprimir la

ionización de los grupos hidroxilos fenólicos, dando picos o señales más finas con menores colas. Estudios también han demostrado que existen grandes diferencias en la eficiencia de las columnas C18 para la separación de las agliconas y glicósidos de los flavonoides. Mientras algunas columnas dan buenos resultados, otras producen bandas sustancialmente anchas y asimétricas.

Fases estacionarias C8 con *endcapping* hidrofílicos se han también desarrollado para las separaciones de analitos muy polares.

Las fases normales (silica gels no modificadas) raramente se emplean en la separación y cuantificación de flavonoides, excepto para la separación ocasional de agliconas de flavonoides débilmente polares, flavonas polimetoxiladas, flavononas o isoflavonas. C-glicosidos de flavonas generalmente eluyen con menores tiempos de retención que los correspondientes O-glicósidos. Además, 8-C-glicosil flavonas eluyen a menores tiempos de retención que sus correspondientes 6-C-glicosil flavonas. Así pues, por ejemplo, el 8-C-glucosido del apigenin eluye mas temprano que el 6-C-glucosido del apigenin¹⁰.

Las flavononas eluyen antes que sus correspondientes flavonas debido al efecto de insaturación entre las posiciones 2 y 3. Las antocianinas existen en

solución como varias formas en equilibrio, dependiendo del pH y temperatura. Con el propósito de obtener resultados reproducibles en HPLC, para la determinación de esta clase de flavonoides, es esencial controlar el pH de la fase móvil y trabajar con columnas termostáticamente controladas.

En general, de los métodos existentes para la caracterización y cuantificación de flavonoides, es importante mencionar que en el 90% de los casos, las separaciones utilizan columnas C18 en HPLC.

3.6.2 Detección de flavonoides mediante TLC

TLC es una técnica rápida e ideal para un diagnóstico de extractos vegetales. Muchas clases de solventes han sido empleados para la caracterización de flavonoides utilizando placas o cromatofolios de silica gel (fase normal). Flavonas y flavonoles altamente metilados o acetilados requieren solventes no polares tales como cloroformo – metanol (15:1). Agliconas de flavonoides tales como apigenina, luteolina y quercetina, pueden ser separados mediante una mezcla de cloroformo–metanol (96:4) y con solventes de similar polaridad. Un sistema de solventes de amplia aplicación o uso para glicósidos de flavonoides consiste de la mezcla de acetato de etilo–ácido fórmico–ácido acético–agua (100:11:11:26). Respecto a la detección, los flavonoides aparecen como manchas oscuras bajo la exposición de luz ultravioleta, cuando se emplean placas o cromatofolios con

indicadores de fluorescencia (tales como silica gel F₂₅₄). Bajo luz UV de 365 nm, dependiendo de la clase de flavonoides, se evidencian manchas amarillas (o color naranja), verdes o azules, las cuales se intensifican o cambian con el empleo de soluciones reveladoras (por ejemplo cloruro de aluminio al 5% en metanol)²².

En algunas ocasiones mejores resoluciones de una mezcla de flavonoides en un extracto vegetal, se han obtenido mediante el empleo de cromatoplasmas de HPTLC (silica gel 60 F₂₅₄, RP-18). Fases móviles de metanol-agua se recomiendan cuando se emplean estas placas de silica gel químicamente modificadas, pero se requiere a veces adicionar un poco de un ácido orgánico (por ejemplo ácido acético) para evitar la formación de colas.

4. JUSTIFICACIÓN

En la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* Sp. Gramineae) compuestos fenólicos como ácidos fenólicos y derivados C-glicosílicos de grupos de flavonas y flavonoles, están ampliamente distribuidos en flores, hojas, corteza, azúcar y han sido aislados desde materiales del proceso azucarero.^{1,23}

La industria de caña de azúcar reconoce que es dependiente sobre la calidad y rendimiento de la cosecha. Hay siempre una necesidad para mejoramiento de rendimiento azucarero, resistencia de enfermedades y propiedades del proceso. Así, la industria ha desarrollado nuevas variedades continuamente. El centro de Investigación de Caña de azúcar de Colombia, exhibe algunas variedades híbridas que consisten de *S. officinarum* combinada con una pequeña cantidad de caña resistente *Saccharum spontaneum* para impartir vigor y resistencia a enfermedades. Algunas otras especies son también usadas en clonaciones de caña. Claramente, hay una necesidad para ampliar la base genética de variedades comerciales en programas de mejoramiento genético futuro. El uso de flavonoides y otros marcadores bioquímicos es útil para identificar nuevos germoplasmas los cuales podrían ser incorporados en nuevas variedades de caña.

Por otro lado, los manejos en las explotaciones comerciales de la cosecha en verde sugieren la posibilidad de aprovechar los residuos de material vegetal de caña de azúcar. Así por ejemplo, los residuos de caña (especialmente, hojas, cogollos y raíces) los cuales representan en promedio entre el 20 y el 30% de la producción por hectárea de la caña de azúcar, se acumula en el campo después de la cosecha^{24,25}. La abundancia de material biológico y la presencia de compuestos fenólicos (a los cuales se les atribuye actividad biológica) en los tejidos vegetales no han sido ampliamente investigados. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue desarrollar una metodología analítica que permitiera caracterizar y/o determinar el contenido de compuestos fenólicos (especialmente flavonoides) implicados en la cualidades sensoriales (color, olor y sabor) y a los cuales se les atribuye actividades de importancia en la salud humana, tales como antioxidantes, antimicrobiales, antialérgicas y antiinflamatorias presentes en los tejidos vegetales de las variedades de caña de azúcar, tanto comerciales como promisorios.

4.1 Funciones y acciones de los flavonoides como metabolitos bioactivos

Además de su importante rol en las plantas y en las interacciones planta–insecto, los flavonoides han sido investigados ampliamente durante las últimas dos décadas por sus posibles efectos en la salud humana con una dieta rica en productos naturales de origen vegetal. Los flavonoides,

especialmente flavanoles, flavonoles y antocianinas, son relativamente abundantes en la dieta humana, parcialmente biodisponible y posiblemente involucrada en mecanismos, relacionados con la prevención de cánceres, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neuro-degenerativas y propiedades anti-oxidantes.

La interacción flavonoide–proteína en las plantas es un factor importante, como por ejemplo, en la biosíntesis de flavonoides y en mecanismos de defensa química mediada por los flavonoides.

En las plantas los flavonoides están asociados con el desarrollo y estado de los cultivos. Muchas de las tareas que desempeñan tienen que ver con la atracción de animales (vectores) que contribuyen o colaboran con la polinización o dispersión de las semillas, estímulo de bacterias del Rhizobium para la fijación del nitrógeno, asimilación de nutrientes y resorción de los mismos de las hojas en estados de senescencia. Los flavonoides también participan y colaboran con las plantas frente a una variedad de estrés abióticos y actúan como agentes de defensa contra el ataque de patógenos y herbívoros e igualmente forman parte o son la base de las interacciones alelopáticas con otras especies vegetales. Los flavonoides son extremadamente útiles para las plantas y no sorprende por tanto, que las

especies de todas las órdenes del reino vegetal inviertan gran parte de su energía metabólica en la producción de estos compuestos¹⁰.

En la pasada década ha ocurrido un resurgimiento de la actividad investigativa sobre la función de los flavonoides en las plantas. Existen varias razones para ello. Primero, los avances de la biología molecular, acoplada con estudios de la biosíntesis de flavonoides y la producción de plantas transgénicas. En segundo lugar, el desarrollo de novedosas técnicas analíticas para la caracterización de flavonoides ha estimulado la búsqueda de nuevos compuestos útiles para la manipulación del color de las flores. En tercer lugar, el ensanchamiento de la capa de ozono y el incremento de la exposición de la biota a la radiación UV ha conducido al conocimiento y descubrimiento que algunos flavonoides juegan un papel muy importante en la protección de las plantas a la acción dañina de los altos niveles de radiación UV¹⁰.

5. METODOLOGÍA ANALÍTICA

5.1 MUESTRAS

Las muestras consistieron de hojas, raíces, tallos y yemas de *S. officinarum* L. *Gramíneae*, de 10 variedades CC y MZC, las cuales se recolectaron en la estación experimental de San Antonio de los Caballeros. Igualmente, se analizaron 36 muestras de azúcares blancos de caña orgánica y no orgánica (cultivo sin fertilización química) y crudos (10 muestras) obtenidos en el proceso azucarero de un ingenio azucarero del Valle del Cauca.

5.2 MATERIALES Y EQUIPOS

5.2.1 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

5.2.1.1 Cromatografía en capa fina (TLC)

Previo a los análisis de cromatografía líquida y espectrofotométrica, se efectuó un diagnóstico preliminar mediante cromatografía en capa fina, de extractos alcohólicos obtenidos de hojas de una variedad de caña de azúcar (CC 85-92) mediante maceración durante ocho días. Se utilizaron para ello cromatofolios (ó placas) de fase reversa (HPTLC) de silical gel 60 F₂₅₄

(Marca Merck), con indicador de fluorescencia. Se empleó para ello como fase móvil, acetato de etilo-metanol-agua-ácido fórmico (50:2:3:6) y estándares de los principales flavonoides disponibles para el estudio, tales como: rutina, quercetina, naringina, luteolina y apigenina. Las muestras fueron reveladas con una mezcla de tricloruro de aluminio al 2% en etanol y observación con una lámpara de UV de corta y larga longitud de onda (366 y 252 nm).

5.2.1.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Para la purificación de los extractos obtenidos de los diferentes materiales estudiados, se emplearon cartuchos C18 (Sep-Pak) y HLB Oasis (60 mg y 30 µm de partículas, marca Waters, Milford, MA, U.S.A.) En los análisis de HPLC para la caracterización de flavonoides se empleó una fase móvil constituida por metanol-acetonitrilo-agua (35:15:50) con 1% de ácido acético, con un flujo de 0.5 ml/min en forma isocrática a 25°C. Se emplearon las columnas de fase reversa Aquasil C18 (4.6 x 100 mm; 3 µm de partícula) y Betasil C18 (4.6 x 100 mm; 3 µm de partícula). Los análisis cromatográficos se efectuaron a dos longitudes de onda del detector (UV-VIS): 280 nm (para Naringina y Apigenina) y 350 nm (para rutina, quercetina y luteolina).

5.2.2 Equipos utilizados

Se utilizó un sistema de HPLC constituido por:

- 1 Bomba modelo 510 (Waters)
- 1 Bomba modelo 515 (Waters)
- 1 Detector de UV – VIS modelo Lambda Max 486 (Waters)
- 1 Inyector automático (Waters™ 717 plus)
- 1 Software 2010 Chromatography Manager (Millenium login versión 2.5).

Para las evaluaciones y determinaciones espectrofotométricas se empleó un espectrofotómetro UV–VIS, Shidmazu 1601 PC, provisto de cubetas de cuarzo de 1 cm y 1 mL de capacidad. Igualmente, se empleó un equipo básico de laboratorio, incluyendo un baño de ultrasonido (Modelo Ultrasonic Cleaner).

5.2.3 Estándares de flavonoides

Se emplearon para el diagnóstico y/o caracterización de los flavonoides, los siguientes:

- Naringina (Cat. No. 46,074-5) de Aldrich (Germany)
- Rutina (Cat. No. 42,074-5) de Aldrich (Germany)
- Quercetina (Cat. No. 40,074-5) de Aldrich (Germany)

-
- Luteolina de Aldrich (Germany)
 - Apigenina de Aldrich (Germany)

5.3 Técnicas analíticas de extracción y separación de los metabolitos secundarios de estudio

El material vegetal fue secado en una estufa a 40°C seguido de trituración y tamizaje (diámetro de malla, 20 mesh). Se efectuó una maceración convencional de la muestra (sin agitación y a temperatura ambiente de 25°C) durante ocho días, con etanol (96%) como solvente²⁶.

Inicialmente, con el objetivo de mejorar y agilizar la extracción de los compuestos de interés del material vegetal molido o preparado anteriormente, se efectuaron extracciones mediante ultrasonido a temperatura ambiente y a diferentes tiempos de sonicación (2-30-60-120 min), utilizando 1.0-2.0 g de muestra con la adición de 20 mL de metanol (grado reactivo) y de una solución 1:1 de etanol-agua o metanol:agua como solventes de extracción. Seguidamente se efectuó la filtración a través de papel filtro cuantitativo 125 mmØ. El extracto fue concentrado en un rotaevaporador a presión reducida y a una temperatura de 50°C.

Con el objetivo de establecer comparaciones entre las variedades de caña de azúcar, con relación a sus niveles de flavonoides y/o fenoles en sus tejidos vegetales (raíces, tallos, yemas y hojas), se obtuvieron extractos mediante maceración de 1.0 g de muestra durante ocho días, ó extracción vía ultrasónica por dos minutos a temperatura ambiente, con 35 mL de metanol (grado reactivo). Los extractos alcohólicos fueron filtrados y concentrados en un rota evaporador a presión reducida y temperatura de 50°C.^{3,27}

En la purificación de los extractos se empleó la técnica de SPE, descrita por Colombo y otros autores³. Se utilizaron para ello cartuchos HLB Oasis™ (Waters), los cuales fueron preconditionados haciendo pasar a través de ellos en forma secuencial, 1.0 mL de Metanol y 1.0 mL de agua acidulada (0.1 % de Acido acético). Después de cargar el extracto de muestra, los cartuchos fueron lavados con 3.0 mL de metanol al 5% para eliminar los compuestos interferentes. Finalmente la fracción de flavonoides se obtuvo por elución con 3.0 mL de metanol y un ajuste a un volumen de 10.0 mL.

5.4 Cuantificación de compuestos fenólicos por espectrofotometría UV/VIS.

5.4.1 Empleo de la espectroscopía UV/VIS

Es la técnica más utilizada para la detección y cuantificación de flavonoides, aprovechando la intensa absorción que presentan estos compuestos en esa zona del espectro. Las longitudes de onda más adecuadas, de acuerdo con su absorción, son las comprendidas entre 250 y 280 nm y entre 335 y 375 nm, teniendo en cuenta que los disolventes a emplear deben ser transparentes en esas regiones, es decir, que no presenten absorción a estas longitudes de onda.

5.4.2 Determinación de fenoles totales

La concentración de fenoles totales en extractos fue medida por espectrofotométrica UV fundamentada en una reacción oxidación/reducción, siguiendo el método descrito por Kim y Lee ²⁸. El agente de oxidación usado fue el reactivo Folin & Ciocalteu (**Anexo 6**). Una alícuota (0.4 mL) de extractos diluidos apropiadamente (1:100) o soluciones estándar de ácido gálico (20, 40, 60, 80 y 100 mg/L) fue adicionado a un frasco volumétrico de 10mL conteniendo 4.0 mL de agua destilada. Para una muestra de control se preparó un blanco de reactivo usando agua destilada y desionizada. Se adicionó a cada una de las mezclas o soluciones 0.4 mL del reactivo de Folin

& Ciocalteu. Después de 5 min, 4 mL de solución de Na₂CO₃ al 7% fue adicionado con agitación. La solución fue entonces diluida inmediatamente a volumen (10 mL) con agua desionizada y mezclada directamente. Después de incubación por 90 minutos a 23°C, la absorbancia vs. el blanco preparado fue leída a 750 nm. El contenido de fenoles totales en hojas de caña de azúcar fue expresado como mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/ 100g de planta. Las muestras fueron analizadas en tres réplicas.

5.4.3 Determinación de flavonoides totales

Los flavonoides totales fueron determinados mediante un ensayo colorimétrico desarrollado por Zhishen, Mengcheng y Jianming²⁹. Una alícuota (1.0 mL) de muestras diluidas apropiadamente (1:100) o estándares de soluciones de rutina (20, 40, 60, 80 y 100 mg/L) fue adicionada a un frasco volumétrico de 10 mL conteniendo 4 mL de agua desionizada. A tiempo cero, 0.3 mL de NaNO₂ al 5% fue adicionado al frasco. Después de 5 minutos, 0.3 mL de AlCl₃ al 10% fue también adicionado. Transcurridos 6 minutos, 2 mL de NaOH 1M fue adicionado a la mezcla. Inmediatamente, el contenido del frasco fue diluido a volumen con la adición de 2.4 mL de agua desionizada y mezclado directamente. La absorbancia de la mezcla, de color rosado, fue determinada a 510 nm vs. el blanco. Los flavonoides totales fueron expresados como mg/100g equivalentes de rutina (ER). Las muestras fueron analizadas en tres replicas.

5.4.4 Determinación de antocianinas (o antocianos totales)

Con el objetivo de cuantificar o evaluar de manera exploratoria, se determinó el contenido de antocianinas en extractos de corteza de algunas variedades: MZC 84-04, MZC 74-275, CC 85-92, POJ 28-78, POJ 27-14, CC 200-3068, CC 82-27 y CC 82-26.

Se utilizó el método por diferencia de pH, descrito por Kuskoski y otros investigadores³⁰ para determinar la actividad antioxidante en pulpa de frutos. Este método permite la estimación del contenido de antocianinos totales, mediante lecturas de absorbancia en dos sistemas tampón: ácido clorhídrico/cloruro de potasio de pH 1.0 (0.025 M en HCl) y ácido acético /acetato de sodio de pH 4.5 (0.4 M). A 0.2 mL del extracto final obtenido en 5.3, se añadieron 1.8 mL de la correspondiente solución tampón y se midió la absorbancia frente a un blanco a 510 y 700 nm. Se calculó la absorbancia final a partir de:

$$A = \left(A_{\text{max, vis}} - A_{700} \right)_{\text{pH}1.0} - \left(A_{\text{max, vis}} - A_{700} \right)_{\text{pH}4.5}$$

La concentración de antocianos monoméricos en el extracto se expresó como cianidina-3-glucósido en mg/100g.

$$\text{Antocianinas totales (mg/100g)} = \frac{A \times PM \times FD \times 100}{\epsilon \times l}$$

Donde:

A = Absorbancia final.

PM = Peso molecular (449.2 g/mol).

FD = Factor de dilución (en este estudio es 10 porque se utilizó 1.0 g de planta, extraído y llevado a un volumen final de 10 mL con metanol acidificado con ácido clorhídrico 0.01%).

ϵ = Absortividad molar (26900)

5.5 Validación de la técnica de HPLC para la cuantificación de flavonoides y fenoles totales en material vegetal de variedades de caña de azúcar

Se evaluaron principalmente los parámetros de linealidad, precisión (repetitividad, reproducibilidad), exactitud y los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOC). La linealidad del método se efectuó con soluciones patrones en el rango de 2.0 ppm a 100 ppm de cada flavonoide (naringina, rutina, quercetina, luteolina y apigenina), con inyecciones de 10 μ L por triplicado.

Para evaluar la repetitividad del sistema se inyectó seis veces una solución estándar de concentración 5, 15 y 30 ppm del flavonoides, se determinó el coeficiente de variación, la desviación estándar y el promedio de los datos.

Para determinar la reproducibilidad se efectuaron seis inyecciones de un mismo patrón estándar de concentración de 5, 15, y 30 ppm del flavonoide en tres días diferentes y se calcularon los coeficientes de variación, la desviación estándar y el promedio para los datos obtenidos.

La exactitud se determinó mediante el porcentaje de recuperación de dos flavonoides (rutina y quercetina) en material vegetal de hojas de caña de azúcar. Para ello se dopó el material vegetal con tres cantidades conocidas del estándar (1.6, 2.0 y 2.4 ppm). El porcentaje de recuperación se calculó a partir de las áreas de los flavonoides presentes en la muestra antes y después de la adición de los estándares.

Para la determinación del LOD y LOC se utilizaron los datos de la curva de calibración para los cinco flavonoides disponibles y seleccionados en el estudio (**Anexo 1**).

5.6 Caracterización y cuantificación de flavonoides totales vía HPLC

5.6.1 Calibración

Se preparó una solución patrón de 400 mg/kg de cada estándar de flavonoide en metanol. Se hicieron subsiguientes diluciones de la soluciones en stock en matraces volumétricos de 10 mL para la construcción de las

curvas estándar (2.0-100 ppm). Se obtuvieron soluciones de mezcla de los cinco flavonoides: NA (naringina), RU (rutina), QUE (quercetina), LUT (luteolina) y APIG (apigenina) a partir de 0.25, 0.50, 1.0, 1.5 y 2,0 mL de las soluciones en stock.

5.6.2 Condiciones cromatográficas

La separación HPLC cualitativa y cuantitativa de cinco flavonoides (**Tabla 8**) fueron ejecutados de acuerdo con lo descrito en la sección 5.2, utilizando como fase móvil metanol-acetonitrilo-agua (35:15:50) conteniendo 1.0% de ácido acético. Esta fase móvil fue filtrada a través de una membrana de 0.45 μm y desgasificación antes de usarla.

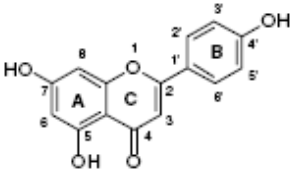
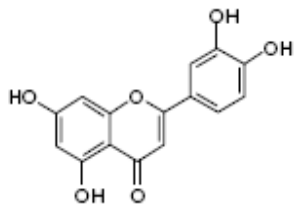
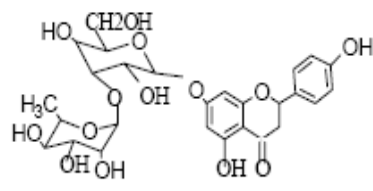
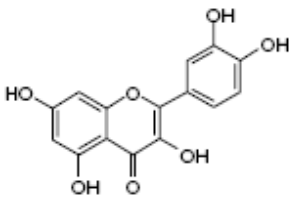
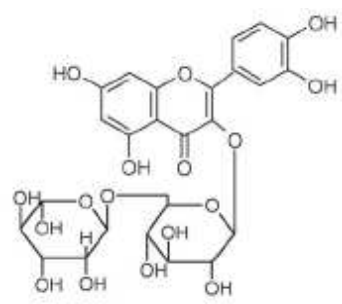
Todos los estándares y extractos se filtraron utilizando jeringas de 1 mL con filtros de teflón PTFE (0.45 μm). Las muestras fueron preparadas y analizadas por triplicado. NA, RU, QUE, LUT y APIG fueron separados por HPLC seguidos de su detección UV a 280 nm para NA y APIG y 350 nm para RU, LUT y QUE. La tasa de flujo y volumen de inyección fue de 0.5 mL/min y 10 μL , respectivamente. Los picos cromatográficos de los analitos de flavonas libres (apigenina y luteolin), flavonoles (quercetina y rutina) y flavanona (naringina) fueron confirmados por comparación de sus tiempos de retención y espectro UV con aquellos de los estándares de referencia.

Igualmente, de manera exploratoria se intentó una separación (**Anexo 2**) de los flavonoides utilizados como estándares y de algunos extractos, mediante gradiente de elución con una fase móvil constituida por metanol y acetonitrilo. Debido a su dificultad de implementación y necesidad de métodos de diagnóstico rápidos y sencillos, este sistema de separación y análisis fue descartado y no será discutido en el presente estudio.

5.6.3 Optimización y criterio de eficiencia del método cromatográfico

Desde análisis replicado 5 veces de una solución en stock como estándar control de mezcla de los flavonoides, factores de capacidad y resolución fueron calculados para especificar la eficiencia de la separación y ejecución de la columna. Donde el factor de capacidad caracteriza la retención de los compuestos estudiados y fue calculado como $k' = (RT_i - T_0) / T_0$, siendo RT_i el tiempo de retención del componente y T_0 el tiempo de retención del solvente. El factor de resolución significa la separación entre dos componentes y fue calculado por fórmula $R_s = (RT_i - RT_{i-1}) / 0.5 (W_{i-1} + W_i)$, donde W_i es el ancho de pico dado por la intersección de la tangente y línea base.

Tabla 8. Estructura y λ_{UV} máxima para confirmación de compuestos en *S. officinarum* *L.Gramineae*

Compuesto	λ_{UV} máxima (nm)	Estructura
Apigenina	334, 268	
Luteolina	348, 292, 267, 253	
Naringina	327, 282	
Quercetina	371, 306, 255	
Rutina	358, 257	

5.6.4 Proceso de cuantificación

La cuantificación fue llevada a cabo mediante integración de los picos con el Software 2010 Chromatography Manager Millennium login version 2.15 usando el método del estándar externo. Todas las operaciones cromatográficas fueron llevadas a cabo a temperatura ambiente.

5.7 Determinación del contenido de flavonoides y fenoles en diferentes tipos de azúcares

Las muestras de azúcares analizadas consistieron de:

- Dieciséis muestras de azúcar orgánica
- Seis muestras de azúcar blanca orgánica
- Catorce muestras de azúcar blanca no orgánica
- Diez muestras de azúcar crudo

El contenido total de compuestos fenólicos y flavonoides se determinó en extractos obtenidos después de maceración de 1.0 g de muestra, durante ocho días, con metanol-agua (1:1) y extracción SPE (extracción en fase sólida)³¹. Para la cuantificación de los fenoles y flavonoides se emplearon los métodos de Folin – Ciocalteu³² y Dae - Ok Kim, respectivamente³³.

6. ANALISIS DE RESULTADOS

6.1 Proceso de extracción y aislamiento de compuestos fenólicos en extractos de la caña de azúcar

Varios métodos analíticos previamente usados para determinar compuestos fenólicos especialmente flavonoides y proantocianidinas en diferentes matrices naturales, tales como hojas de orégano, laurel y olivo³⁴, hojas, bagazo y jugos de caña de azúcar³, tejidos de soya³⁵, así como en frutas cítricas y vinos³⁶, fueron la base para el estudio de las mejores condiciones extractivas de estos compuestos en tejido vegetal de caña de azúcar. La implementación de un método para los compuestos fenólicos, especialmente flavonoides, a través de extracción por maceración convencional y ultrasonido y separación por extracción en fase sólida, fue estudiada teniendo en cuenta su facilidad de adopción y ejecución en el laboratorio.

Aunque solventes alcohólicos han permitido mejor recuperación que agua pura para extraer polifenoles de tejidos vegetales en caña de azúcar³, solventes ácidos tales como metanol acidificado con HCl 0.1%, etanol al 80% acidificado con 0.5% de HCl 0.1N o metanol al 80% en HCl 6M han sido usados con frecuencia. En este trabajo, la mezcla de metanol y agua fue

ensayada. La extracción a temperatura ambiente estuvo acorde con la literatura, puesto que altas temperaturas permiten una alta recuperación o extracción de los compuestos fenólicos, pero al mismo tiempo estos compuestos pueden no ser estables por encima de 50°C.²⁶

El tipo de sorbente (cartuchos Oasis HLB) elegido para la extracción en fase sólida fue recomendado y clave para la limpieza del extracto de compuestos fenólicos³. Debido a las propiedades de la matriz, caracterizada por un alto contenido de azúcares u otros metabolitos, el agua utilizada fue suficiente (2 mL) para garantizar una remoción de estos compuestos y evitar posibles interferencias en los análisis químicos y/o determinaciones espectrofotométrica y cromatográficas.

6.2 Efecto del tiempo de sonificación en la extracción de compuestos fenólicos totales en tejidos foliares de caña de azúcar

En el estudio del efecto del tiempo de sonificación sobre la concentración de fenoles totales, por el método espectrofotométrico UV/VIS no se encontraron diferencias significativas para tiempos de 2 a 60 minutos (**Figura 3**). Sin embargo, de acuerdo con el objetivo de encontrar un método rápido que permita la extracción y cuantificación de flavonoides se escogió un tiempo de sonificación de dos minutos, sin descartar que en futuros estudios pueda

utilizarse un tiempo estimado mayor, para obtener las formas agliconas de los flavonoides, de acuerdo con la potencia y frecuencia del equipo que se disponga.



Figura 3. Efecto del tiempo de sonicación en la extracción de fenoles totales

Letras iguales no muestran diferencias significativas ($p < 0,05$)
(Expresados como equivalentes de ácido gálico en mg/100 g de planta)

Este método de extracción desde soluciones sonificadas, permite ser altamente recomendado para la extracción de metabolitos secundarios, dado que aumenta la eficiencia y disminuye el consumo de solvente en comparación con extracción por solvente y soxhlet.

6.3 Cuantificación de compuestos fenólicos totales por espectrofotometría UV-VIS

En la **Figura 4**, se indican los contenidos de compuestos fenólicos separados por SPE previa extracción mediante maceración en metanol-agua (1:1).

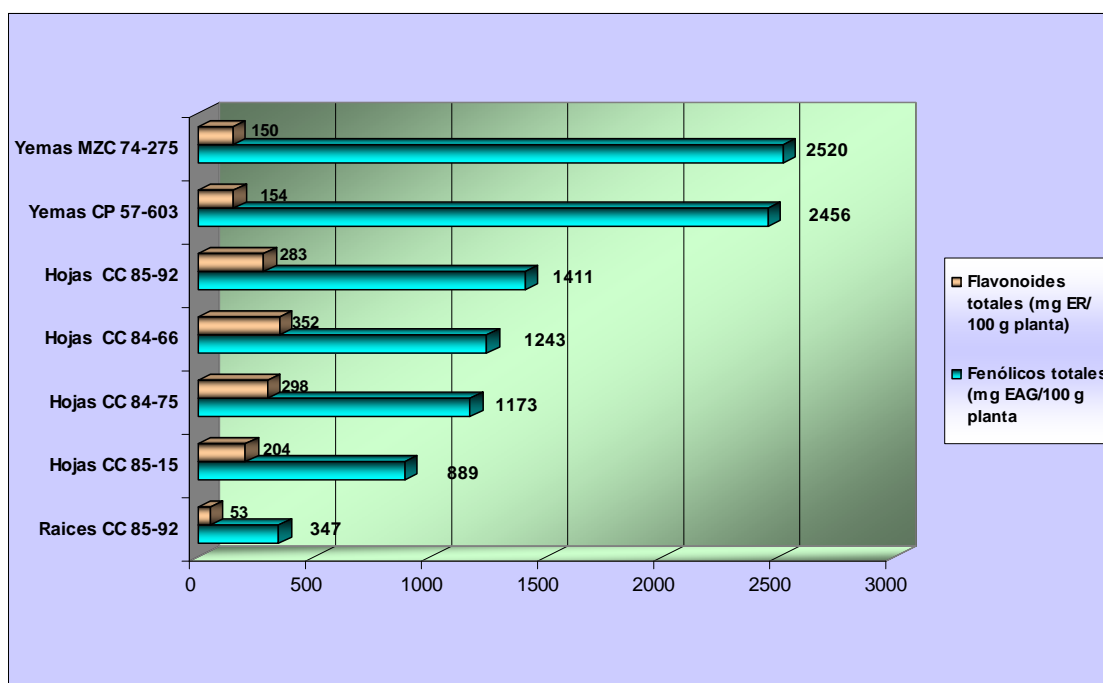


Figura 4. Contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides en algunas variedades comerciales de caña de azúcar (concentración expresada como equivalentes de ácido gálico para fenoles totales y equivalentes de rutina para flavonoides, en mg/100 g de planta).

La concentración total de compuestos polifenólicos en material vegetal de caña de azúcar varió entre 347 y 2520 mg/100 g equivalentes en ácido gálico. Todas las variedades evaluadas exhibieron diferencias en los

contenidos de fenoles y flavonoides totales. Estas diferencias pueden deberse no solo a sus características varietales, si no a factores ambientales, tales como temperatura, pH del suelo, humedad, etc., los cuales influyen en la producción de los metabolitos.^{28,34}

Basados en el contenido total de fenoles, las variedades estudiadas pueden ser clasificadas en dos grupos, uno con niveles relativamente altos de fitoquímicos fenólicos y el otro, con niveles más bajos. Los tejidos vegetales que presentaron concentraciones relativamente altas de fitoquímicos fenólicos fueron las hojas de caña encontrándose muestras con contenidos significativos de fenoles, correspondientes a las variedades CC 85-92, CC84-66, CC 84-75 y CC 85-15. 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, tales como MZC 74-275 y CP 57-603. Mientras que los tejidos vegetales con bajas concentraciones de fenoles fueron las raíces.

Las antocianinas son el mayor y principal grupo de pigmentos flavonoides que son responsables de la pigmentación roja, violeta y azul que ocurre en caña de azúcar y en otras plantas. Los resultados obtenidos para antocianinas totales en diferentes variedades se pueden observar en la **Tabla 9**. Los datos espectrofotométricos de extractos (metanol-agua 1:1) de

la corteza de tallos de las variedades CC 82-26 y CC 82-27 sugirieron que fueron las variedades de mayor concentración de antocianinas con relación a otras variedades tales como CC 85-92 y MZC 74-275

Tabla 9. Niveles de antocianinas observadas en cortezas de diferentes variedades de caña de azúcar.

Variedad	Antocianinas		
	(mg/100g)	Media	SD
MZC 84-04	0.01-0.16	0,13	0,03
MZC 74-275	0.14-0.28	0,21	0,007
CC 85-92	0.23-0.31	0,27	0,04
POJ 28-78	0.44-0.50	0,47	0,03
POJ 27-14	1.70-1.80	1,75	0,05
CC 200-3068	3.20-3.30	3,25	0,005
CC 82-27	5.00-5.50	5,25	0,25
CC 82-26	6.00-6.11	6,05	0,06

^{SD} = Desviación estándar

De los polifenoles en plantas, los flavonoides son de particular interés debido a su alta prevalencia en alimentos tales como frutas, vegetales, té, vinos, etc. Las hojas jóvenes son la fuente principal de compuestos fenólicos, porque

los sintetizan como defensa contra predadores herbívoros que las prefieren por su mayor calidad nutricional respecto a las hojas maduras. Sin embargo, eso no siempre ocurre porque no todos los metabolitos tienen el mismo comportamiento durante el desarrollo³⁷. Por Ejemplo, los flavonoles aumentan en concentración conforme avanza el desarrollo de la hoja. Probablemente las hojas maduras sean más importantes para las plantas porque proveen carbohidratos a las estructuras reproductoras y a los ápices de raíz y tallos. Los flavonoides están presentes también en partes anatómicas como corteza³⁸ y bagazo¹.

Las determinaciones por el método espectrofotométrico UV/VIS, muestran 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. **(Figura 5)**. Las diferencias encontradas en la concentración de polifenoles en la caña podrían deberse a numerosos factores, tales como variedad, clima, terreno, cosecha temprana o tardía entre otros. La cuantificación de flavonoides mediante métodos espectrofotométricos permite cuantificar flavonoides con estructuras similares y son convenientes y apropiados en determinaciones prácticas y sencillas, aunque puedan presentar limitaciones en la sensibilidad y especificidad como ha sido reportado³⁹. Las flavonas y

flavonoles, desde el punto de vista reactivo, forman complejos estables con el tricloruro de aluminio y son susceptibles de analizar mediante espectrofotometría ultravioleta – visible ²⁸.

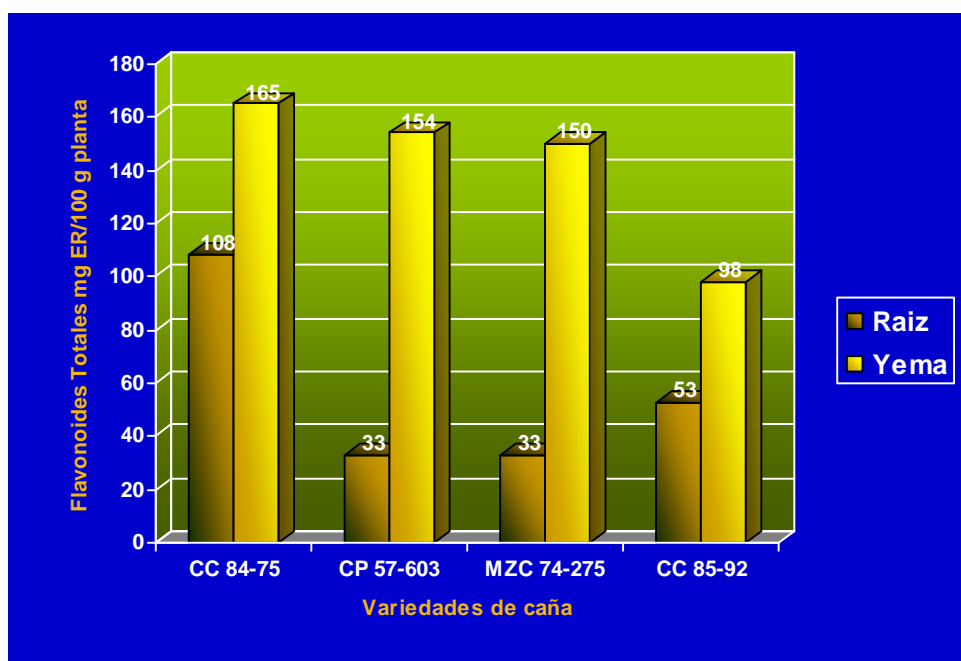


Figura 5. Contenido de Flavonoides Totales en extractos de yemas y raíces de diferentes variedades de caña de azúcar.

6.4 Cuantificación de flavonas y flavonoles en extractos vía HPLC

Antes de iniciar y/o establecer un método de separación y caracterización de flavonoides en los extractos de metanol-agua (1:1) de tejidos vegetales, tales como hojas o raíces de caña de azúcar, se efectuó una exploración vía HPTLC (capa fina de fase reversa, de silica gel 60 F₂₅₄). Los valores de R_f

para los principales flavonoides disponibles como estándares y presentes en los extractos, se pueden observar en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Valores de R_f obtenidos vía cromatografía en capa fina (HPTLC) para los principales flavonoides, presentes en hojas de caña de azúcar (Variedad CC 85-92)

Flavonoide	R_f
Rutina	0.28
Luteolina	0.84
Quercetina	0.89
Naringina	0.41
Apigenina	0.88
Catequina	0.87

Fase estacionaria HPTLC – Silica gel 60 F254

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua-ácido fórmico (50:2:3:6)

El espectro típico de flavonoides consistió en dos bandas de absorción máxima a 240-285 nm (banda II) y 300-550 nm (banda I). La posición exacta y la intensidad relativa de estos máximos nos permitieron conocer la naturaleza y patrón de oxigenación del flavonoide. En la **Figura 6** se muestran los espectros UV típicos de los patrones de flavonoides utilizados, en el presente estudio, como referencia para la cuantificación experimental.

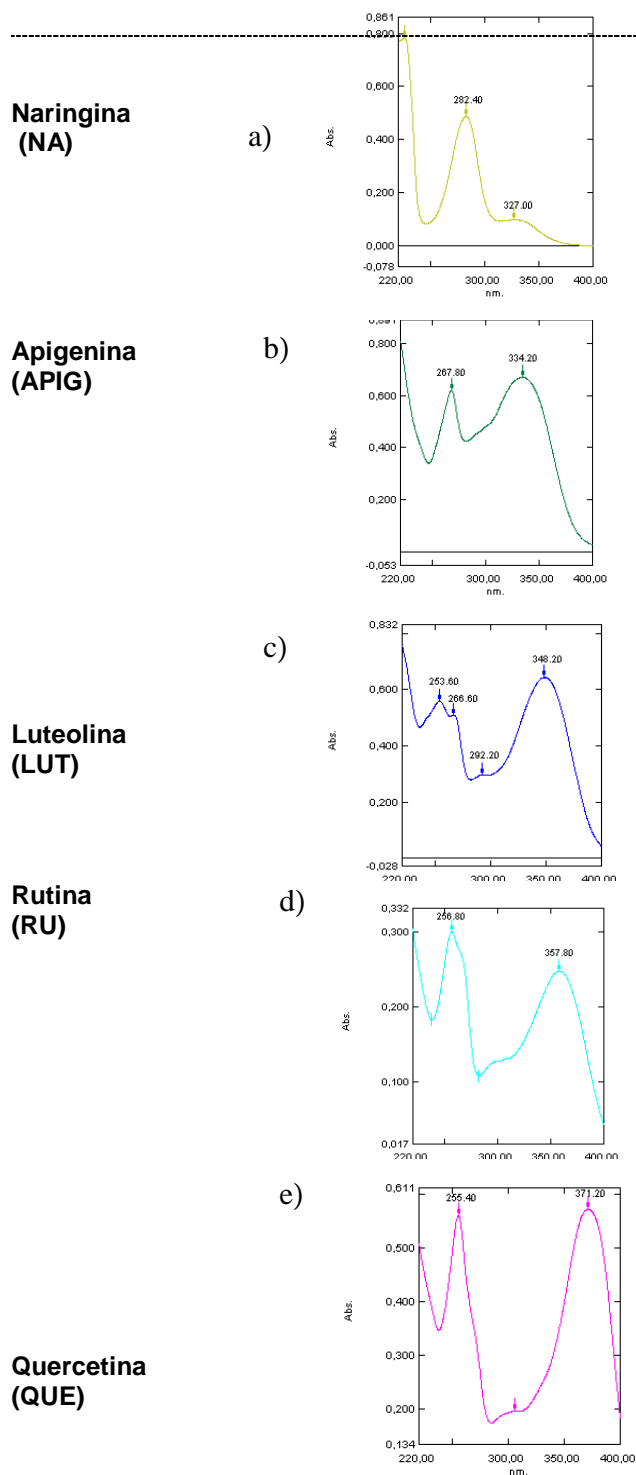


Figura 6. Espectrogramas de absorción UV-VIS de una mezcla de NA, RU, QUE, LU, APIG. (a) para NA: naringina; (b) APIG: apigenina.; (c) LUT: luteolina; (d); RU: Rutina (e) QUE: Quercetina

En las Figuras 7-9 y Anexo 4, se muestran los cromatogramas típicos estándares y de extractos de muestras de material vegetal determinados a 280nm y 350 nm. Como pueden observarse, mediante el sistema de elución isocrática utilizado, se encontraron señales o bandas antes de los diez minutos de retención debido posiblemente a las diferentes formas estructurales de glicósidos de los diferentes flavonoides y/o compuestos fenólicos presentes en la compleja matriz del tejido vegetal (raíces y hojas). El patrón cromatográfico observado fue en general muy similar al reportado por otros autores del área azucarera ^{3,13}.

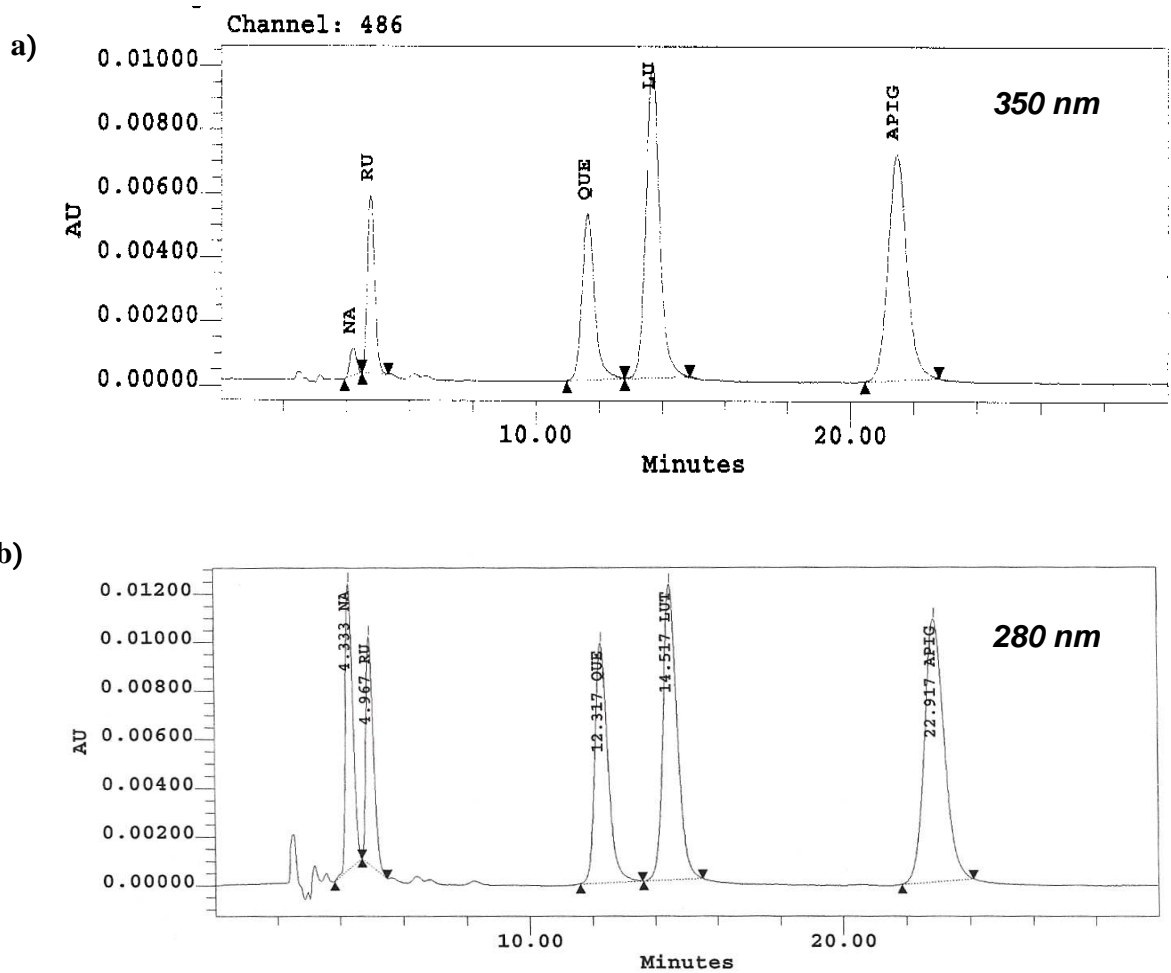


Figura 7. a) Cromatograma HPLC-UV de mezcla de estándares de NA, RU, QUE, LU y APIG. Elución isocrática (fase móvil: metanol-acetonitrilo-agua (35:15:50) conteniendo 1.0% de ácido acético) Detección UV a 350 nm.

b) Cromatograma HPLC-UV de estándares de NA, RU, QUE, LU y APIG. Elución isocrática (fase móvil: metanol-acetonitrilo-agua (35:15:50) conteniendo 1.0% de ácido acético) Detección UV a 280 nm.

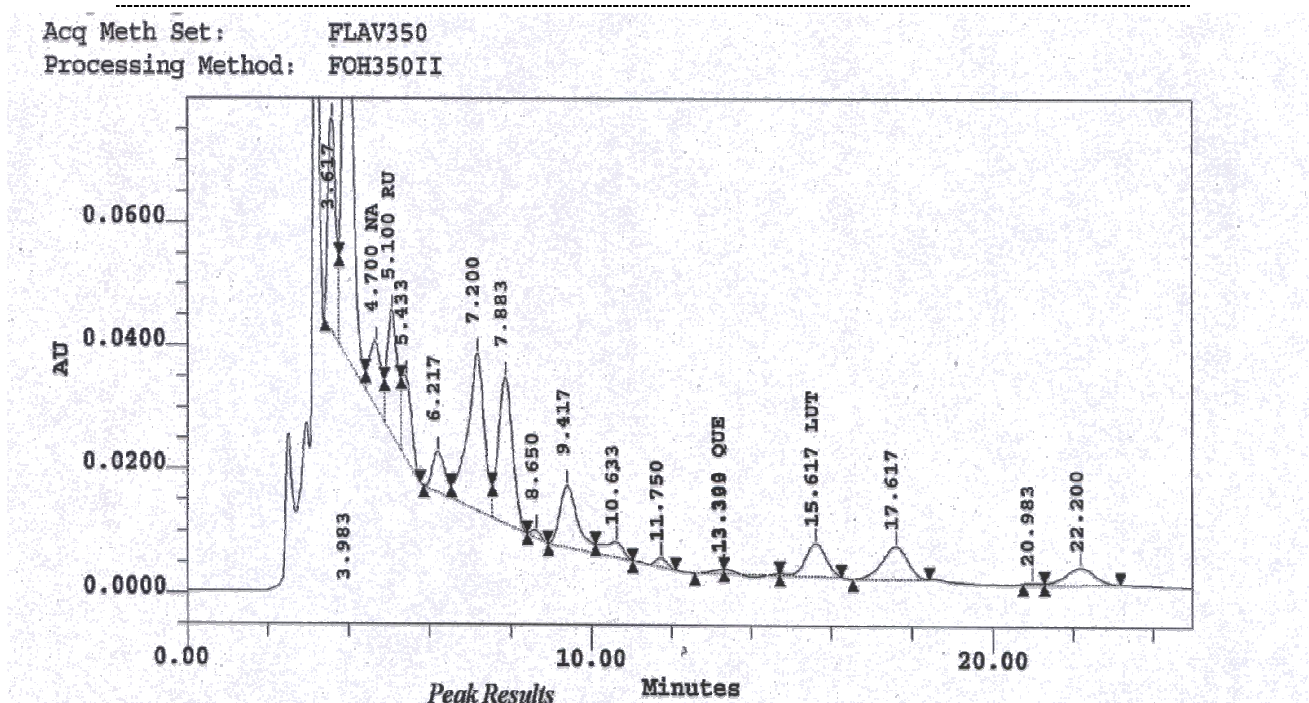


Figura 8. Cromatograma HPLC-UV de extracto de hojas CC 84-75. Detección UV a 350nm

Señales principales

Nombre	Tiempo de retención (min)	Area (UV *sec)	Altura (V)	Cantidad
NA	4,700	214750	10529	63,104
RU	5,100	359075	20214	16,776
QUE	13,300	13385	669	0,451
LUT	15,617	185894	5215	3,112
APIG	20,983	9005	317	

Acq Meth Set: FLAV280
 Processing Method: F0H280

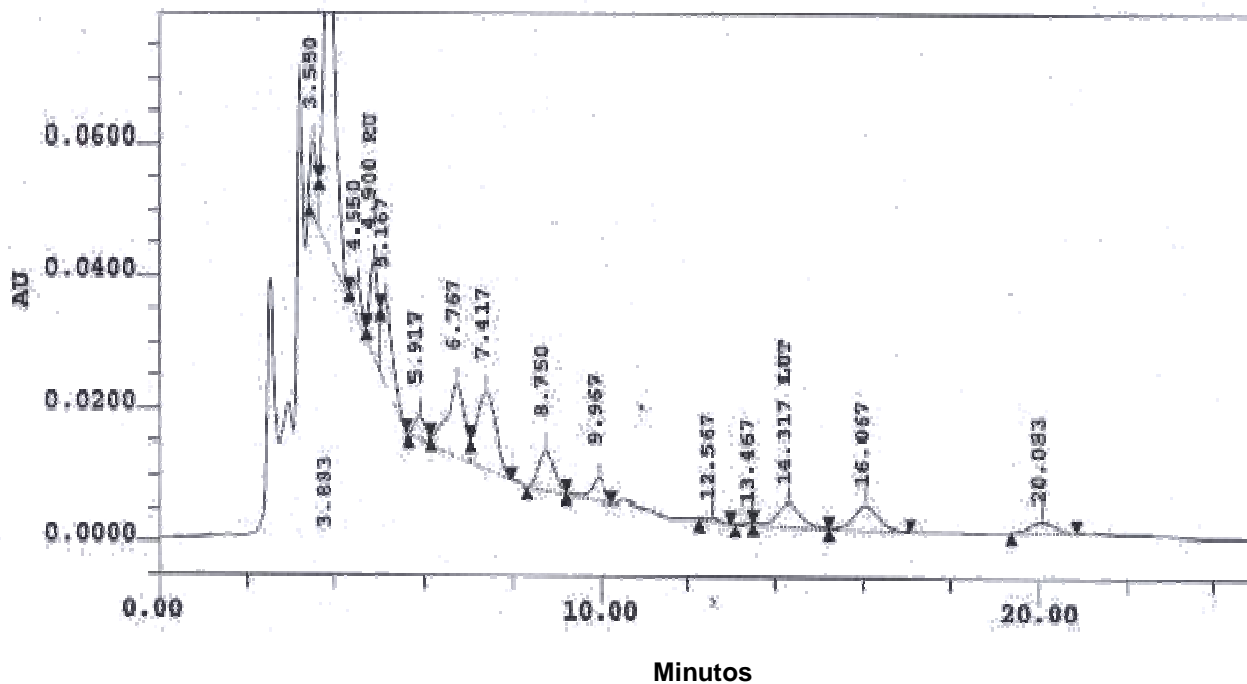


Figura 9. Cromatograma HPLC-UV de extracto de hojas CC 84-75. Detección UV a 280nm

Señales principales

Nombre	Tiempo de retención (min)	Area (UV *sec)	Altura (UV)	Cantidad
NA	4,317	78546	5512	12,676
RU	4,900	186217	14366	16,776
QUE	11,883	9277	437	0,451
LUT	14,317	130538	3488	3,112

El contenido de flavonoides totales fue calculado como la suma de los compuestos flavonas y flavonoles individuales, estimado por el método espectrofotométrico. Debido a la complejidad de las señales o bandas de los extractos evaluados, la mayoría de los compuestos no fueron identificados por HPLC y por tanto no fueron cuantificados, por lo cual los valores determinados fueron bajos en comparación al método UV. Sin embargo, el método colorimétrico de absorción o espectrofotométrico UV podría sobreestimar el contenido de flavonoides totales y fenoles debido a interferencia de otras sustancias presentes en los extractos ⁴⁰.

La **Tabla 11** muestra que el contenido de flavonoides determinados en extractos metanólicos de hojas, por HPLC, difiere con la variedad, donde se encontró un rango de flavonoides totales entre 0.080 y 1.40 mg/g (**Anexo 4**). Estos resultados estuvieron de acuerdo con los datos reportados por Colombo y otros investigadores del Brasil³; quienes reportaron contenidos de 1.70 y 0.38 mg de flavonoides/g de material vegetal (hojas y bagazo, respectivamente) en muestras obtenidas en una plantación de Araraquara, S. P, Brasil donde se evaluaron tanto plantas de control como plantas transgénicas modificadas con dos genes inhibidores de proteinasa (“Bowman-Birk” y “Kunitz”). De igual manera, estos resultados fueron comparables con los de otras fuentes vegetales reportadas en la literatura, tales como manzanas, con niveles de 0.98-1.43 mg flavonoide/g de material

fresco³⁵, cebollas con 0.71-0.80 mg flavonoides/g de material fresco⁴¹, tomates con 0.005-0.03mg flavonoide/ g de material fresco⁴² y miel de abejas con contenidos de 0.03 mg flavonoide/g de material fresco^{43,44}.

Tabla 11. Contenido de Flavonoides Totales en extracto metanólico de hojas de caña de azúcar obtenido por sonicación a 2 minutos. (Método Cromatográfico de alta resolución).

Variedades de Caña (Hojas)	Flavonoides Totales mg /g planta . Purificación con metanol: agua: ácido acético
CC 85-92	1.40
CC 93-4418	0.33
CC 84-56	0.29
CC 93-3895	0.38
CC 92-2358	0.08
CC 92-2393	0.13
CC 93-4223	0.08

Las concentraciones de rutina, naringina, quercetina, luteolina, y apigenina fueron en general mayores en las hojas, pero las concentraciones de los tres últimos flavonoides se encontraron en niveles muy inferiores a los de rutina. **(Anexo 4).**

En raíces se encontró también naringina, rutina y quercetina, pero a niveles inferiores a los encontrados en hojas siendo este tejido vegetal, al igual que las yemas, muy viables para la extracción de estos compuestos antioxidantes, principalmente de rutina (**Anexo 4**).

Por otra parte se encontró en el presente estudio, que los mayores contenidos de flavonoides totales en las hojas de caña de azúcar, fueron observados en las variedades CC 85-92, CC 93-4418 y CC 84-56 (**Figura 10**).

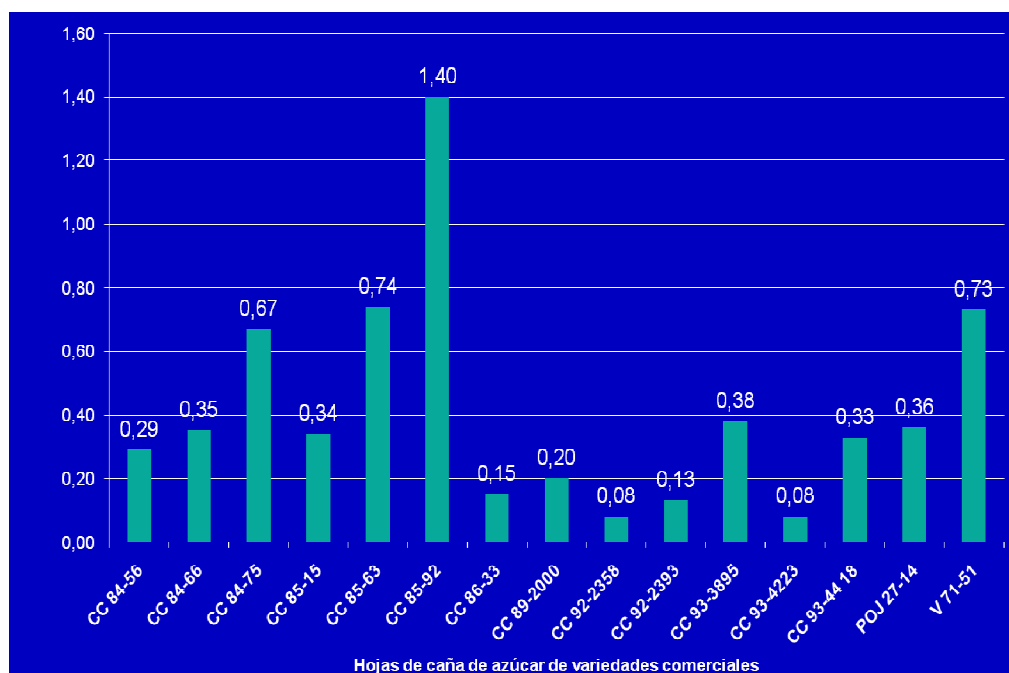


Figura 10. Cuantificación total de flavonoides en hojas de caña de azúcar determinados vía HPLC.

6.5 Validación del método cromatográfico HPLC para cuantificación de flavonoides totales

El cumplimiento de todos los criterios estadísticos de aceptación establecidos, indica que el método es lineal, exacto y preciso en el intervalo de concentraciones de 2.5–100 mg/kg para los flavonoides naringina y rutina; y de 2.0–100 mg/kg para los flavonoides quercetina, apigenina y luteolina. El factor de respuesta (f_r) en las curvas de calibración (**Figuras 11-15, Anexo 1**), para cada flavonoide, presentó un coeficiente de variación (CV) o desviación estándar relativa (RSD) inferior al 5.0%, el cual fue aceptable; igualmente se cumplió con los criterios de proporcionalidad del intercepto y de la pendiente, lo que permitió establecer el rango lineal óptimo evaluado en la implementación del método cromatográfico para los flavonoides estudiados(**Anexo 1**).

Los resultados del análisis de varianza por flavonoide y concentración demostró que no existen diferencias significativas al nivel del 95% entre cada concentración de 5, 15 y 30 mg/g de flavonoide evaluado. La reproducibilidad y repetibilidad interdía e intradía del sistema con respecto a los promedios de áreas fue igualmente validada con un criterio de aceptación de $RSD \leq 3.0$ y

no se reportan diferencias significativas en el análisis de varianza entre cada concentración estudiada del flavonoide (**Anexo 1 y 3**).

Por otra parte, en cuanto a la exactitud del método en la cuantificación de flavonoides en los extractos de hojas de caña de azúcar se encontraron porcentajes de recuperación que oscilaron entre 87.25 – 99.38 %, los cuales de acuerdo con la literatura³, fueron aceptables para una matriz compleja como la presente en tejidos vegetales de caña de azúcar⁴⁵ (**Anexo 1**).

6.6 Optimización y criterio de eficiencia del método cromatográfico

De los datos interdió para la elución cromatográfica de los 5 flavonoides con detección UV a 280 nm, un valor promedio de factor de resolución y factor de capacidad fue calculado con sus desviaciones estándar relativa. El factor de resolución es considerado a ser mas alto que 1 o igual a 1 y debe no ser más alto que 10 (un factor de resolución de 1 significa dos picos separados por alrededor del 98%)⁴⁵.

Los factores de capacidad para caracterizar la retención de los flavonoides detectados estuvieron dentro del criterio de eficiencia de la columna: 2 a 10 (**Tabla 12**), indicando un método de elución cromatográfica rápida.

En general el perfil de separación en la resolución de los flavonoides fue óptimo, encontrando solo baja resolución para naringina-rutina (**Tabla 13**), lo que indica parcial separación de compuestos altamente polares en la elución isocrática.

Tabla 12. Valores de factor de retención (K') del estudio de eficiencia del método cromatográfico.

Flavonoide	Tiempo de retención (min), siendo $t_0 = 2.15$ min	Factor de retención K'	RSD (%)
Naringina	4.250	1.0	8.55
Rutina	4.833	1.2	7.09
Quercetina	11.700	4.4	6.62
Luteolina	13.767	5.3	6.50
Apigenina	21.533	8.9	5.85

Tabla 13. Valores de factor de resolución (R_s) del estudio de eficiencia del método Cromatográfico.

Separación entre dos flavonoides	Factor de resolución R_s	RSD (%)
Naringina-rutina	0.78	6.61
Rutina-quercetina	1.71	0.71
Quercetina-luteolina	2.07	3.60
Luteolina-apigenina	6.67	2.27

6.7 Flavonoides y fenoles en diferentes tipos azúcares

Los contenidos de fenoles totales de todos los azúcares analizados se encontraron en el rango de 4.5 a 300 mg/kg. Por otra parte, los niveles de flavonoides oscilaron entre 3.5 y 100 mg/kg. Los azúcares orgánicos y crudos exhibieron en promedio los contenidos más altos tanto de fenoles como de flavonoides (**Tabla 14**), presentando diferencias estadísticas significativas con relación al azúcar blanca, procedente del procesamiento azucarero comercial de cultivos de caña no orgánica. La concentración de flavonoides, reconocidos por su acción anti – oxidante^{46,47,48}, osciló en promedio entre 58.0 y 78.0 m/kg en los azúcares orgánicos y crudos (**Tablas 14 y 15**). Estos niveles de flavonoides fueron comparables a los reportados para las mieles chilenas (14-138 mg/kg), las cuales mostraron una marcada actividad anti-oxidante (análisis ORAC) de acuerdo con los protocolos descritos por Orlando Muñoz y otros investigadores^{24, 48,49}.

Las diferencias observadas en los contenidos de flavonoides y fenoles entre los diferentes tipos de azúcares podrían estar relacionadas, principalmente con el proceso azucarero. Se ha reportado que los compuestos fenólicos, tales como los flavonoides, son compuestos específicos de los jugos de caña de azúcar y que su remoción y/o degradación (**Figura 11**) durante la etapa de clarificación lleva a la producción de azúcares de diferentes tipos con

relación al color. Los compuestos fenólicos están fuertemente ligados al color de los azúcares y es así como el alto contenido de fenoles en los azúcares morenos, se debe al licor madre el cual está relacionado con el color del azúcar final. Carta trimestral Cenicaña ^{31,50,51}

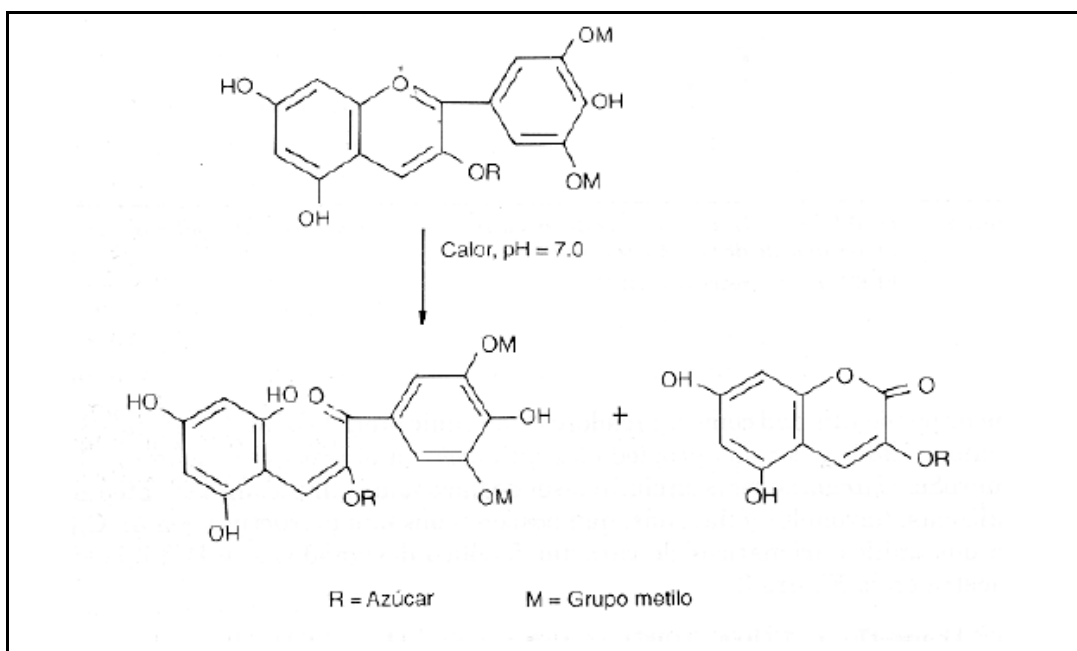


Figura 11. Descomposición térmica de las antocianinas presentes en la caña de azúcar.

FUENTE: *Smith y Paton, 1985*

Tabla 14. Contenido promedio de fenoles, flavonoides y potasio total en azúcares crudos, orgánicos y no orgánicos (Ingenio Providencia).

Tipo de muestra	No. Muestras	Fenoles (mg/kg)	Flavonoides (mg/kg)
Azúcar crudo	10	185 a	78 a
Azúcar orgánica	16	88 bc	63 a
Azúcar blanca orgánica	6	122 ab	58 a
Azúcar blanca no orgánica	14	28.2 c	32.5 b

¹ Letras iguales indica que no existen diferencias significativas con un nivel de significancia del 5%. (Prueba de Tukey)

Tabla 15. Valores observados en los contenidos de fenoles, flavonoides y potasio en azúcares crudos, orgánicos y no orgánicos (Ingenio Providencia)

Tipo de muestra	Fenoles (mg/kg)		Flavonoides (mg/kg)	
	Valor Mínimo	Valor Máximo	Valor Mínimo	Valor Máximo
Azúcar crudo	125	235	37	100
Azúcar orgánica	16.4	299	27	98
Azúcar blanca orgánica	9.0	296	29	89
Azúcar blanca no orgánica	4.5	91	3.5	72

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Las hojas y/o material vegetal de la caña de azúcar puede ser una fuente importante de compuestos de valor agregado, tales como los flavonoides, lo cual puede representar un mejor aprovechamiento de la biomasa vegetal, especialmente los residuos de post-cosecha, de un cultivo comercial como la caña de azúcar.
2. La cuantificación de los compuestos fenólicos o flavonoides en tejidos vegetales como las yemas pueden constituirse en buenos marcadores químicos para predecir los grados de susceptibilidad o resistencia al ataque de patógenos, tales como el hongo *Ustilago scitaminea* H. y *P. Sydow* causante del carbón como enfermedad de importancia comercial en la caña de azúcar.
3. Las técnicas de ultrasonido y SPE pueden utilizarse como método sencillo y rápido para un diagnóstico del contenido total de fenoles y/o flavonoides en tejido vegetal de caña de azúcar.
4. El método espectrofotométrico para la determinación cuantitativa de flavonoides, aunque presente limitaciones en su especificidad para un tipo de flavonoide, permite estimar los contenidos totales de flavonoides

en tejidos o extractos vegetales de caña de azúcar de una forma conveniente y apropiada en las determinaciones rutinarias en el laboratorio. Por consiguiente, la adopción del método espectrofotométrico como método rápido es recomendable y deseable en estudios futuros en el sector agroindustrial de la caña de azúcar.

5. El método de análisis por HPLC, con una composición de una fase móvil sencilla y económica (Solvente: Metanol-acetonitrilo-agua (35:15:50) conteniendo 1.0% de ácido acético, en una combinación de elución isocrática), permitió obtener una resolución razonable de los flavonoides en estudio; esto, en asocio con un corto tiempo de análisis (25 minutos) y a una alta reproducibilidad. Este hecho hace que el método sea aceptable para el diagnóstico y análisis de extractos vegetales, tan complejos y difíciles de resolver, y así mismo sea clave para el estudio exploratorio de variedades de la especie de *Saccharum* y de sus híbridos.

6. El método cromatográfico utilizado en el presente estudio, permitió no solo cuantificar, sino cualificar la composición de los extractos vegetales con relación a los contenidos de flavonoides de importancia biológica o de valor agregado en caña de azúcar, tales como naringina, rutina, quercetina, apigenina y luteolina.

-
7. Basados en los resultados de la validación del método cromatográfico para los flavonoides rutina y quercetina, teniendo en cuenta su mejor resolución, se puede concluir que los niveles de recuperación fueron del mismo orden (92.14-93.22 %) de los reportados por investigadores del Brasil ³.
 8. La separación cromatográfica vía isocrática con detección UV se estudió para dos longitudes de onda (280 y 350 nm), pero sería deseable en futuros estudios se efectuara y/o ensayara un análisis cuantitativo mediante gradiente de elución, con el objeto de obtener mejores resultados para tiempos de retención inferiores a los diez minutos.
 9. Los mayores contenidos de flavonoides totales en hojas de caña de azúcar, fueron observados en las variedades CC 85-92, CC 93-4418 y CC 84-56.
 10. En las yemas de caña el contenido de fenoles resultó estar alrededor de 1.5 y 2.0 veces más alto que el presente en las hojas de caña, como se pudo observar en las variedades MZC 74-275 y CP 57-603.
 11. El contenido total de flavonoides en las variedades evaluadas fue de 0.33 y 4.49 mg/g equivalentes en rutina (ER).

-
12. Los niveles y diferencias encontrados en los contenidos de fenoles de las raíces, es de gran valor en la búsqueda de asociaciones entre la microflora del suelo y la asimilación de nutrientes en diferentes variedades de caña de azúcar.
13. La concentración total de compuestos polifenólicos en el material vegetal evaluado (principalmente hojas) de caña de azúcar varió entre 3.5 y 25.20 mg/g equivalentes en ácido gálico (EAG). Este rango observado, el cual incluye compuestos de interés como los flavonoides, puede reflejar las diferencias que exhiben las variedades de caña de azúcar, con relación a la presencia de otros metabolitos diferentes a los azúcares.
14. Tanto el método espectrofotométrico, previamente validado, como el método cromatográfico desarrollado hasta la fecha pueden constituirse en valiosos métodos primarios para futuras calibraciones y validaciones en espectrofotometría de infrarrojo cercano (NIR), como un método secundario rápido y de actual disponibilidad en el sector azucarero colombiano.
15. Los contenidos de fenoles y flavonoides en los azúcares orgánicos superan a los observados en el azúcar blanco comercial. En particular, los flavonoides como potenciales agentes anti – oxidantes se encontraron
-

en el rango de 27 y 100 mg / kg en los azúcares orgánicos, los cuales son comparables al de otras fuentes nutricionales como las mieles chilenas.

16. Los análisis de fenoles y flavonoides mostraron diferencias significativas entre los azúcares analizados y por tanto estos componentes podrían ser utilizados como marcadores del tipo de azúcar.

17. Los niveles apreciables de fenoles y especialmente de flavonoides en los azúcares orgánicos pueden otorgarles un valor agregado, desde el punto de vista nutricional, y por consiguiente evaluaciones que determinen la capacidad anti-oxidante de estos constituyentes de los azúcares son altamente recomendables en el corto o mediano plazo.

18. Los contenidos de fenoles y flavonoides en los azúcares orgánicos y crudos superan a los observados en el azúcar blanco comercial. En particular, los flavonoides como potenciales agentes anti – oxidantes se encontraron en el rango de 27 y 100 mg / kg en los azúcares orgánicos, los cuales son comparables al de otras fuentes nutricionales como las mieles chilenas.

19. Los análisis de fenoles y flavonoides mostraron diferencias significativas entre los azúcares analizados y por tanto estos componentes podrían ser utilizados como marcadores del tipo de azúcar.

20. Los niveles apreciables de fenoles y especialmente de flavonoides en los azúcares orgánicos y crudos pueden otorgarles un valor agregado, desde el punto de vista nutricional, y por consiguiente evaluaciones que determinen la capacidad anti-oxidante de estos constituyentes de los azúcares son altamente recomendables en el corto o mediano plazo.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Paton, N.; Smith, P.** *Sugar Technology Reviews*. **1985**, (12) 117-142.
2. **Harborne, J. B.** *Phytochemical methods*, 3ed. Chapman and Hall, London - **1998**, pp 40-96.
3. **Colombo R. Lancas, F.; Yariwake, J. H.** *J. Chromatogr. A*. **2006**, (1103) 118–124
4. **Amado, F. M. L.; Santana – Marques, G.; Ferrer – Correia, A. J.; Tonwe, K. B.** *Anal. Chem.* **1997**, 69 (b), pp 1102-1106.
5. **Wolfender J. L.; Ndjoko, K.; Hostettmann, K.** *Methods in polyphenol analysis*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2003**.
6. **Marcano, D.; Hasegawa, M.**, *Fitoquímica Orgánica*, 2ed. Universidad Central de Venezuela, Caracas. **2002**, pp 117 – 191.
7. **Smith, P., Hall, P.** Proc. 14th Congr. ISSCT. **1971**, 1139-1146.
8. **Tu, C.C.; Onna, K.** Proc. 10th Congr. ISSCT. **1959**, 291-304.
9. **Timberlake, C. F.** *Food Chem.* **1980**, 5(1), pp 69– 80.
10. **Andersen, O. Markham. K. R.** *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*, 1ed, CRC Press: Boca Raton, Fl. **2006**, pp 1 – 736.
11. **Farber L.; Carpenter, F. G.** Tech. Sess. Cane Sugar Refining Res. **1975**, 23-31.
12. **Colombo, R.; Yariwake, H.J.; Queiroz, E.** *J. Chromatogr A*. **2005**, (1082) 51–59.
13. **Colombo, R.; Yariwake, H.J.; McCullagh, M.** *J. of the Brazilian Chem. Society*. **2008**, 19(3) 483–490.
14. **PROCAÑA.** Informe de gestión 2006. Cali – Colombia. **2007**, 32 p.
15. **Briceño, C. O.; Larrahondo, J. E.** Carta Trimestral, Año 2006, No. 4. Cali, Colombia. **2004**.

-
16. **Geplacea /PNUD**. Subproductos y derivados de la caña de azúcar, colección GEPLACEA, Serie Diversificación, México. **1988**, 172 p.
17. **ASOCAÑA**. Informe Anual 2003-2004, Cali – Colombia. **2004**, 57 p.
18. **Larrahondo, J. E.** Carta trimestral Cenicaña – Colombia. V. 27 No. 2. **2005**, pp 19-23.
19. **Ebadi, M.** Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine, 1 ed, CRC Press: Boca Raton, Fl. **2002**, pp 393-403.
20. **Patrana – Bonilla, E.; Akoh, C. C.; J.** Agric. Food Chem. **2003**, 51 (18), pp 5497 – 5503.
21. **Wilson, I. D.** J. Chromatogr. A. **2000**, 892, 315.
22. **Lemberkovics, E.; Petri, H. et al.** Acta Hort. **1996**, (426) 641-655
23. **Paton, N.; Smith, P.** *Journal. Int. Sugar.* **1983**, (85) 1012
24. **Muñoz O.; Copaja, S.; Speisky, H.; Peña, R. C.; Montenegro, G.** www.scielo.br/scielo.php, 02/09/2008.
25. **CENICAÑA**, Informe Anual 2003. Cali, Cenicaña. **2004**, 106 p.
26. **Giannuzzo, A.; Nazareno, M.; Mishima, B.** *Cien. Tecnol. Aliment.* **2000**, 20(2).
27. **Tsao, R.; Zeyuan, D.** *J. Chromatogr. B.* **2004**, 812, 85-99.
28. **Kim, D. Weon; S. Lee Chang.** *Food Chemistry* **2003**,. (81) 321-326
29. **Zhishen, J.; Mengcheng, T.; Jianming, W.** *Food Chemistry.* **1999**, (64) 555-559
Boue Stephen, Carter, C. *J. Chromatogr, A..* **2003**, (991) 61-68
30. **Kuskoski, E. M.; Azuero, A. G.; Troncoso, A. M.; Manzini – Filho, J y Fett, R.** Ciencia y tecnología de alimentos campinas. **2005**, 25 (4): 776 – 732.
-

-
31. **Milala, J.; Wojtczak, M.** SPRI Conference on Sugar Proceedings, New Orleans, U.S.A. **2006** **Curtin, J. H., and Paton, N. H.** *ISSCT. Proc.* **1980**, (3) 2361-2371.
32. **Folin, C. Ciocalteu, V. J.** *Biol. Chem.* **1927**, (73), 627-650
33. **Dae-OK Kim; Jeong, S. W.; Lee, Ch. Y.** *Food Chemistry.* **2003**, (81) 321-326.
34. **Skerget, M. ; Kotnik, P..** *Food Chemistry.* **2005**, (89), 191-198
35. **Eberhardt , M.V.; Lee, C.Y., Liu, R.H.** *Nature.* **2007**, (405) 903
36. **Dopico, G.; Valentao, L.; Seabra, A.** *Analytica Chimica Acta.* **2007**, (583) 15-22
37. **Vargas – Alvarez, , D.; Soto - Hernandez, M.; González – Hernández, V. A.** *Agrociencia.* (40). **2006**, 109-115
38. **Ross, H. I.** *Press. Totowa. NJ.* **1999**, 263-281
39. **Salamanca, G. ; Correa, I. L.; Principal, J.** *Zootecnia Trop.* **2007**, 25 (2): 95 - 102.
40. **Shieber, A. Keller, P. et al..** *Journal of Chromatogr. A.* **2001**, (910) 265-273
41. **Rhodes , M.J.C.; K.R. Price,** *Food Chem.* **1996**, (57) 113.
42. **Willcox, J.K. ; G.L. Catignani, S. Lazarus,** *Crit. Rev. Food Sci.* **2003**, (43) 25-30.
43. **Yao, L.; Datta, N.; Tomas-Barberan, F.A.; Ferreres, F.; Martos, I.; Singanusong, R.** *Food Chem.* **2003**, (81) 159
44. **Gerritsen, M.E.; Carley, W.W.; Ranges, G.E.** *Am. J. Pathol.* **1995**, (147):278-292.
45. **Belajova, E.; Suhaj, M.** *Food Chem.* **2004**, (86) 339-343
46. **Markham, K.; Ryan, G.** *Phytochem.* **2000**, (54) 681-687
-

-
47. **Pompermayer, P.; Lopez, A. R.; Falco, M. C.; Silva, M. C. F.** Entomol. Exp. Appl. **2001**, (99) 79.
48. www.iupac.org/publications/medicinal-chemistry.
49. **Kinsella, J.E.; Frankel, E.; German, B. and Kanner, J.** *Food Technology*. **1993**, p 85-89.
50. **Wiseman H, Halliwell B.** *Biochem. J.* **1996**, (313)17-19.
51. **Larrahondo, J. E.; Godshall, M. A.; Clarke, M. A.** En: Sugar Processing Research Conference – SPRI. New Orleans, Louisiana. **1996**,137–145.
52. **Larrahondo, J. E.** Informe técnico, CENICAÑA. **1995**, p 337-354
53. **Miller, J.C.; Miller, J.N.** Estadística para Química analítica. 2ª edición. Addison Wesley Iberoamericana. Wilmington, Delaware, E. U. A. 1993

ANEXO 1

VALIDACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO HPLC PARA CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES

Linealidad

En las curvas de calibración (**Figuras 12-16**) se indica el rango lineal, es decir, el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima de analito para el cual el método ha sido probado.

Los coeficientes de correlación (r) y de determinación (r^2) fueron superiores a 0.999 y se cumplió el test de linealidad para la pendiente y el intercepto por el criterio de t calculado (**Tabla 16**):

- Al aplicar la prueba de linealidad se obtuvo que el t calculado es mayor que el t tabla para la pendiente, lo que indica que la pendiente es distinta de cero (t calculado 122.27 > t tabla 2,45, $\alpha = 0,05$ $gl = 5$).
- En el criterio de proporcionalidad el t calculado es menor que el t tabla, lo que indica que el intercepto es estadísticamente similar a cero (t calculado 0,097 < t tabla 2,45, $\alpha = 0,05$ $gl = 5$).

Tabla 16. Resumen de los parámetros estadísticos del criterio de linealidad para las curvas de calibración de flavonoides

FLAV	r	r ²	Ecuación de la Recta	RSD% f	Rango	Intervalo a	Test a	Intervalo b	Test b	RSD% b
NA	0.9999	0.9996	y = 17120.53x + 356.53	2.43	0.2--100	-5223.47 5936.53	0.081<2.26	16996.13 17244.93	174.31>2.26	0.36
NA	0.9998	0.9997	y = 17181.43x -179.79	2.70	0.2--20	-1488.67 1129.09	-0.16<2.57	17031.37 17331.50	132.97>2.57	0.42
NA	0.9998	0.9995	y = 17118.46x +500.87	2.56	1.0--100	-7049.54 8051.28	0.083<2.36	16966.20 17270.72	141.22>2.36	0.43
NA	0.9997	0.9995	y = 17113.29x + 865.08	2.09	2.5--100	-8304.97 10035.13	0.097<2.45	16938.95 17287.64	122.27>2.45	0.49
RU	0.9998	0.9997	y=21413.19 x -1652.62	16.42	0.2--100	-7871.48 4566.23	-0.38<2.26	21274.55 21551.83	222.24>2.26	0.32
RU	0.9996	0.9993	y = 21044.98x-1907.05	6.18	0.5--20	-4681.34 867.24	-0.78<2.78	20750.49 21339.47	81.04>2.78	0.66
RU	0.9998	0.9996	y = 21415.57x-1819.67	6.20	1.0--100	-10233.87 6594.54	-0.31<2.36	21245.90 21585.25	180.13>2.36	0.38
RU	0.9998	0.9996	y = 21409.89x-1419.05	4.07	2.5--100	-11638.50 8800.40	-0.20<2.45	21215.59 21604.19	156.36>2.45	0.44
QUE	0.9995	0.9990	y = 40489.99x -43039.03	2.87	5.0--100	-94898.54 8820.47	-1.10<3.18	39433.61 41546.37	41.18>3.18	1.13
QUE	0.9995	0.9991	y = 40458.08x -32825.65	3.22	2.0--100	-72058.84 9504.64	-1.00<2.78	39419.42 41239.15	48.38>2.78	1.01
APIG	0.9997	0.9995	y = 67106.34x + 1448.33	2.22	20--200	-49372.16 132268.82	0.49<2.78	66258.79 67953.90	88.24>2.78	0.59
APIG	0.9997	0.9994	y = 68421.70x +66564.52	4.89	2--100	-14237.48 118891.55	1.37<3.18	67404.41 69439.00	72.63>3.18	0.69
LUT	0.9997	0.9994	y = 68449.07x -56265.17	2.21	20--200	-151632.23 39101.89	-0.63<2.57	67550.61 69347.53	95.48>2.57	0.62
LUT	0.9999	0.9998	y = 71407.23x -1328.94	4.48	2--100	-35423.19 38081.08	0.026<2.78	70688.71 72125.75	97.67>2.78	0.46

*Ecuación de la recta: $y = bX + a$ siendo X, concentración en ppm (mg/kg solvente) ; y, área pico (UV*seg)

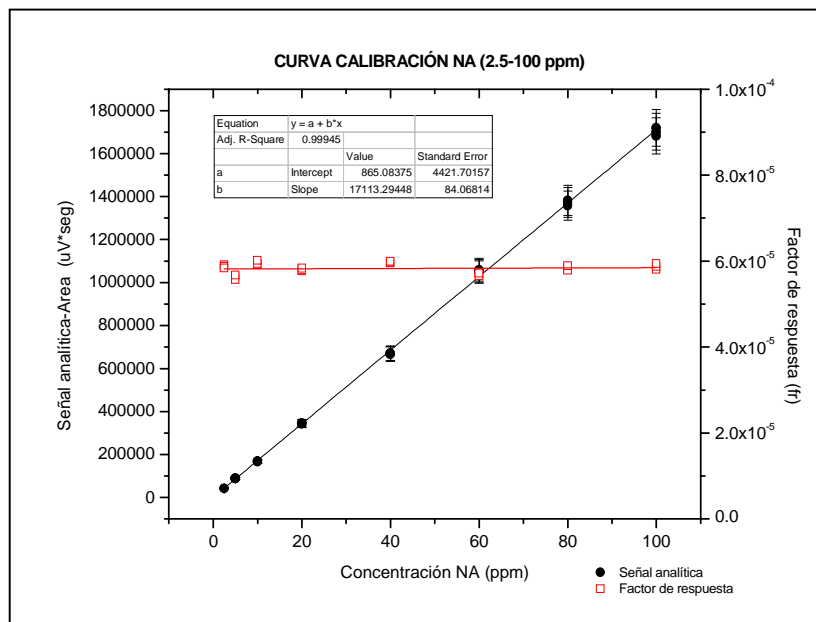


Figura 12. Curva de calibración para el flavonoide naringina (NA) en el rango de concentración de 2.5-100 ppm

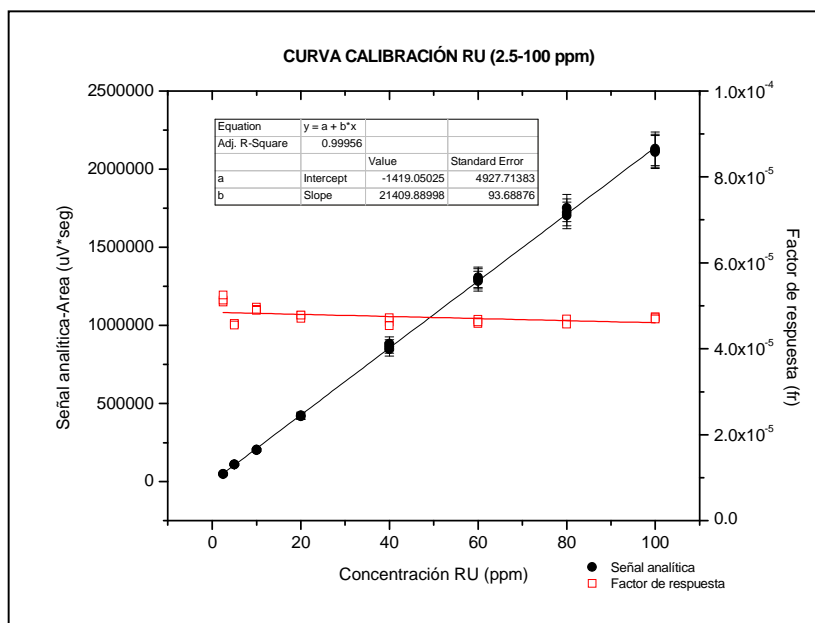


Figura 13. Curva de calibración para el flavonoide rutina (RU) en el rango de concentración de 2.5-100 ppm

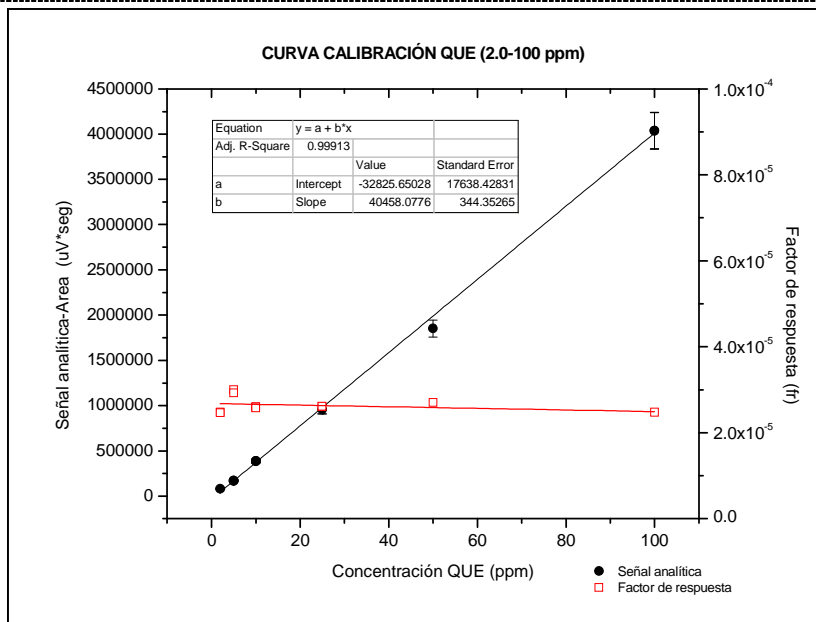


Figura 14. Curva de calibración para el flavonoide quercetina (QUE) en el rango de concentración de 2.0-100 ppm

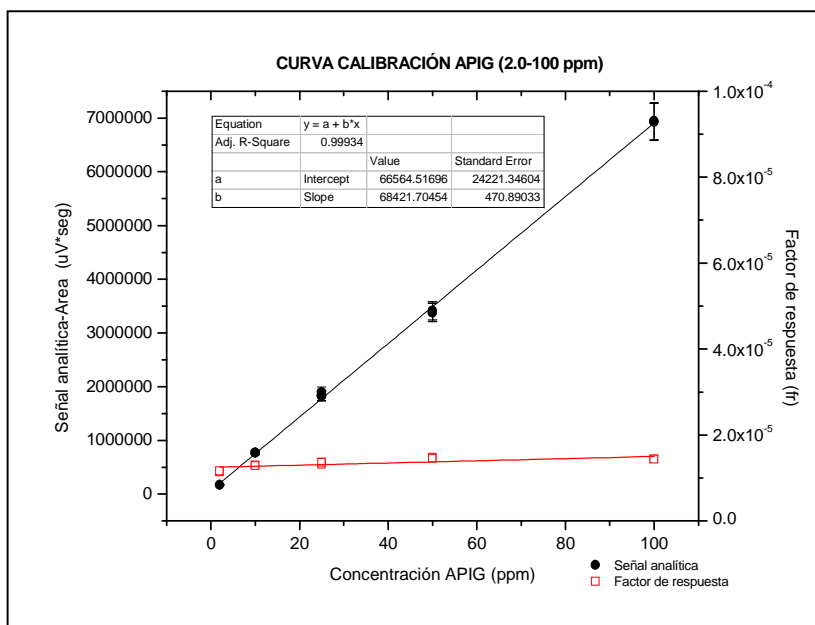


Figura 15. Curva de calibración para el flavonoide apigenina(APIG) en el rango de concentración de 2.0-100 ppm

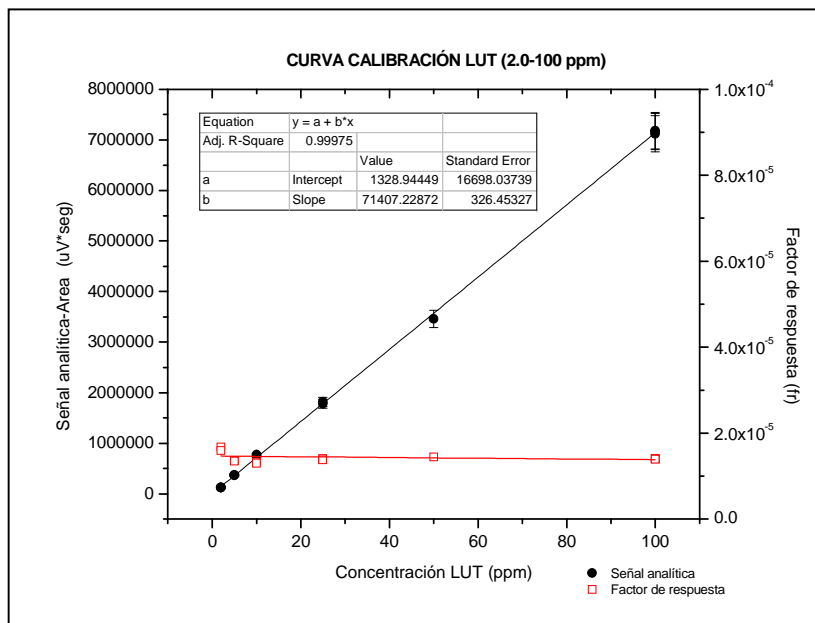


Figura 16. Curva de calibración para el flavonoide luteolina (LUT) en el rango de concentración de 2.0-100 ppm.

Precisión

Repetitividad del sistema

Con los datos obtenidos de las seis inyecciones de mezcla de los cinco flavonoides estándares (NA, RU, QUE, LUT, APIG) de concentraciones de 5.0, 15.0 y 30.0 ppm, se encontró que los coeficientes de variación para la todos los flavonoides evaluados, estuvieron en el rango de 0.2 % a 2.80. Igualmente, a partir del análisis estadístico de SAS system, se demostró que la precisión Intradía de los tiempos de retención y áreas de los flavonoides

presentaron un %RSD menor al 3.0%, el cual es un buen criterio de aceptación para la precisión en la repetitividad del sistema.

Reproducibilidad del sistema

A partir de los valores para las áreas y tiempos de retención de los flavonoides estándares evaluados (NA, RU, QUE, LUT, APIG) de concentraciones de 5.0, 15.0 y 30.0 ppm, inyectados en tres días diferentes, se encontró buena reproducibilidad del sistema cromatográfico de acuerdo a un valor de RSD inferior menor al 3.0%.

Reproducibilidad del método

Se encontró que el método de extracción por SPE y análisis cuantitativo vía HPLC para la determinación de los flavonoides totales en una muestra de extracto vegetal de hojas de caña de la variedad CC84-56, presentó una buena reproducibilidad (**Tabla 17**). Al relacionar la RSD máxima aceptable (4.90 %) para el método analítico calculada por la ecuación de Horwitz¹ en función de los límites de aceptación y del número de replicas (10) de muestras tratadas de forma independiente, desde la preparación hasta la lectura instrumental bajo las mismas condiciones, el mismo día y el mismo analista, el valor medio del contenido de flavonoides está dentro del criterio de aceptación para un nivel de confianza del 93-107 % (**Tabla 18**).

Tabla 17. Reproducibilidad del método a partir de una muestra de hojas de caña de azúcar (Variedad CC 84-56)

MUESTRA CC84-56	mg Flavonoide totales /g planta
1	0.27
2	0.28
3	0.26
4	0.26
5	0.27
6	0.26
7	0.25
8	0.27
9	0.25
10	0.27
A Media	0.26
Des Est	0.010
RSD/DER	3.70

¹ Ecuación de Horwitz RSC (%) = 1 (1-0.5 log c)
 Donde C = concentración del analito en la muestra

Tabla 18. Criterios de aceptación

Limites de Aceptación	Simple		Duplicado	
	RSD Método	RSD Sistema	RSD Método	RSD Sistema
98,5-101,5	0,6	0,4	0,8	0,6
97-103	1,2	0,8	1,6	1,2
95-105	1,9	1,4	2,7	1,9
93-107	2,7	1,9	3,8	2,7
90-110	3,9	2,8	5,5	3,9

El criterio de aceptación puede ser variable y estará dictado por los objetivos buscados. Así, la USP indica en general una RSD del sistema no mas de 2% inyectando 5 veces una solución estándar, aunque pueden obtenerse en condiciones apropiadas valores inferiores al 1% e incluso menores.

En la **Tabla 18** se relacionan la RSD máxima aceptable para un método analítico en función de los límites de aceptación y del número de replicas.

Por ejemplo para un intervalo de aceptación de 95-105% para efectuar una determinación por duplicado, la RSD deberá ser menor de 2.7%.

Por otra parte el grado de concentración del analito y la complejidad de la matriz resulta también de importancia y para el análisis de trazas o para el ensayo de una droga en fluidos biológicos puede no ser posible la precisión indicada, resultando apropiadas RSD de 5% a 10% o mayores.

Exactitud

En la evaluación para el estudio de la exactitud del método en la cuantificación de flavonoides en extractos vegetales de hojas de caña de azúcar, se encontraron porcentajes de recuperación que oscilaron entre 87.25-99.38% para los flavonoides de quercetina y rutina en tres niveles de dopaje de acuerdo con un contenido estimado del 50-100% en la muestra. Como puede observarse (**Tabla 19**), los extractos dopados con rutina exhibieron los porcentajes de recuperación mas altos (94.17-99.38%) con relación a los porcentajes para la quercetina. De acuerdo con la literatura (Colombo, R. et. al. 2006) estos niveles de recuperación son aceptables para

un matriz compleja (niveles reportados de 92.14-93.22 %) como la presente en tejidos de caña de azúcar en este estudio.

Tabla 19. Porcentajes de recuperación en los análisis cuantitativos del flavonoides rutina y quercetina en muestras de hojas de caña de azúcar (Variedad CC 85-92)

Compuesto	Cantidad adicionada mg/g)	Porcentaje de recuperación (%)	R.S.D. (%)
RU	1.6	94.17	1.1
	2.0	95.33	3.7
	2.4	99.38	0.4
QUE	1.6	87.29	2.5
	2.0	87.25	1.0
	2.4	89.17	1.8

Tabla 20. Resultado estadístico del porcentaje de recuperación.

VALOR MEDIO FLAVONOIDE RUTINA	96.29
S	2.74
RSD	2.84

Al realizar una prueba t para determinar la confiabilidad de los resultados, con los valores de recuperación del estándar del flavonoide rutina (**Tabla 20**), se asume la siguiente hipótesis:

“no existe diferencia significativa entre el 100% y el % recuperado”.

Tabla 21. Resultado estadístico del estudio de aceptación del criterio t para exactitud en la determinación del contenido de un flavonoide (rutina) en un extracto de hojas de caña de azúcar.

t_{calc}	2.26
$t_{\text{tab. (n-1gl y 95%)}}$	4.30

Como $t_{\text{calc}} <$ que el t_{tab} , (**Tabla 21**) se acepta la hipótesis y por tanto, no existe diferencia significativa entre el 100% y el porcentaje de recuperación obtenido, por ende el método para determinación de Flavonoides, como la Rutina, presenta una buena exactitud con un nivel de confianza del 95%.

Sensibilidad

Dado que la determinación de estos límites de detección y cuantificación (LOD y LOC respectivamente) supone un trabajo importante, en general solo se efectúa para el análisis de impurezas o trazas o cuando el rango analítico se encuentra muy próximo al límite de detección. En caso contrario, sólo se estudia la precisión y exactitud en la menor concentración probable para el analito.

Empleando otra aproximación, el **límite de detección (LOD)** para un analito es aquella concentración que proporciona una señal (y) significativamente

diferente a la señal de una muestra en "blanco" o "señal de fondo". Los límites de detección y cuantificación por tanto pueden estimarse a partir de la curva de regresión para concentraciones bajas de analito⁵¹.

Experimentalmente, se utilizaron los límites de confianza de la regresión, empleando soluciones patrón de 0.2-25% de NA, RU, QUE, LUT, APIG.

En la **Tabla 22** se resumen los resultados para estimar los límites de detección (LOD) y Límites de cuantificación (LOC) en unidades de ppm para los flavonoides evaluados en el presente estudio. Se puede observar que la mejor sensibilidad en términos de LOD, correspondió al flavonoide naringina (NA) (0.054 ppm). En general, el rango encontrado para el mínimo nivel de detección (LOD) utilizando el método isocrático HPLC, en la cuantificación de flavonoides, estuvo entre 0.054-0.55 ppm de flavonoides. Por otra parte, el rango en los niveles de cuantificación (LOC), estuvo entre 0.18-3.33 ppm de flavonoides en el presente estudio.

Tabla 22. Parámetros para el cálculo de los límites de detección y cuantificación de flavonoides vía HPLC (método isocrático).

Componente	<i>b</i>	σ	<i>LOD</i>^a (ppm)	<i>LOC</i>^b (ppm)
NA	17113.29	308,04	0.054	0,18
RU	21409.89	635,16	0.089	0,30
QUE	40458.08	13486,03	1.00	3,33
LUT	71407.23	13091,33	0.55	1,83
APIG	68421.70	2274,06	0.10	0,33

^a Límite de detección (LOD): la pendiente individual (*b*) y desviación estándar media (σ) fueron analizadas y el LOD calculado por la ecuación $=3.0 \sigma/b$.

^b Límite de cuantificación (LOC): la pendiente individual (*b*) y desviación estándar media (σ) fueron analizadas y el LOC calculado por la ecuación $=10 \sigma/b$.

ANEXO 2

CONDICIONES DE ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO PARA LA SEPARACIÓN, DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES

1. Condiciones de ensayo preliminares

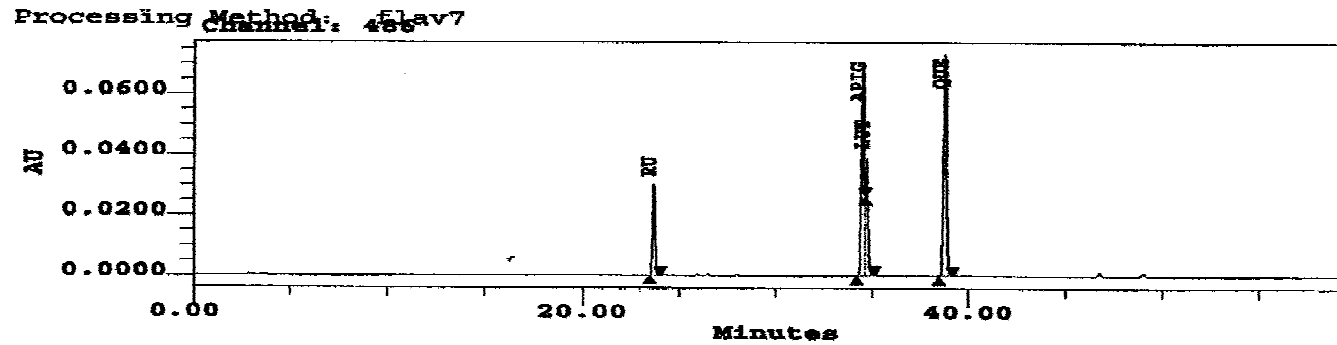
<i>Fase móvil</i>	<i>Fase estacionaria</i>	<i>Detección UV</i>	<i>Temp</i>	<i>Flujo y Volumen inyección</i>	<i>Resolución</i>
-Solvente A: ácido fórmico 0.2% -Solvente B: acetonitrilo Separación <u>Extractos de hojas</u> 0-8min, 10-13%B; 8-25min, 13-20%B; 25-40min, 20-40%B y 40-45min, 40-60%B <u>Raíces y yemas:</u> 0-8min, 10-13%B; 8-25min, 13-20%B; 25-40min, 20-40%B y 40-45min, 40-60%B	Columna Betasil C18 (4.6 x 100 mm; 3 µm de partícula).	360 nm 290 nm	40 °C	1.0mL/ min 20µL	Altos tiempos de retención y baja resolución. Pico de luteolina eluye con el de quercetina
-Solvente A: ácido fórmico 0.1% en agua -Solvente B: ácido fórmico 0.1% en acetonitrilo Gradiente lineal 10-60%B en 60min	Columna Betasil C18 (4.6 x 100 mm; 3 µm de partícula).	350 nm 280 nm	40 °C	1.0mL/ min 20µL	Altos tiempos de retención para el flavonoide rutina

Continuación condiciones de ensayo preliminares

Fase móvil	Fase estacionaria	Detección UV	Temp.	Flujo y Volumen inyección	Resolución
<p>–Solvente A : metanol: ácido acético: agua, 5:5:90 –Solvente B: metanol: ácido acético: agua, 90:5:5 Programa de elución: 8min solvente A, gradiente lineal desde 0-50%B en 70minutos.</p>	<p>Columna Betasil C18 (4.6 x 100 mm; 3 µm de partícula).</p>	<p>350 nm 280 nm</p>	<p>40 °C</p>	<p>1.0 mL/ min 20µL</p>	<p>Picos no resuelven y no presentan buena simetría, flavonoles eluyen a 40 minutos</p>
<p>Metanol: Acetonitrilo: Agua se prueban distintas proporciones 30: 20: 50 con 1% de (ácido acético) 40:45:15 con 1% de (ácido acético) 40:45:15 con 1% de (ácido acético)</p>	<p>Aquasil C18 (4.6 x 100 mm; 3 µm de partícula)</p>	<p>365 nm 257 nm</p>	<p>25 °C</p>	<p>0.5 mL/min 10µL</p>	<p>Mejora tiempos inmesurados pero continúa insatisfactorio la resolución de los picos</p>
<p>Metanol: Acetonitrilo: Agua 35: 15: 50 con 1% de ácido acético</p>	<p>Aquasil C18 (4.6 x 100 mm; 3 µm de partícula)</p>	<p>350 nm 280 nm</p>	<p>25 °C</p>	<p>0.5 mL/min 10µL</p>	<p>Resolución no es enteramente satisfactoria. Pero valores de k' óptimos están dentro del criterio de 2 a 10.</p>

2. Perfil de elución gradiente lineal, con columna Betasil C18.

RU-APIG-LUT-QUE .DETECCIÓN FLAV 350. TEMPERATURA 40°C



Peak Results

#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	% Area	% Ht	Start Time (min)	End Time (min)
1	RU	23.700	229890	30642	11.52	14.37	23.433	23.983
2	APIG	34.517	647958	70531	32.48	33.09	34.200	34.633
3	LUT	34.733	381365	38514	19.12	18.07	34.633	35.117
4	QUE	38.783	735643	72494	36.88	34.47	38.467	39.183

Peak Results

ANEXO 3

RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE VARIANZA POR FLAVONOIDE Y CONCENTRACIÓN

1. Resultados de las significancia de los flavonoides determinados por día para cada nivel de concentración

Flavonoide	Conc. (mg/g)	Variable	Fuente de variación	Nivel de Significancia
Apigenina	5	Area	Día	<0.0001
	15	Area	Día	<0.0001
	30	Area	Día	0.0846
Luteolina	5	Area	Día	0.0031
	15	Area	Día	<0.0001
	30	Area	Día	0.3487
Naringina	5	Area	Día	0.0002
	15	Area	Día	0.0057
	30	Area	Día	0.0029
Quercetina	5	Area	Día	0.0001
	15	Area	Día	<0.0001
	30	Area	Día	0.0007
Rutina	5	Area	Día	<0.0001
	15	Area	Día	<0.0001
	30	Area	Día	<0.0001

**2. Comparación de promedios de área por día para la
determinación de flavonoides vía HPLC**

Flavonoide	Día	Número	Promedio Area (*10000)		
			Concentración (mg/ g planta)		
			5	15	30
Apigenina	1	6	29.5c*	100.6a	20.4b
	2	6	30.3a	94.8b	20.9a
	3	6	30.0b	93.7c	20.6b
	4	6	29.4c	99.9a	20.4b
Luteolina	1	6	30.6c	100.9a	20.6a
	2	6	32.3a	96.5b	21.1a
	3	6	31.7ab	95.9b	20.7a
	4	6	31.1bc	100.5a	20.9a
Naringina	1	6	1.6b	4.95bc	9.83b
	2	6	1.8a	5.11ab	11.26a
	3	6	1.72a	4.85c	10.8a
	4	6	1.64b	5.22a	10.65a
Quercetina	1	6	16.4b	55.0b	110.3b
	2	6	17.1a	52.4c	118.0a
	3	6	16.6b	52.4c	116.3a
	4	6	16.3b	55.8a	112.3b
Rutina	1	6	10.2c	33.0b	66.1b
	2	6	10.5b	31.8c	69.6a
	3	6	10.7a	32.0a	69.3a
	4	6	10.3c	33.6a	67.1b

* Letras iguales no difieren estadísticamente (Duncan al 5%)

ANEXO 4

RESULTADOS DEL ANALISIS DE VARIANZA PARA LOS CONTENIDOS DE ALGUNOS FLAVONOIDES Y FLAVONOIDES TOTALES EN DIFERENTES VARIEDADES DE CAÑA DE AZÚCAR

1. Comparación de promedios de flavonoides en hojas de caña de azúcar para algunas variedades comerciales y promisorias

Variedad	N	Concentración (mg/g de planta)					
		Total	NA	RU	QUE	LUT	APIG**
CC 85-92	2	1.40a*	0.90a	0.31a	0.028f	0.056a	0.10a
CC 85-63	2	0.74b	0.49b	0.23c	0.001j	0.02e	0.007gh
V 71-51	2	0.73c	0.37c	0.26b	0.04d	0.03c	0.017d
CC 84-75	2	0.67d	0.37c	0.19e	0.07a	0.04b	0.001i
CC 93-3895	2	0.38e	0.11g	0.18f	0.06c	0.02f	0.03b
CC 93-4418	2	0.33g	0.21d	0.033i	0.07b	0.02f	0.01f
CC 84-56	2	0.29h	0.13f	0.09h	0.04e	0.03d	0.001i
CC 89-2000	2	0.20i	0.09gh	0.09h	0.008i	0.004g	0.01gf
CC 92-2393	2	0.13k	0.04ji	0.02ji	0.01h	0.03c	0.017d
CC 93-4223	2	0.08l	0.03j	0.02j	0.007i	0.02f	0.004ih
CC 92-2358	2	0.08l	0.03j	0.02j	0.006i	0.02f	0.004ih
POJ 2714	2	0.36f	0.19e	0.10g	0.01h	0.03c	0.03c
CC 84-66	2	0.35f	0.001k	0.27b	0.02g	0.04b	0.02ed
CC 85-15	2	0.34g	0.06i	0.21d	0.02g	0.04b	0.01gf
CC 86-33	2	0.15j	0.08h	0.01j	0.001j	0.04b	0.01ef

* Letras iguales no difieren estadísticamente (Duncan al 5%)

** NA (Naringina), RU (Rutina), QUE (Quercetina), LUT (Luteolina), APIG (Apigenina)

2. Comparación de promedios de flavonoides en hojas, yemas y raíces para algunas variedades de caña de azúcar

Grupo	Tejido vegetal	Variedad	Flavonoide (mg/g de planta)*					TOTAL
			NA	RU	QUE	LUT	APIG	
I	Hojas	CC 85-92	0.90a**	0.31a	0.03f	0.06a	0.10a	1.40a
	Hojas	CC 93-4418	0.21d	0.03i	0.07b	0.02f	0.01f	0.33g
	Hojas	CC 89-2000	0.09h	0.08h	0.01i	0.004g	0.01f	0.20i
	Hojas	CC 84-56	0.13f	0.09h	0.04e	0.03d	0.01f	0.29h
II	Yemas	MZC 74-275	1.29a	0.11a	0.04a	0.03a	0.01a	1.44a
	Yemas	CP 57-603	0.47b	0.07b	0.04a	0.01b	0.001b	0.62b
	Raíces	CC 85-92	0.02c	0.04c	0.02b	0.001c	0.001b	0.10c

* NA Naringina RU Rutina QUE Quercetina
 LUT Luteolina APIG Apigenina

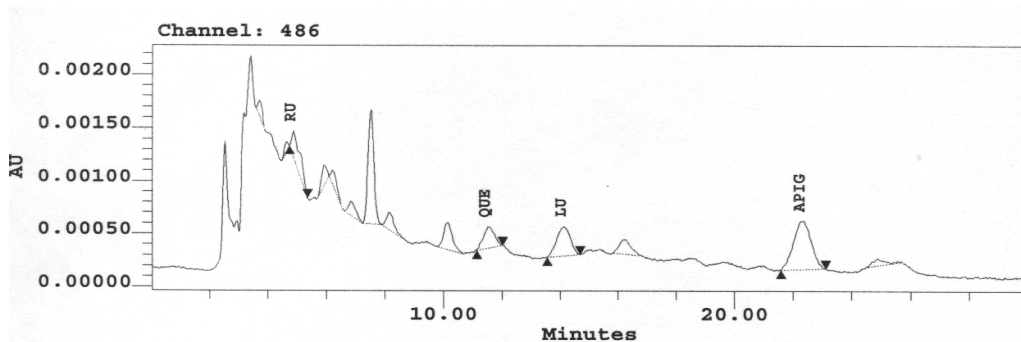
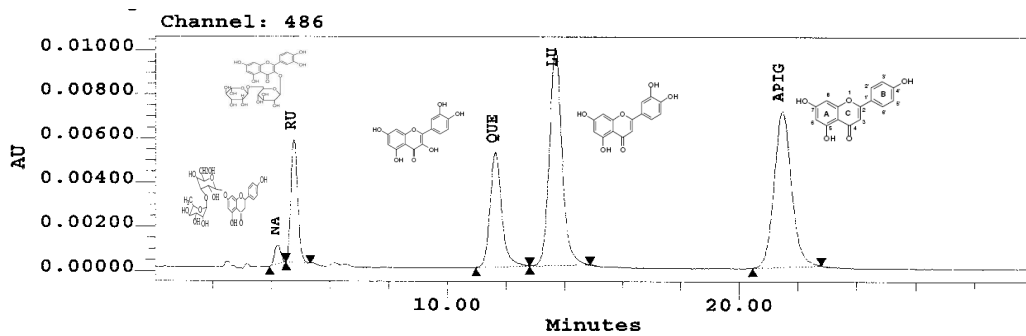
** Letras iguales no difieren estadísticamente (Duncan al 5%)

ANEXO 5

Cromatogramas HPLC – UV de extractos de muestras de material vegetal de algunas variedades de caña de azúcar

Cromatograma HPLC-UV de mezcla de patrones de flavonoides y extracto raíz de caña (CC 93 - 3895)

Detección 350 nm

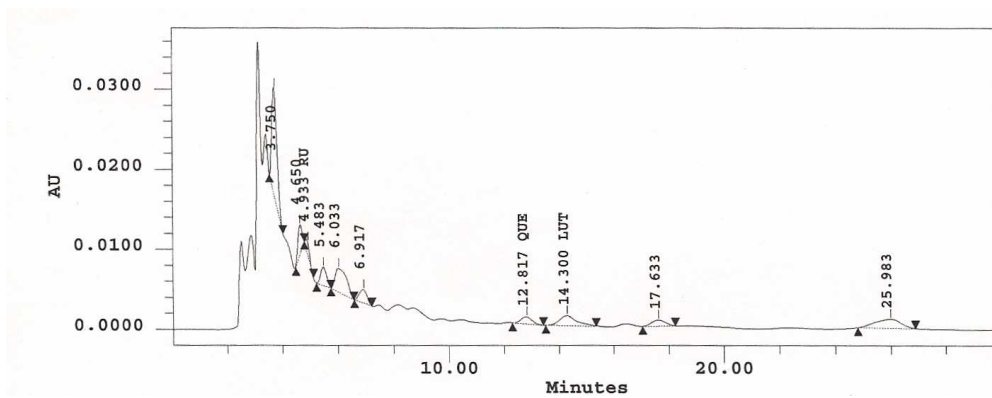


NA = Naringina; RU = Rutina; QUE = Quercetina; LU = Luteolina;
APIG = Apigenina

**Cromatograma HPLC – UV de extracto de hojas de la
Variedad CC 92-2393**

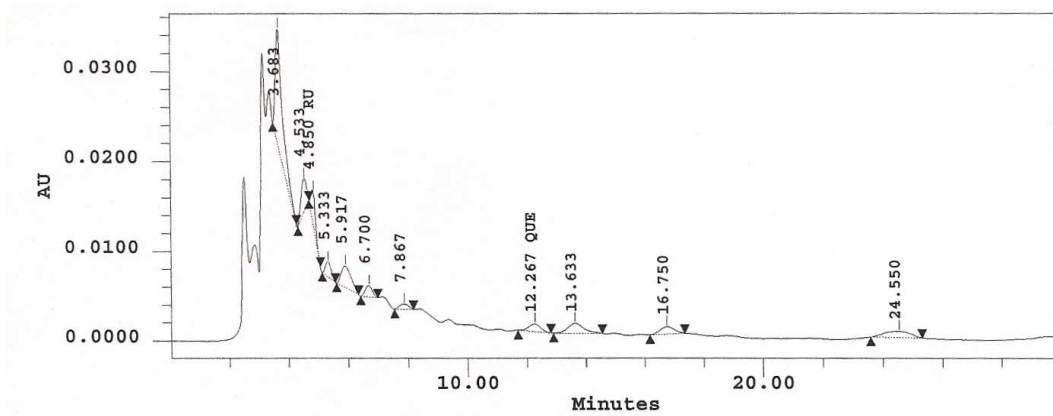
CC 92 – 2393 Detección a 350 nm

a)



CC 92 – 2393 Detección a 280 nm

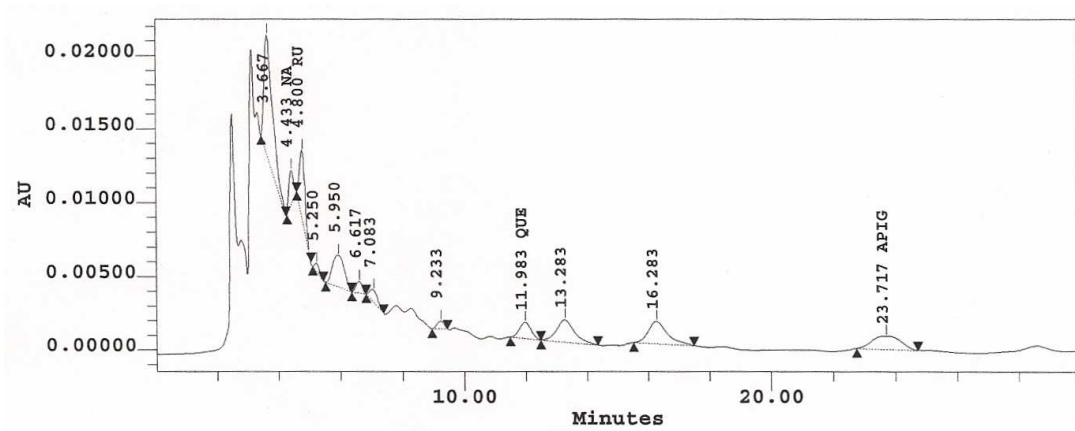
b)



**CROMATROGRAMA HPLC – UV de extractos de hojas de la
Variedad CC 93- 4223**

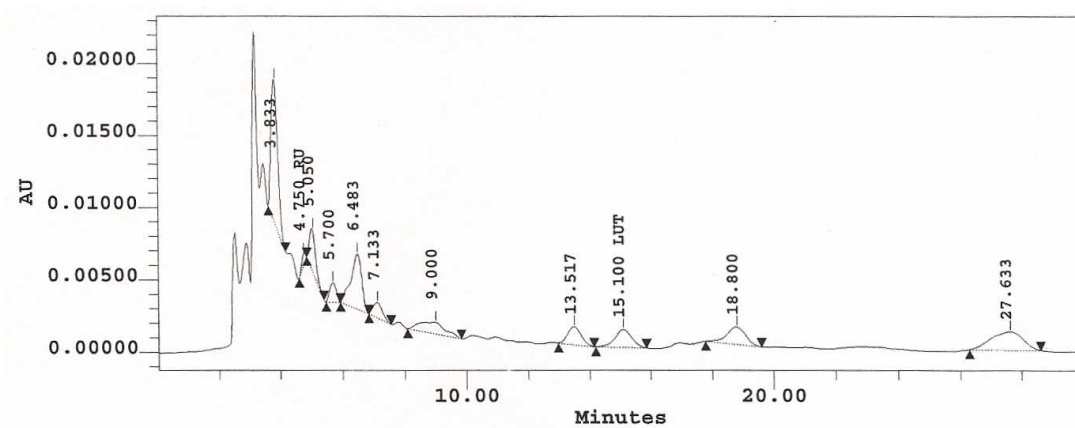
CC 93- 4223 Detección a 280 nm

a)



CC 93- 4223 Detección a 350 nm

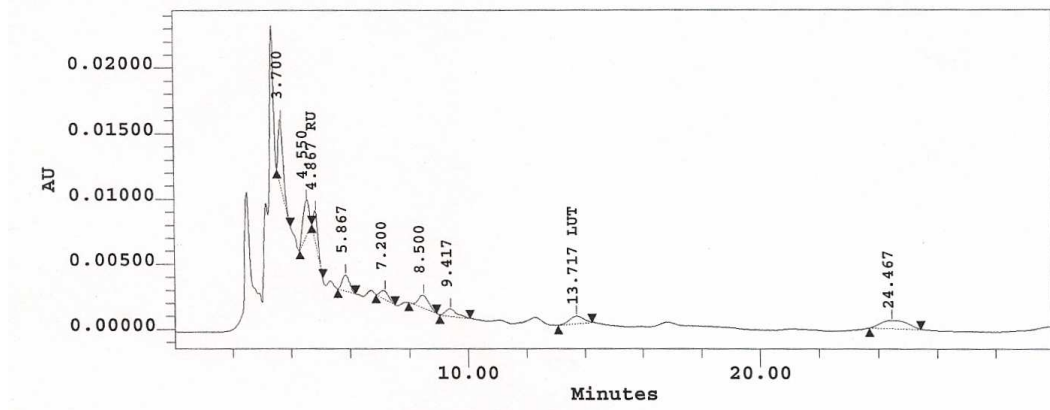
b)



**CROMATROGRAMA HPLC – UV de extractos de hojas de la
Variedad CC 92- 2358**

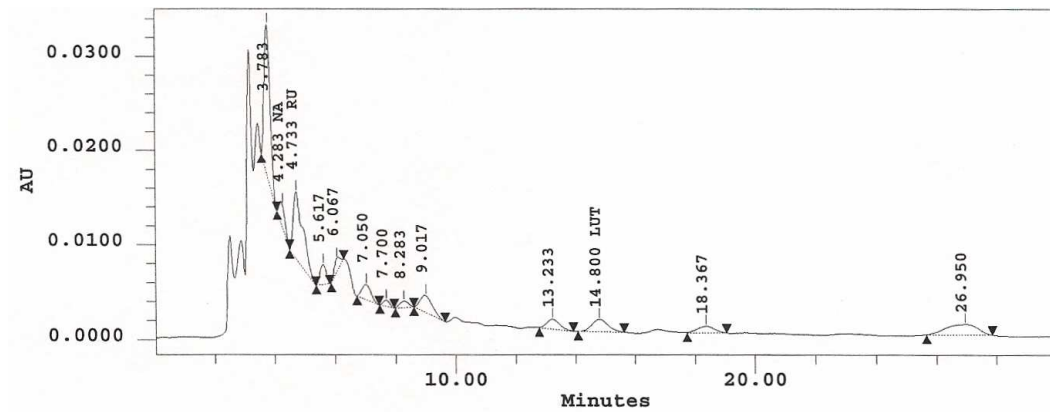
CC 92- 2358 Detección a 280 nm

a)



CC 92- 2358 Detección a 350 nm

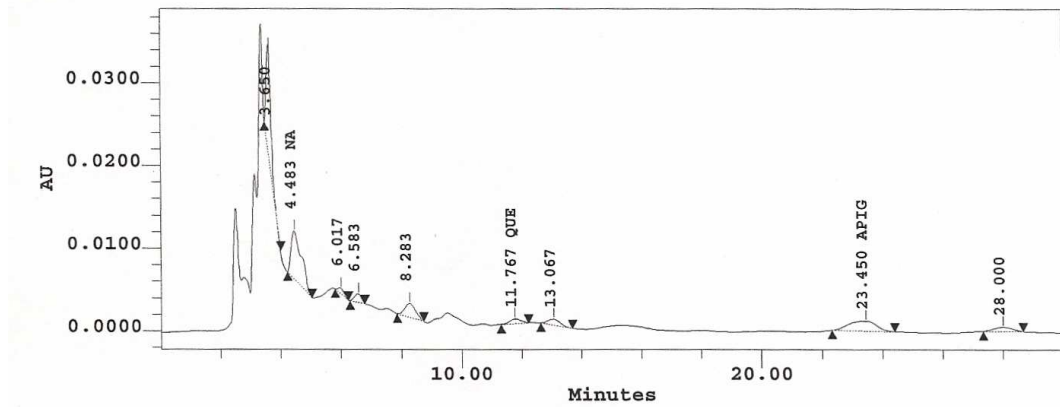
b)



**CROMATOGRAMA HPLC – UV de extractos de hojas de la
Variedad CC 84 - 56**

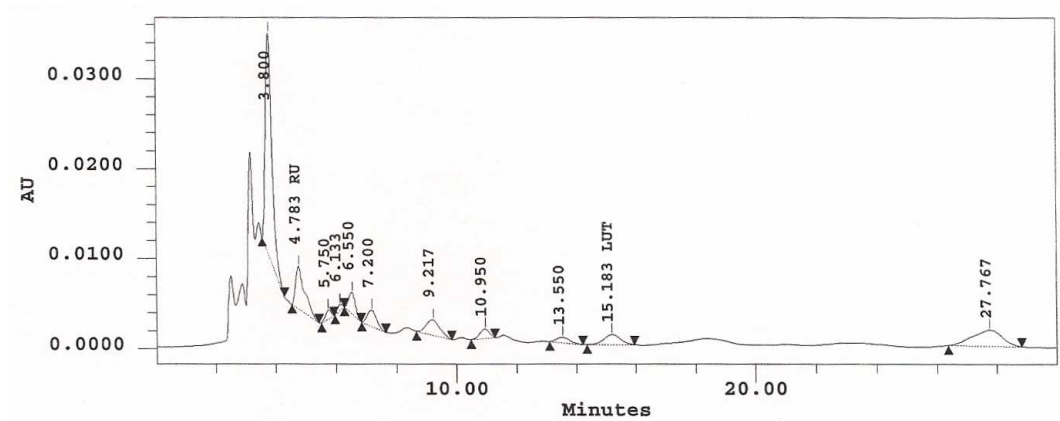
CC 84 - 56 Detección a 280 nm

a)



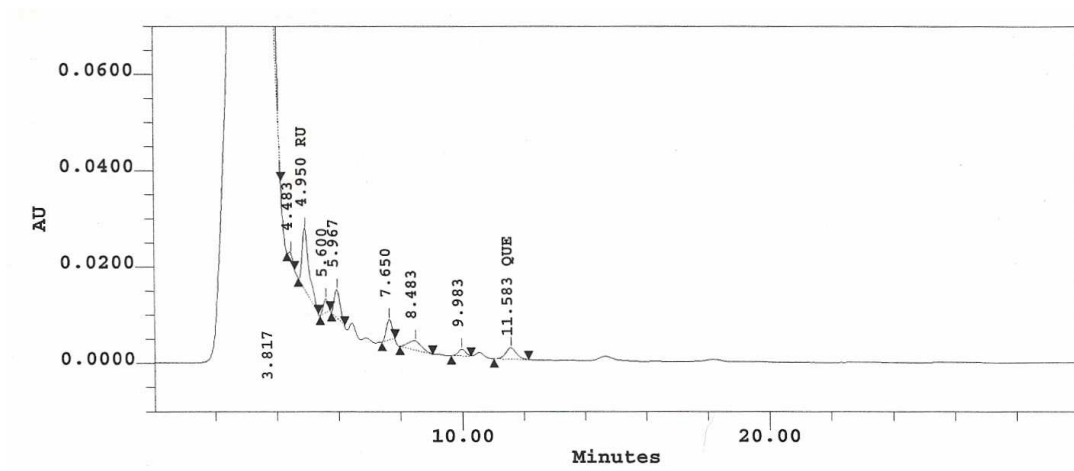
CC 84 - 56 Detección a 350 nm

b)



**CROMATROGRAMA HPLC – UV de extractos de yemas
de la Variedad MZC 74 - 275**

MZC 74 - 275 Detección a 280 nm



ANEXO 6

Determinación espectrofotométrica (UV) de fenoles totales

Reacción general del reactivo de Folin con compuestos fenólicos

