



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Instituto de Ciencias Químicas y Ambientales

“AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE TRANS-ZEATINA EN
BIOINSUMOS MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA
RESOLUCIÓN (HPLC), UTILIZANDO COMO PATRÓN DESECHOS DE
MAÍZ (ZEA MAYS)”

TESIS DE GRADO

Previa la obtención del Título de:

INGENIERO QUÍMICO

Presentado por:

CHÓEZ GUARANDA IVÁN ANDRÉS

GUAYAQUIL-ECUADOR

AÑO

2012

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar el mayor agradecimiento a la Ph.D. Esther Lilia Peralta, directora del CIBE-ESPOL, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, ya que sin su ayuda nada de esto hubiera sido posible.

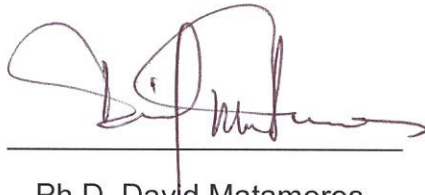
A mi directora de Tesis, M.Sc. Patricia Manzano Santana, por la confianza brindada durante la ejecución de ésta investigación.

A la M.Sc. Haydeé Torres Camba por su gentil y constante colaboración como parte del Tribunal de Graduación.

DEDICATORIA

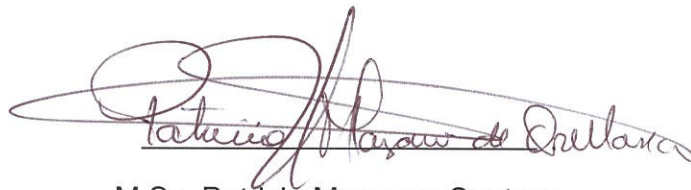
Dedico esta tesis a mi mamá, a mi papá por su constante ayuda, hermanos y amigos que estuvieron siempre presentes ya que permitieron que culmine esta etapa de mi vida con éxito.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



Ph.D. David Matamoros

DIRECTOR ICQA



M.Sc. Patricia Manzano Santana

DIRECTORA DE TESIS



M.Sc. Haydeé Torres C.

VOCAL PRINCIPAL

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de este Proyecto de Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)



Iván Andrés Chóez Guaranda

RESUMEN

Los reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas son en la actualidad un conjunto de compuestos orgánicos que se utilizan en la agricultura para mejorar los cultivos, sustituyendo así el uso de fertilizantes sintéticos que alteran el ecosistema y a largo plazo perjudican a los consumidores

La trans-zeatina, es uno de estos compuestos que se sintetiza de forma natural en las plantas y se lo está utilizando como aditivo para la formulación de diferentes tipos de bioinsumos.

En la actualidad no se ha determinado aún la composición química de los bioinsumos de producción local, por lo que la presente investigación tiene como objetivo determinar la concentración de trans-zeatina en estos preparados y encontrar una fuente natural de este tipo de regulador del crecimiento.

Para el desarrollo de ésta investigación se tomó como referencias las metodologías descritas por Olivella *et al.* (2001), García-Florez *et al.* (2009) y Ortiz *et al.* (2008). La identificación del compuesto se realizó mediante cromatografía TLC utilizando cromatoplasmas Merck 60 F254 TLC y luz UV; y la cuantificación mediante cromatografía líquida de alta resolución en un equipo HPLC-UV marca Hewlett Packard, Series 1050.

Los valores de concentración de trans-zeatina promedio obtenidos fueron 0.176, 0.296 y 0.730 mg/g de muestra seca, en tusa, hojas y granos de maíz respectivamente. La mayor concentración de la fitohormona se manifestó en los granos de maíz. Sin embargo, la concentración de tusa y hojas de maíz es alta en comparación a la encontrada en los bioinsumos.

En las muestras de bioinsumos obtenidos del Programa de Maestría en Biotecnología Agrícola (PMBA), los valores de concentración de trans-zeatina promedio fueron de 0.021 y 0.057 mg/g de muestra seca. La mayor concentración de la fitohormona se presentó en el bioinsumo cuya formulación poseía microorganismos comerciales y además en la que se había determinado con anterioridad la mayor concentración de otros reguladores del crecimiento como quinetina y ácido indolacético en comparación con las otras formulaciones.

Estas concentraciones no han sido referenciadas e indican la utilidad ecológica y económica que pueden tener los residuos de maíz mediante aplicación de sus extractos en distintas formulaciones de bioinsumos. Mejorando así la agricultura orgánica de nuestro país, contribuyendo con soluciones amigables para el ambiente y favoreciendo de manera rentable a los agricultores.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	II
ÍNDICE GENERAL.....	IV
ABREVIATURAS	VIII
SIMBOLOGÍA	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE GRÁFICOS	XI
ÍNDICE DE TABLAS	XII
INTRODUCCIÓN	XIII

CAPITULO 1

1. BASES TEÓRICAS

1.1 Fitohormonas y su importancia funcional en las plantas	1
1.2 Citoquininas, estimulantes fitoquímicos.....	3
1.2.1 Estructuras de algunas citoquininas naturales	4
1.2.2 Métodos para detectar citoquininas.....	6
1.2.3 Las citoquininas promueven el movimiento de los nutrientes.....	8
1.2.4 Las citoquininas promueven el desarrollo de los cloroplastos.....	11
1.2.5 Las citoquininas promueven la expansión celular en hojas y cotiledones.....	12
1.2.6 Las citoquininas retrasan la senescencia	14

1.3 Trans-Zeatina, citoquinina natural	15
1.4 Bioinsumos y la agricultura orgánica	18
1.4.1 Importancia económica de los bioinsumos	19
1.4.2 Propiedades y características de los materiales utilizados en la elaboración de bioinsumos	21
1.4.3 Enmiendas orgánicas líquidas	23
1.4.3.1 Calidad de las enmiendas orgánicas líquidas	24
1.4.3.2 Factores que afectan la calidad de las enmiendas orgánicas líquidas	25
1.5 Maíz (<i>Zea mays</i>).....	29
1.5.1 Origen y difusión del maíz	31
1.5.2 La planta de maíz	33
1.5.3 Aplicaciones del maíz.....	35
1.5.4 Aprovechamiento de los residuos de maíz.....	37

CAPITULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales	39
2.1.1 Muestras de bioinsumos.....	39
2.1.2 Muestras de maíz	40

2.1.3 Reactivos.....	41
2.1.4 Equipos	42
2.2 Metodología.....	44
2.2.1 Curva de calibración de trans-zeatina	45
2.2.1.1 Disolución del patrón de trans-zeatina	46
2.2.1.2 Cromatografía HPLC del patrón de trans-zeatina	46
2.2.2 Aislamiento, identificación y cuantificación de trans-zeatina	47
2.2.2.1 Aislamiento de trans-zeatina en muestras de maíz y enmiendas orgánicas líquidas	48
2.2.2.2 Identificación de trans-zeatina en muestras de maíz y enmiendas orgánicas líquidas mediante cromatografía TLC	51
2.2.2.3 Cuantificación de trans-zeatina en muestras de maíz y enmiendas orgánicas líquidas mediante cromatografía HPLC.....	52
2.2.3 Análisis estadístico	53

CAPITULO 3

3. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

3.1 Identificación de trans-zeatina mediante cromatografía TLC.....	54
---------------------------------------------------------------------	----

3.2 Curva de calibración de trans-zeatina	56
3.3 Cuantificación de trans-zeatina mediante cromatografía HPLC	58

CAPITULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones	68
4.2 Recomendaciones	70

APÉNDICES

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
CIBE	Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
EAB1	Extracto acuoso de bioinsumo 1
EAB2	Extracto acuoso de bioinsumo 2
EAB3	Extracto acuoso de bioinsumo 3
EAMG	Extracto acuoso muestra de grano
EAMH	Extracto acuoso muestra de hoja
EAMT	Extracto acuoso muestra de tusa
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICQA	Instituto de Ciencias Químicas y Ambientales
ONU	Organización de las Naciones Unidas
PIB	Producto Interno Bruto
PMBA	Programa de Maestría en Biotecnología Agrícola
TLC	Thin Layer Chromatography

SIMBOLOGÍA

cm	Centímetro
°C	Grado Centígrado
g	Gramo
kg	Kilogramo
Km	Kilómetro
m	Metro
M	Molar (Concentración)
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de mercurio
mM	Milimolar
mV	Milivoltio
N	Normal (Concentración)
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón
RPM	Revoluciones por minuto
UV	Ultravioleta
µL	Microlitro
µm	Micrómetro

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1	4
Figura 1.2	5
Figura 1.3	7
Figura 1.4	10
Figura 1.5	14
Figura 1.6	16
Figura 1.7	17
Figura 1.8	30
Figura 2.1	44
Figura 2.2	48
Figura 2.3	50
Figura 2.4	52
Figura 3.1	54
Figura 3.2	57
Figura 3.3	60
Figura 3.4	61
Figura 3.5	62
Figura 3.6	63
Figura 3.7	63
Figura 3.8	64

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfica 1	Curva de calibración de trans-zeatina	Pág. 58
-----------	---------------------------------------	------------

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla I	Codificación y composición de las enmiendas orgánicas líquidas.....	40
Tabla II	Codificación y composición de las muestras de maíz (<i>Zea mays</i>).....	40
Tabla III	Reactivos para el aislamiento y cuantificación de trans-zeatina.....	41
Tabla IV	Codificación de las diluciones del patrón de trans-zeatina.....	46
Tabla V	Valores Rf obtenidos de la cromatografía TLC.....	55
Tabla VI	Resultados HPLC del patrón trans-zeatina.....	57
Tabla VII	Concentración de trans-zeatina en bioinsumos y muestras de maíz (<i>Zea mays</i>).....	65

INTRODUCCIÓN

La agricultura es una de las actividades más antiguas y de mayor importancia en el Ecuador, siendo fuente principal generadora de alimentos de consumo interno y externo. Según datos del Banco Central del Ecuador, la agricultura junto con la ganadería y la pesca forman el principal aporte al Producto Interno Bruto (PIB) del país con una cantidad aproximada de \$ 2'509,960 al 2009, valor que ha ido aumentando progresivamente en los últimos años [1].

Debido a esta gran demanda de consumo externo, los agricultores se ven en la necesidad de mejorar la calidad de sus productos, buscando recursos que les permitan optimizar sus cultivos. Para poder lograrlo utilizan sustancias químicas que promueven el control de patógenos y el desarrollo acelerado de las plantaciones. Sin embargo, estas sustancias químicas conocidas como fertilizantes sintéticos tienen efectos negativos sobre los suelos de cultivo, los productos agrícolas y sus consumidores.

A pesar de la utilización de fertilizantes sintéticos, existe un marcado interés en la preparación y utilización de fertilizantes con características ecológicas denominados bioinsumos, un ejemplo de esto son las enmiendas orgánicas líquidas, cuya utilización en campo está en auge.

Una enmienda orgánica líquida es cualquier sustancia orgánica capaz de mejorar las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo [2]. Poseen un gran contenido de materia orgánica y microorganismos, que en cantidades pequeñas promueven, no sólo el crecimiento vegetal, sino otras funciones fisiológicas que son de interés para la agricultura [3].

En las plantas las fitohormonas conocidas como auxinas, ácido abscísico, citoquininas, giberelinas y el etileno son sintetizadas de forma natural siendo sustancias bioestimulantes del crecimiento vegetal [4]. De éstas, las citoquininas constituyen un grupo de hormonas vegetales que promueven la división y la multiplicación celular. La trans-zeatina es una citoquinina natural que se aísla de las plantas y presenta grandes utilidades para la agricultura ya que estimula algunas funciones de las células vegetales [5].

En muestras vegetales los procedimientos para la cuantificación de trans-zeatina requieren de diversas etapas previas de purificación ya que los niveles de fitohormonas son muy bajos en relación a otros compuestos que copurifican con ellas [6].

Trabajos realizados mediante bioensayos de masa cotiledonar de rábano, ELISA y cromatografía líquida de alta resolución HPLC muestran resultados

positivos para la cuantificación de trans-zeatina y otras fitohormonas en yemas de tubérculos de papas [7], hojas desarrolladas de *Gerbera jamesonii* cv *Bolus* [6], tuberización de *Solanum tuberosum* L. y *Solanum phureja* Juz. et Buk [8],

En embriones y frutos inmaduros de maíz se ha determinado la presencia de una citoquinina natural a la que se denominó trans-zeatina debido al nombre científico del maíz *Zea mays*. Sin embargo, no existen valores referenciados para desechos de maíz como la tusa y la hoja [9].

Existen trabajos de investigación en los que se ha cuantificado auxinas y otras citoquininas en enmiendas orgánicas líquidas de producción local. Los resultados obtenidos de estas fitohormonas fueron 1020.88 ppm y 3.091 ppm para ácido indolacético y quinetina respectivamente. Sin embargo, no existen valores referenciados para la cuantificación de trans-zeatina en este tipo de bioinsumos [10].

En base a los estudios mencionados se justifica la necesidad de identificar y cuantificar trans-zeatina en las enmiendas orgánicas líquidas utilizando como patrón desechos de maíz, el mismo que fue validado por métodos cromatográficos utilizando un patrón de trans-zeatina marca SIGMA. El presente trabajo servirá de referencia para futuras investigaciones

concernientes al aprovechamiento de estos desperdicios como potenciales patrones, contribuyendo con una solución amigable para el manejo de estos residuos orgánicos y favoreciendo de forma rentable a los agricultores.

Hipótesis

- Las enmiendas orgánicas líquidas de producción local poseen un gran porcentaje de trans-zeatina, lo cual explicará la efectividad de estos bioinsumos como reguladores del crecimiento vegetal.
- La tusa y hojas de maíz (*Zea mays*) poseen alta concentración de trans-zeatina que serán utilizados como patrón químico, otorgando a estos desechos utilidad ecológica y económica.

Objetivo General

- Establecer un protocolo para el aislamiento, identificación y cuantificación de trans-zeatina en bioinsumos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando como patrón desechos de maíz (*Zea mays*).

Objetivos específicos

- Establecer la curva de calibración del patrón de trans-zeatina mediante cromatografía HPLC.
- Aislar, identificar y cuantificar trans-zeatina en granos y desechos de maíz (*Zea mays*) por métodos cromatográficos TLC y HPLC, para su utilización como patrón.
- Aislar, identificar y cuantificar trans-zeatina en enmiendas orgánicas líquidas de producción local por métodos cromatográficos TLC y HPLC.
- Implementar un protocolo para el aislamiento, identificación y cuantificación de trans-zeatina en enmiendas orgánicas líquidas de producción local por métodos cromatográficos TLC y HPLC.

CAPÍTULO 1

1. BASES TEORICAS

1.1 Fitohormonas y su importancia funcional en las plantas

Una planta, para crecer, necesita luz, dióxido de carbono, agua y elementos minerales, incluido el nitrógeno, del suelo. Con todos estos elementos, la planta fabrica materia orgánica, convirtiendo materiales sencillos en los complejos compuestos orgánicos de que están compuestos los seres vivos. La planta no se limita a aumentar su masa y su volumen, sino que se diferencia, se desarrolla, adquiere una forma y crea una variedad de células, tejidos y órganos. ¿Cómo puede una sola célula, el cigoto, ser el origen de las variadísimas partes: vástago, raíz, flor, fruto, semilla, que componen el extraordinario individuo conocido como una planta normal? Muchos de los detalles de cómo están regulados estos procesos no son conocidos, pero ha quedado claro que el desarrollo normal depende de la conjunción de numerosos factores internos y externos.

Los principales factores internos son compuestos químicos. Las sustancias controladoras del crecimiento en las plantas son conocidas como fitohormonas u hormonas vegetales. Son pequeñas moléculas químicas sintetizadas de forma natural por las plantas que

afectan al desarrollo y crecimiento de los vegetales a muy bajas concentraciones. Por ejemplo, en el vástago de una piña tropical (*Ananas comosus*) sólo se encuentran 6 µg de ácido indolacético por kg de material vegetal, una conocida fitohormona.

El término hormona procede de la palabra griega hormaein que significa excitar. No obstante, hoy se sabe que muchas hormonas tienen efectos inhibitorios. De modo que en lugar de considerar las hormonas como estimuladores, quizá es más útil considerarlas como reguladores químicos.

En síntesis se define a las fitohormonas como compuestos orgánicos sintetizados en una parte de la planta y que se translocan a otra parte donde, a muy bajas concentraciones, inducen una respuesta fisiológica.

Se conocen cinco grupos principales de hormonas vegetales o fitohormonas: las auxinas, las citoquininas, las giberelinas, el etileno y el ácido abscísico. Todas ellas actúan coordinadamente para regular el crecimiento en las diferentes partes de una planta. Otras sustancias que eventualmente pueden clasificarse como fitohormonas son: las poliaminas, los jasmonatos, el ácido salicílico,

los brasinosteroides, y la sistemina [11].

1.2 Citoquininas, estimulantes fitoquímicos

Las citoquininas fueron descubiertas mientras se buscaban factores que estimularan la división de las células vegetales. Desde su descubrimiento, se ha demostrado que las citoquininas afectan a otros muchos procesos fisiológicos y del desarrollo, entre los que se incluyen la senescencia de la hoja, la movilización de los nutrientes, la dominancia apical, la formación y actividad de los meristemos del ápice caulinar, el desarrollo floral, la ruptura de la dormición de la yema y la germinación de la semilla. Las citoquininas también parecen mediar en muchos aspectos del desarrollo regulado por la luz, como la diferenciación de los cloroplastos, el desarrollo del metabolismo autotrófico y la expansión del cotiledón y la hoja.

En síntesis, las citoquininas regulan numerosos procesos celulares, destacando entre ellos el control de la división celular en el crecimiento y desarrollo y se le considera un diagnóstico de esta clase de reguladores del crecimiento [5].

1.2.1 Estructuras de algunas citoquininas naturales

La mayoría de las plantas tienen trans-zeatina como principal citoquinina libre, pero la dihidrozeatina y la isopenteniladenina son más comunes en plantas nativas. En la Figura 1.1 podemos observar algunas características similares entre las moléculas de trans-zeatina, cis-zeatina y dihidrozeatina.

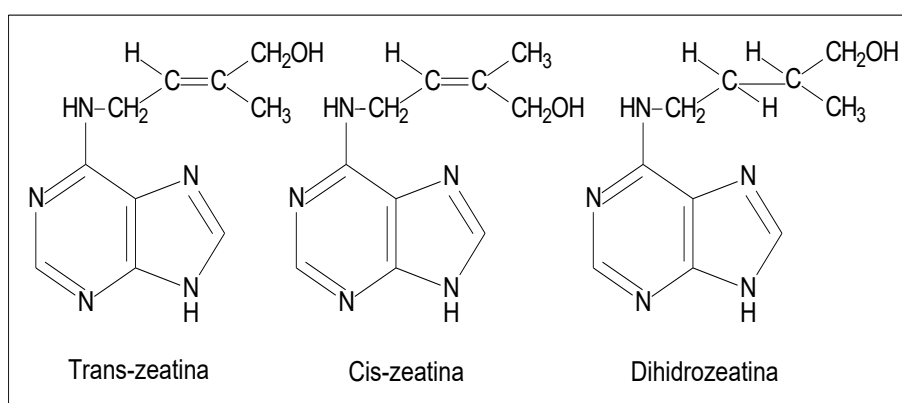


FIGURA 1.1 ESTRUCTURA MOLECULAR DE ALGUNAS CITOQUININAS NATURALES

Entre otras citoquininas libres también están ribósidos y ribótidos de zeatina, aunque estos compuestos pueden ser activos como citoquininas por la conversión de sus bases respectivas. Otras citoquininas libres procedentes de bacterias tales como 2-metilto-cis-ribosilzeatina, así como cis o trans-zeatina, y sus ribósidos y ribótidos [12]. En la Figura 1.2 se presenta las estructuras moleculares de otras citoquininas naturales procedentes de bacterias.

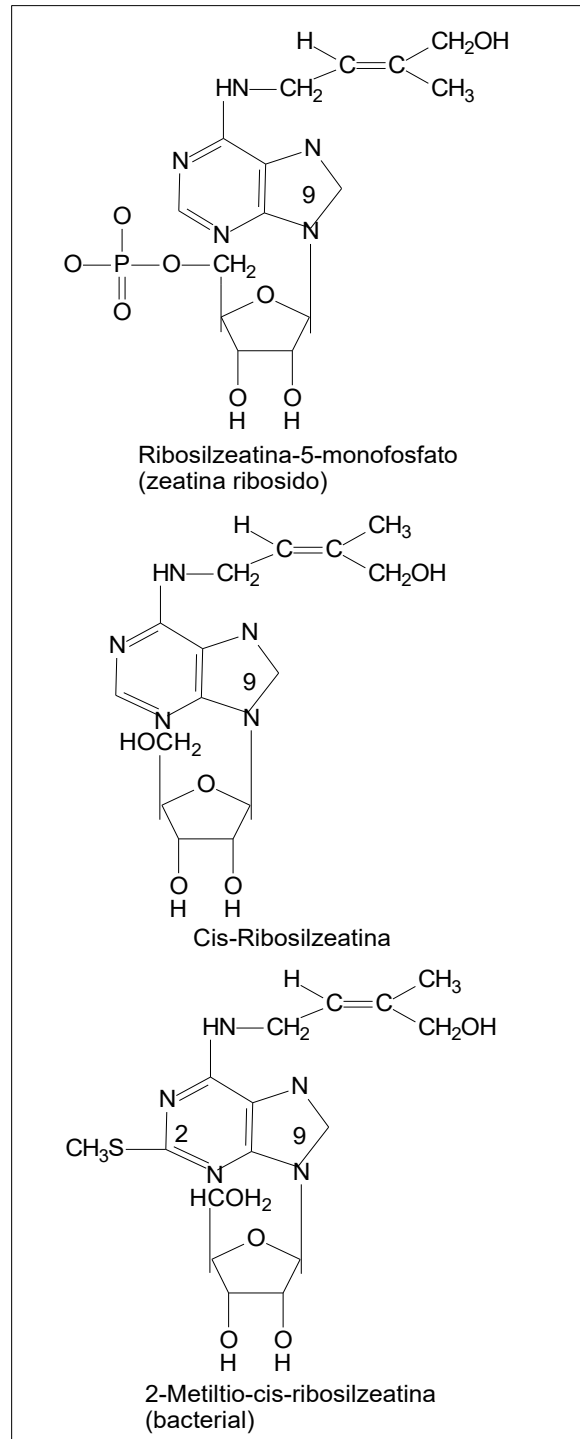


FIGURA 1.2 ESTRUCTURA MOLECULAR DE CITOQUININAS NATURALES PROCEDENTES DE BACTERIAS

1.2.2 Métodos para detectar citoquininas

Moléculas de origen natural con actividad citoquinínica pueden ser detectadas e identificadas por una combinación de bioensayos y métodos físicos. La introducción de métodos de purificación de inmunoafinidad combinada con cromatografía líquida y espectrometría de masas, junto con el uso de citoquininas marcadas isotópicamente como estándares internos, se han convertido en importantes avances en la medición de citoquininas endógenas.

Históricamente, el bioensayo fue el único método disponible para la identificación de moléculas que actúan como citoquininas. Bioensayos de proliferación celular utilizando el tejido de la médula del tabaco o raíz principal de zanahoria siguen siendo importantes debido a la capacidad de estos tejidos para iniciar y mantener la proliferación celular que es proporcional a la concentración de la actividad citoquinínica en un extracto, siempre y cuando el extracto no contenga inhibidores del crecimiento. Además, algunos callos de tabaco y soja continuamente cultivados que no pueden crecer en el cultivo sin citoquinina han sido utilizados para los bioensayos de citoquinina. Todos estos tejidos que requieren mostrar un

incremento lineal en el crecimiento al aumentar la concentración de citoquinina en un rango bastante amplio, a pesar de las altas concentraciones de citoquininas generalmente inhiben el crecimiento. Ver Figura 1.3.

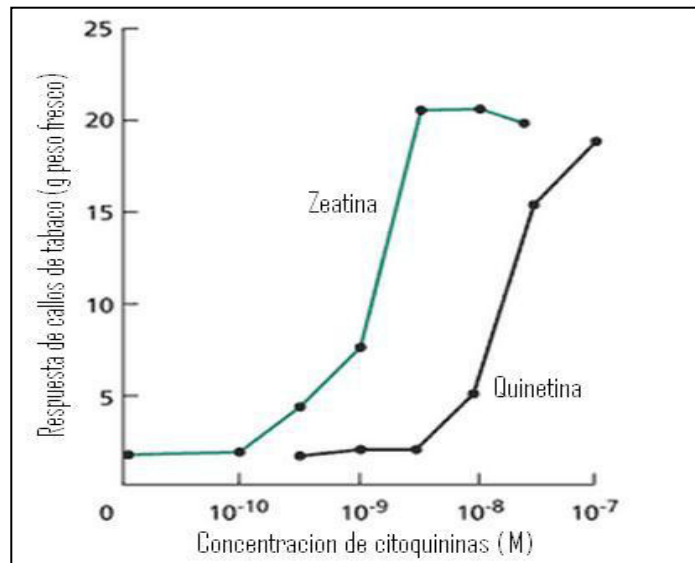


FIGURA 1.3 RELACIÓN DEL CRECIMIENTO DE TEJIDOS DE CULTIVO DE TABACO EN DEPENDENCIA DE ALGUNAS CITOQUININAS

Métodos inmunológicos son muy útiles para la identificación y cuantificación de citoquininas. Los investigadores pueden producir anticuerpos contra las citoquininas mediante la inyección de conejos o ratones con ribósidos conjugados con una proteína. Los anticuerpos monoclonales también se han generado que son altamente específicos para citoquininas individual. Estos anticuerpos pueden ser utilizados para

cuantificar la cantidad de una citoquinina en una muestra por medio de un radioinmunoensayo. Para el aislamiento de citoquininas, los extractos de plantas son fraccionados, generalmente por cromatografía líquida de alta resolución HPLC, las citoquininas se detectan en las fracciones y se miden por medio de un radioinmunoensayo de citoquinina.

Los anticuerpos de citoquininas también se pueden utilizar para aislar la hormona a partir de extractos por cromatografía de inmunoafinidad. Los métodos inmunológicos son una gran promesa para la identificación y cuantificación de citoquininas naturales, porque los anticuerpos son muy específicos y más sensibles que la mayoría de los bioensayos. Además, indican que estos métodos inmunológicos son muy rápidos [12].

1.2.3 Las citoquininas promueven el movimiento de los nutrientes

Las citoquininas influyen en el movimiento de nutrientes a las hojas desde otras partes de las plantas, un fenómeno conocido como movilización de nutrientes inducida por citoquininas. Este proceso se demostró cuando se aportaron a una clase de plantas nutrientes (aminoácidos, azúcares, etc.) marcados con

radioisótopos, después de que una hoja, o una parte de la hoja, fue tratada con una citoquinina. Sometiendo toda la planta a una autoradiografía, se determinó el patrón de movimiento y los lugares de acumulación de los nutrientes marcados.

Experimentos de este tipo han demostrado que los nutrientes se transportan y acumulan preferentemente en los tejidos tratados con citoquininas. Se ha comprobado que la hormona provoca la movilización de los nutrientes creando una relación fuente-sumidero ya que los nutrientes son transportados por el floema desde el sitio de producción (la fuente) al sitio de utilización (el sumidero). Puede que, por el tratamiento con la hormona, se haya estimulado el metabolismo del área tratada, de manera que los nutrientes se mueven hacia ella. Sin embargo, no es necesario que el nutriente sea metabolizado en las células fuente, ya que las citoquininas también movilizan sustratos análogos no metabolizados [5].

En la Figura 1.4 se muestran los efectos de la citoquinina quinetina en el movimiento de un aminoácido en plántulas de pepino. Se aplicó un aminoácido marcado que no podía ser metabolizado, el ácido aminoisobutírico como se muestra en las

manchas discretas en los cotiledones de la derecha de cada una de las plántulas.

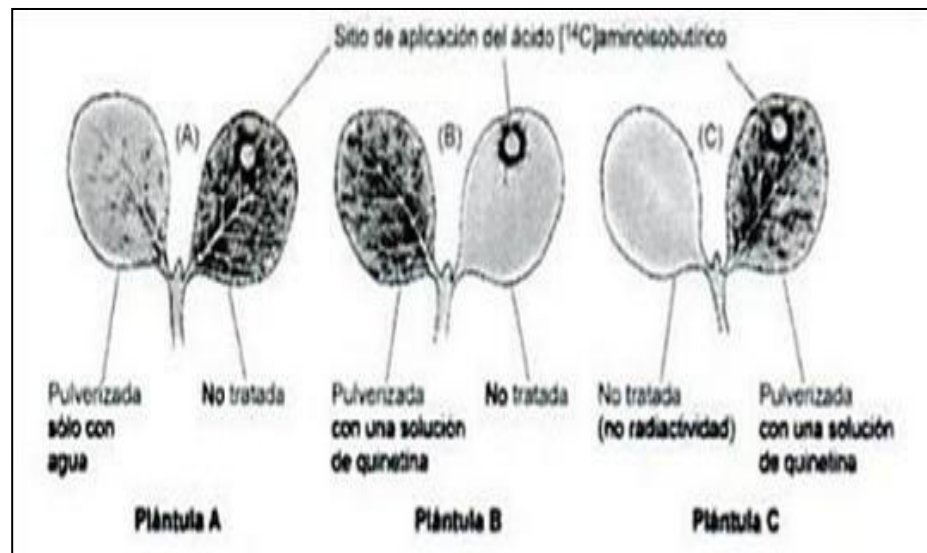


FIGURA 1.4 EFECTO DE LA QUINETINA EN EL MOVIMIENTO DE UN AMINOÁCIDO EN PLANTULAS DE PEPINO

En la plántula A, el cotiledón izquierdo se pulverizó con agua como control. El cotiledón izquierdo de la plántula B y el cotiledón derecho de la plántula C se pulverizaron con una solución que contenía quinina 50 mM. El punteado oscuro representa la distribución del aminoácido radiactivo después de ser revelado por autoradiografía.

Los resultados demuestran que el cotiledón tratado con citoquininas se convierte en sumidero de nutrientes. No obstante, se mantiene la radioactividad en el cotiledón en el que

se aplicó el aminoácido cuando el cotiledón marcado se trata con quinetina (plántula C). Ver Figura 1.4.

1.2.4 Las citoquininas promueven el desarrollo de los cloroplastos

Aunque las semillas pueden germinar en la oscuridad, la morfología de plántulas que crecen en oscuridad es muy diferente de las plántulas que crecen con luz. El hipocotilo y los entrenudos de las plantas etioladas (plantas que crecen en la oscuridad) son más largos, los cotiledones y las hojas no se expanden y los cloroplastos no maduran. A pesar que no maduran como cloroplastos, los proplastos de plántulas que han crecido en oscuridad generan etioplastos, que no sintetizan clorofila ni la mayoría de las proteínas estructurales necesarias para la formación del sistema tilacoidal de los cloroplastos de la maquinaria fotosintética. Cuando las plántulas germinan en presencia de luz, los cloroplastos maduran directamente desde los proplastos presentes en el embrión, pero los etioplastos también pueden madurar a cloroplastos cuando las plantas etioladas se exponen a luz.

Si las hojas etioladas se tratan con citoquininas antes de ser

iluminadas forman cloroplastos, por lo tanto la clorofila y los enzimas fotosintéticos se sintetizan a una velocidad más elevada al ser iluminadas.

Estos resultados sugieren que las citoquininas, junto con otros factores como la luz, la nutrición y el desarrollo, regulan la síntesis de las proteínas y pigmentos fotosintéticos. La capacidad de las citoquininas para aumentar la desetiolización de las plántulas que han crecido en oscuridad se mimetiza por ciertas mutaciones que dan lugar a una sobreproducción de citoquininas [5].

1.2.5 Las citoquininas promueven la expansión celular en hojas y cotiledones

La promoción de la elongación celular por citoquininas se observa mucho más claramente en los cotiledones de las dicotiledóneas con cotiledones carnosos, como en mostaza, pepino y girasol. Los cotiledones de estas especies se expanden durante el crecimiento de la plántula como consecuencia de la elongación celular. El tratamiento con citoquininas promueve una expansión celular adicional, ya que no aumenta el peso seco de los cotiledones tratados.

Los cotiledones carnosos se expanden mucho más cuando las plántulas crecen en presencia de luz (en lugar de hacerlo en la oscuridad) y las citoquininas promueven el crecimiento de los cotiledones tanto en plántulas que han crecido en presencia de luz como las que lo han hecho en oscuridad.

Los resultados del experimento que se describen en la Figura 1.5 muestran que los efectos de la luz y de la citoquinina son aditivos que promueven la expansión celular en cotiledones. T_0 representa las plántulas germinantes de rábano antes que se iniciara el experimento. Los dos cotiledones separados de las plántulas fueron incubados durante 3 días (T_3) con luz o sin ella y con o sin 2.5 mM de zeatina. En ambos casos, los cotiledones que fueron tratados con zeatina se expandieron mucho más que los controles, ya estuvieran crecidos en oscuridad o con luz,

Como en el crecimiento inducido por auxinas, el crecimiento promovido por citoquininas en cotiledones de rábano está asociado con un aumento de la extensibilidad mecánica de las paredes celulares. Sin embargo, la despolimerización inducida por las citoquininas no va acompañada de la salida de protones. Ni las auxinas ni las giberelinas promueven la expansión celular

de los cotiledones [5].

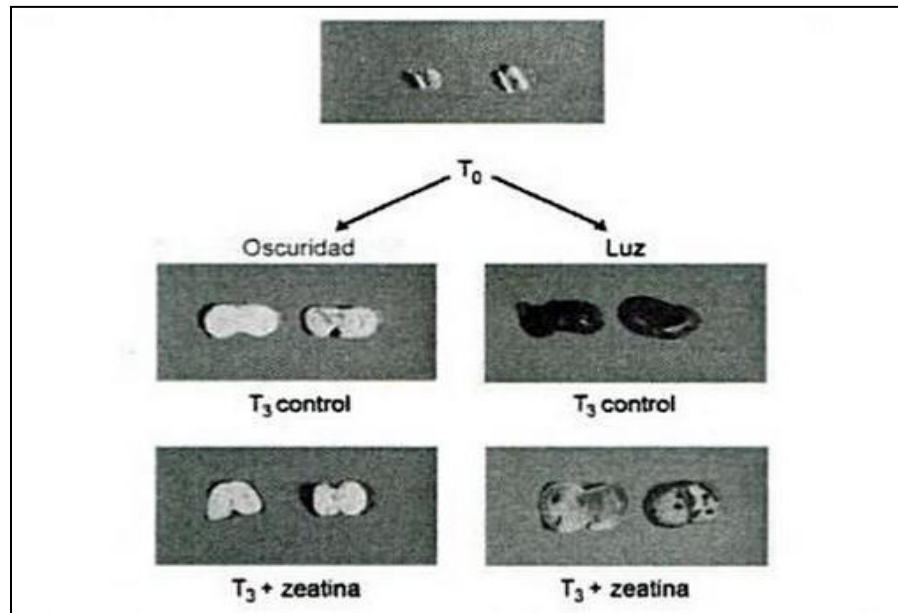


FIGURA 1.5 EFECTO DE LAS CITOQUININAS EN LA EXPANSIÓN DE COTILEDONES DE RÁBANO

1.2.6 Las citoquininas retrasan la senescencia

Otra función, al parecer independiente, de las citoquininas es la de prevenir la senescencia o envejecimiento de las hojas. En la mayoría de las especies de plantas, las hojas comienzan a volverse amarillas tan pronto como se extraen de la planta. Este amarilleamiento, el cual se debe a la pérdida de clorofila, puede prevenirse usando citoquininas.

Las hojas de cadillo (*Xanthium strumarium*), por ejemplo, cuando son arrancadas y dejadas en agua del grifo, se vuelven

amarillentas en el término de unos 10 días. Si se añade una pequeña cantidad de quinetina (10 mg por litro) al agua, se conserva gran parte de la clorofila y, en consecuencia, la apariencia fresca de la hoja. Si las hojas arrancadas son rociadas con soluciones de quinetina, las zonas mojadas permanecen verdes, mientras que el resto de la hoja se amarillea. No obstante, si la hoja rociada con citoquininas contiene aminoácidos radiactivos, se puede ver que los aminoácidos emigran hacia las zonas que han sido tratadas con citoquininas.

Tales estudios, que han sido llevados a cabo sobre rábanos y otras plantas, propician la hipótesis de que el envejecimiento en las hojas, y probablemente en otras partes de la planta, resulta del progresivo despidido de fragmentos de ADN y en la síntesis de proteínas, permitiendo así que continúe la síntesis de enzimas y la producción de otros compuestos tales como la clorofila [11].

1.3 Trans-Zeatina, citoquinina natural

Varios años después de descubrirse la quinetina, en extractos de endospermo inmaduro de maíz (*Zea mays*) existía una sustancia que

tenía el mismo efecto biológico que una quinina. Esta sustancia estimulaba a las células maduras a dividirse cuando era añadida al medio de cultivo junto con una auxina. En 1973 se aisló la molécula responsable de esta actividad, se la identificó como la trans-6-(4-hidroxi-3-metilbut-2-enilamino)purina, y se la llamó zeatina. En la Figura 1.6 podemos observar la estructura de la molécula de trans-zeatina.

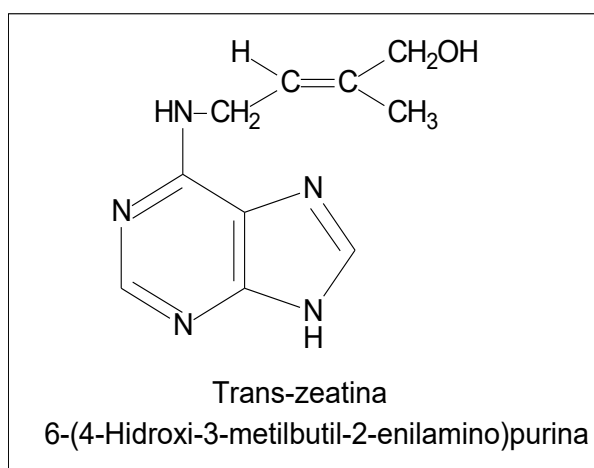


FIGURA 1.6 ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA TRANS-ZEATINA

La estructura molecular de la zeatina es similar a la de la quinina. Las dos moléculas son derivados de la adenina o aminopurina. Aunque tienen cadenas laterales diferentes, en ambos casos la cadena lateral está unida al nitrógeno 6 de la aminopurina. Como la cadena lateral de la zeatina tiene un doble enlace, puede existir en la combinación cis o trans. Ver Figura 1.7.

En las plantas superiores, la zeatina libre está presente en las configuraciones cis y trans, siendo ambas formas interconvertibles por la zeatina isomerasa. Aunque la forma trans es mucho más activa en los ensayos biológicos, la forma cis también tiene funciones importantes, dado que se encuentra en niveles elevados en una gran cantidad de especies vegetales y en determinados tejidos. Se ha clonado un enzima, la glucosil transferasa específica de la cis-zeatina, lo que apoya la función biológica de esta isoforma de la zeatina.

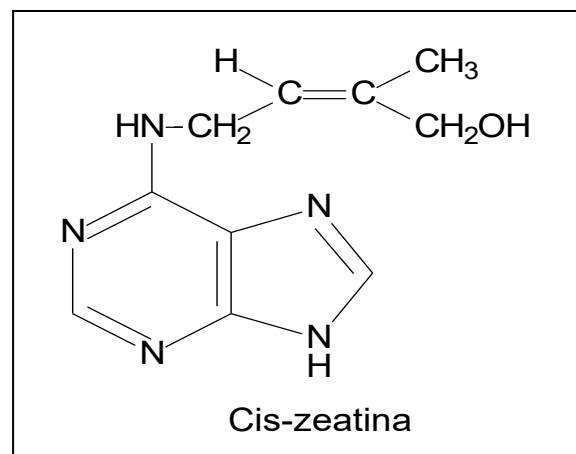


FIGURA 1.7 ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA CIS-ZEATINA

Desde su descubrimiento en el endospermo inmaduro del maíz, se ha encontrado zeatina en muchas plantas y en algunas bacterias. La zeatina es la citoquinina predominante en las plantas superiores, pero en muchas plantas y otras especies bacterianas se han aislado

otras aminopurinas sustituidas que son activas como citoquininas. Estas aminopurinas se diferencian de la zeatina en la naturaleza de la cadena lateral anclada al nitrógeno 6 o en el anclaje de la cadena lateral del carbono 2.

La trans-zeatina al igual que la mayoría de las citoquininas se define como un compuesto que tiene actividades biológicas muy importantes, entre estas se incluye la capacidad de: inducir la división celular en el tejido calloso en presencia de auxinas, promover la formación de yemas o raíces a partir de cultivos callosos cuando se encuentran en una proporción molar determinada, retrasar la senescencia de hojas y promover la expansión de los cotiledones en dicotiledóneas [5].

1.4 Bioinsumos y la agricultura orgánica

La agricultura orgánica es un sistema productivo alternativo al uso irracional y a la dependencia excesiva de fertilizantes sintéticos en los cultivos. Este tipo de agricultura propone reemplazar las sustancias químicas sintéticas con productos o desechos del mismo ecosistema.

Desde hace años, los agricultores han desarrollado diferentes

procesos para la elaboración de bioinsumos, los cuales son llamados de acuerdo a la manera en que se elaboran, el origen de los materiales e incluso el lugar en donde se usan. Dentro de los bioinsumos más comunes están las enmiendas orgánicas líquidas, purinas, té de estiércol, té de plantas, lixiviados de desechos descompuestos, entre otros [13].

Las enmiendas orgánicas líquidas son elaboradas a base de materiales de desecho como estiércol de animales, gallinaza, cascarilla de arroz, melaza de caña y residuos orgánicos de cosechas, entre otros. Estos bioinsumos son ricos en nitrógeno amoniacal, hormonas, vitaminas, aminoácidos y una gran cantidad de microorganismos benéficos que permiten regular el metabolismo vegetal y además son un buen complemento a la fertilización integral aplicada al suelo [14].

1.4.1 Importancia económica de los bioinsumos

La necesidad de disminuir la dependencia de productos químicos en los distintos cultivos, los cuales representan altos costos económicos y ambientales, está obligando a la búsqueda de alternativas sostenibles. Las enmiendas orgánicas líquidas representan una herramienta clave en la contribución para el

desarrollo de una agricultura ambientalmente amigable.

Trabajos de investigación, han permitido comprobar que tratamientos realizados con productos orgánicos líquidos, aplicados foliarmente a los cultivos, mejoran considerablemente los rendimientos al estimular el crecimiento, mejorar la calidad de los productos e incluso tener cierto efecto repelente contra las plagas [13].

Los beneficios que se logran mediante la incorporación de las prácticas orgánicas a la industria agrícola van más allá de los ambientales, durante la última década los productos orgánicos han adquirido una creciente importancia en el sector económico a nivel mundial.

En países como Austria y Suiza la agricultura orgánica ha llegado a representar el 10% y 7.8%, respectivamente, del sistema alimentario. En Estados Unidos, Francia, Japón y Singapur se han registrado tasas de incremento anuales superiores al 20%.

1.4.2 Propiedades y características de los materiales utilizados en la elaboración de bioinsumos

El éxito de un bioinsumo depende básicamente del método de preparación, calidad de las materias primas y la técnica de aplicación. A continuación se presentan algunas características de los materiales más comunes que se utilizan para la elaboración de bioinsumos.

Estiércoles

Los estiércoles pueden ser considerados abonos universales, la cantidad de estas sustancias varía según el tipo de animal que lo produce y de su dieta. En general, son abonos ricos en nitrógeno con la propiedad de estimular y mejorar la actividad microbiana del suelo. Algunos estiércoles contienen mayor cantidad de nitrógeno que otros, lo cual permite clasificarlos. El estiércol vacuno ocupa el primer lugar, seguido por el de cabra, caballo y conejo. Estos pueden ser aplicados a los cultivos en forma directa, por aspersion al follaje o granular en el suelo. Algunos contienen reguladores del crecimiento y posiblemente algunas sustancias con potencial antifúngico [15].

Broza de café

La pulpa y el mucílago constituyen los subproductos más abundantes del proceso de beneficiado húmedo del café y representan alrededor del 60% del peso del fruto fresco. La pulpa de café, que frecuentemente se desperdicia en las fincas y se convierte en un contaminante del agua de los ríos y quebradas, es un excelente recurso para elaborar abonos orgánicos [16].

Banano y plátano

La cantidad de desechos (raquis, hojas y pseudotallos) que se genera en cada cosecha es alta. Estos materiales son un recurso ideal para ser reciclado, ya que la cantidad de nutrientes y minerales que liberan son variados y elevados, en especial los niveles de potasio. Otro aspecto importante es la cantidad de agua presente en estos residuos, lo cual facilita su rápida descomposición y respectiva transformación en materia orgánica [16], [17].

Melaza

La adición de melaza, ácidos húmicos y otro tipo de azúcares al medio en descomposición tiene un efecto directo sobre la

proliferación de microorganismos anaeróbicos. Al existir bajos niveles de oxígeno en la solución se inhibe el crecimiento de dichos microorganismos [13].

1.4.3 Enmiendas orgánicas líquidas

Este tipo de bioinsumo consiste en soluciones de agua con bovinaza fresca y elementos nutritivos, reforzados algunas veces con melaza y otras con levadura, bajo un proceso anaeróbico por varios días para su posterior uso [18].

Existen diferentes formas de preparación de este bioinsumo, el tipo y las cantidades de materias primas utilizadas así como el tiempo, pH, humedad, entre otros factores, varían. Por lo general, el proceso de elaboración consta de las siguientes partes: recolección del estiércol, adición de agua, melaza y microorganismos, seguido por la mezcla homogénea de todos los ingredientes. Luego se procede a tapar herméticamente el envase durante un tiempo determinado para dar paso al proceso de fermentación.

Las enmiendas orgánicas líquidas pueden ser utilizadas para realizar aplicaciones foliares y aplicaciones al suelo.

Dependiendo del tipo de cultivo, estas pueden ser utilizadas puras o en diluciones.

Este tipo de bioinsumo es capaz de estimular el desarrollo de las plantas. Aumentar y fortalecer la base radical, actúa sobre el follaje incrementando su área, mejora la floración y activa el poder germinativo de las semillas.

Suquilanda asegura que las enmiendas orgánicas líquidas son una fuente orgánica de fitorreguladores, a diferencia de los nutrientes, en pequeñas cantidades son capaces de promover actividades fisiológicas y estimular el desarrollo de las plantas, sirviendo para actividades agronómicas como enraizamiento, desarrollo de la base foliar, mejora de la floración y activación del vigor y el poder germinativo de las semillas [17].

1.4.3.1 Calidad de las enmiendas orgánicas líquidas

La calidad en las enmiendas orgánicas líquidas, refiere factores tales como la madurez, minerales presentes y contenido de microorganismos, los cuales pueden variar de lote en lote debido a la diversidad de materia prima utilizada, como también la técnica de elaboración. La

naturaleza de los materiales, la relación carbono-nitrógeno y las condiciones físico químicas tales como temperatura, humedad, pH y presencia de oxígeno, son factores clave para la obtención del tipo de producto deseado y su calidad [13].

La efectividad de los biofertilizantes líquidos tanto sobre la supresión de enfermedades como en su capacidad nutricional, ha sido cuestionada por algunos investigadores debido a la falta de consistencia de los resultados obtenidos en estudios realizados hasta ahora [19].

1.4.3.2 Factores que afectan la calidad de las enmiendas orgánicas líquidas

Ingham asegura que la variabilidad de las enmiendas orgánicas líquidas puede ser eliminada mediante el control de los principales factores y parámetros involucrados en la elaboración de las mismas. Estos factores se mencionan a continuación:

Materia prima

El tipo de estiércol, seleccionado para la preparación de las enmiendas orgánicas líquidas ya sea fresco o sólido debe ser regulado.

Temperatura

Este parámetro es muy importante como indicador de la presencia de minerales y del crecimiento de microorganismos presentes en la solución. Altas temperaturas volatilizan los nutrientes mientras que las bajas temperaturas impiden el desarrollo de microorganismos.

La temperatura es un indicador del tipo de microorganismos que han proliferado durante el proceso de elaboración de este bioinsumo. El incremento de temperatura en el proceso de compostaje se debe al crecimiento de bacterias y hongos, lo que a su vez significa una reducción del nivel de oxígeno presente en el medio debido al inicio de un proceso anaeróbico [13].

Oxígeno

La presencia o ausencia de oxígeno es determinante en cada proceso de elaboración de bioinsumos. En el caso de los enmiendas orgánicas líquidas, el proceso se da en forma anaeróbica, mientras que los lixiviados y té de compost se producen en presencia de oxígeno. Bajos niveles de oxígeno en la elaboración de té pueden causar la proliferación de microorganismos anaeróbicos los cuales producirían materiales potencialmente tóxicos para las plantas [20]. Por otra parte, niveles excesivos de oxígeno en la elaboración de té pueden resultar negativos para microorganismos benéficos. Regularmente esto no sucede a menos que el fabricante adicione peróxido de hidrógeno u ozono al agua [13].

Aditivos

Como la melaza, los microorganismos deben estar presentes en cantidades necesarias. Es decir, el éxito en la obtención de este tipo de bioinsumo consistente, efectiva y de calidad depende del balance de los ingredientes presentes en la elaboración de la misma.

Los microorganismos son una combinación de microorganismos benéficos de origen natural. Los principales organismos que forman parte de este complejo son bacterias fototróficas, levaduras, bacterias productoras de ácido láctico y hongos de fermentación. Estos microorganismos al entrar en contacto con la materia orgánica secretan sustancias benéficas como vitaminas, ácidos orgánicos, minerales y sustancias antioxidantes [13]. La efectividad de estos bioinsumos estará, entonces, determinada por la presencia y calidad de microorganismos eficientes en la solución en proceso.

Tiempo

Este parámetro está relacionado en forma indirecta con la temperatura, a mayor temperatura menor el tiempo necesario para la obtención de los bioinsumos y viceversa. Algunas haciendas permiten que la fermentación de las enmiendas orgánicas líquidas ocurra durante 21 días, otras 30 días (en el caso de la Costa) y de más de 50 días para el caso de la Sierra [17].

Agua

Altas cantidades de sales, metales pesados, nitratos, cloro, carbonatos y sulfatos, así como aguas contaminadas con microorganismos patógenos de humanos, animales o plantas, no deben ser utilizados en la elaboración de bioinsumos. Un completo análisis de calidad de agua es necesario para la estandarización en la elaboración de enmiendas orgánicas líquidas.

pH

El pH del agua con el que se inicia el proceso debe estar entre 6.5 y 7.5 para favorecer al desarrollo de los microorganismos.

1.5 Maíz (*Zea mays*)

Este cereal, como el trigo y el arroz es uno de los más importantes del mundo, suministra elementos nutritivos a los seres humanos y a los animales, además es una materia prima básica de la industria de transformación, con la que se producen almidón, aceite y proteínas, bebidas alcohólicas, edulcorantes alimenticios y, desde hace poco, combustible. En la Figura 1.8 podemos observar el ejemplar de una mazorca de maíz semienvuelta en la hoja y aun en el tallo de la

planta.

Botánicamente, el maíz (*Zea mays*) pertenece a la familia de las gramíneas y es una planta alta dotada de un amplio sistema radicular fibroso. Se trata de una especie que se reproduce por polinización cruzada y la flor femenina (elote, mazorca, choclo o espiga) y la masculina (espiguilla) se hallan en distintos lugares de la planta.



FIGURA 1.8 EJEMPLAR DE MAZORCA DE MAÍZ

Las mazorcas, a menudo, una por tallo son las estructuras donde se desarrolla el grano, en un número variable de hileras (12 a 16), produciendo de 300 a 1000 granos, que pesan entre 190 y 300 g por cada 1000 granos. El peso depende de las distintas prácticas genéticas, ambientales y de cultivo. El grano constituye aproximadamente el 42 por ciento del peso en seco de la planta. El maíz es a menudo de color blanco o amarillo, aunque también hay variedades de color negro, rojo y jaspeado. Hay varios tipos de

grano, que se distinguen por las diferencias de los compuestos químicos depositados o almacenados en él [21].

1.5.1 Origen y difusión del maíz

El cultivo del maíz tuvo su origen en América Central, específicamente en México, de donde se difundió hacia el norte hasta Canadá y hacia el sur hasta Argentina. La evidencia más antigua de la existencia del maíz, de unos 7000 años de antigüedad, ha sido encontrada por arqueólogos en el valle de Tehuacán en México. Este cereal era un artículo esencial en las civilizaciones maya y azteca, tuvo un importante papel en su nutrición, festividades y creencias religiosas. La supervivencia del maíz más antiguo y su difusión se debió a los seres humanos, quienes recogieron las semillas para posteriormente plantarlas.

A finales del siglo XV, tras el descubrimiento del continente americano por Cristóbal Colón, el grano fue introducido en Europa a través de España. Se difundió entonces por los lugares de clima más cálido del Mediterráneo y posteriormente al norte Europa.

Pese a la gran diversidad de sus formas, al parecer todos los tipos principales de maíz conocidos hoy en día, clasificados como *Zea mays*, eran cultivados ya por las poblaciones autóctonas cuando se descubrió el continente americano. Por otro lado, los indicios recogidos mediante estudios de botánica, genética y citología apuntan a un antecesor común de todos los tipos existentes de maíz. La mayoría de los investigadores creen que este cereal se desarrolló a partir del teosinte, *Euchlaena mexicana Schrod*, cultivo anual que posiblemente sea el más cercano al maíz. Otros creen, en cambio, que se originó a partir de un maíz silvestre, hoy en día desaparecido. La tesis de la proximidad entre el teosinte y el maíz se basa en que ambos tienen 10 cromosomas y son homólogos o parcialmente homólogos [21].

Según datos de la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) la producción mundial de maíz ha crecido significativamente en los últimos años, esto debido a las mejoras genéticas, la introducción de técnicas de cultivo más eficientes y al uso de fertilizantes. En América del Sur las cifras de hectáreas cultivadas también demuestran el mismo incremento, sin embargo en otros países desarrollados como

Estados Unidos el rendimiento de producción por hectárea es mayor que en los países en vías de desarrollo [21].

La producción y comercialización de maíz es en el Ecuador una de las mayores fuentes económicas, pero a su vez constituye una potencial fuente generadora de residuos sólidos como tucas y hojas provenientes del mismo, los cuales se acumulan y contaminan el ambiente. Esto a su vez genera problemas de salud para los agricultores y sus familiares, creando una problemática social que debe ser tomada en cuenta. Por este motivo, es importante encontrar una solución que permita disminuir la acumulación de estos desechos sólidos y a su vez aprovecharlos con fines de investigación.

1.5.2 La planta de maíz

Se puede definir la planta del maíz como un sistema metabólico cuyo producto final es, en lo fundamental, almidón depositado en unos órganos especializados: los granos. Es una planta gramínea anual, de crecimiento rápido, hasta de 2,5 m de altura, con hojas largas y anchas en forma de tira, indígena de América del Sur, pero que hoy día se cultiva mucho en todo el mundo. Puede cultivarse en todos los climas donde los veranos

sean lo bastante largos y cálidos para permitir que el grano madure. Sin embargo, el maíz no puede resistir la helada.

El desarrollo de la planta se puede dividir en dos fases fisiológicas: la fase vegetativa y la fase de reproducción. En la primera se desarrollan y diferencian distintos tejidos hasta que aparecen las estructuras florales. Esta fase consta de dos ciclos: en el primero se forman las primeras hojas cuyo desarrollo es de forma ascendente, existe además producción lenta de materia seca y finaliza con la diferenciación tisular de los órganos de reproducción. En el segundo ciclo se desarrollan las hojas, los órganos de reproducción y finaliza con la emisión de los estigmas. La fase de reproducción inicia con la fertilización de las estructuras femeninas que se diferenciarán en espigas y granos. La etapa inicial de esta fase se caracteriza por el incremento de peso en las hojas y otras partes de la flor, mientras que durante la segunda etapa el peso de los granos aumenta con rapidez.

La planta desarrolla características y diferencias morfológicas en las fases fisiológicas como consecuencia de la selección natural y de la domesticación. Algunos genotipos se han

adaptado a zonas ecológicas concretas, desarrollando características particulares, como por ejemplo la sensibilidad con respecto a la duración del día y a la temperatura, que limitan su adaptabilidad a zonas con diferente latitud y altitud. Por tanto, se deben realizar programas de mejora en las zonas en que se van a cultivar las variedades mejoradas, aunque esto no significa que se puedan obtener características genéticas específicas.

La morfología o arquitectura de la planta también ha sido objeto de presiones de evolución que han dado lugar a una gran variabilidad del número, la longitud y la anchura de las hojas, así como la altura de las plantas, los lugares en que aparecen las mazorcas, el número de éstas por planta, los ciclos de maduración, los tipos de granos y el número de hileras de granos, entre otras muchas características [21].

1.5.3 Aplicaciones del maíz

El maíz tiene tres aplicaciones posibles: alimento, forraje y materia prima para la industria.

Como alimento, se puede utilizar todo el grano, maduro o no, o bien se puede elaborar con técnicas de molienda en seco para obtener un número relativamente amplio de productos intermedios, como por ejemplo sémola de partículas de diferentes tamaños, sémola en escamas, harina y harina fina, que a su vez tienen un gran número de aplicaciones en una amplia variedad de alimentos.

En lo que respecta a su aplicación como forraje, en los países desarrollados más del 60 por ciento de la producción se emplea para elaborar alimentos compuestos para aves de corral, cerdos y rumiantes. Esto debido a su menor costo y a su capacidad de mejorar la eficiencia de la transformación de los alimentos.

Los subproductos de la molienda en seco son el germen y la cubierta seminal, el primero se utiliza para obtener aceite comestible de elevada calidad mientras que la cubierta seminal, o pericarpio, se emplea fundamentalmente como alimento, aunque en los últimos años ha despertado interés como fuente de fibra dietética. La molienda húmeda es un procedimiento que se utiliza fundamentalmente en la aplicación industrial del maíz, con este proceso se produce almidón de maíz y subproductos

entre los que figura el gluten que se utiliza como ingrediente alimenticio, mientras que el germen de maíz elaborado para producir aceite da como subproducto harina de germen que se utiliza como alimentos compuestos para aves de corral, cerdos y rumiantes.

El aumento de los precios del petróleo ha impulsado la intensificación de las investigaciones sobre la fermentación del maíz para producir alcohol combustible, el cual tiene un uso muy difundido en algunas partes de los Estados Unidos. Con maíz fermentado se elaboran también algunas bebidas alcohólicas [21].

1.5.4 Aprovechamiento de los residuos de maíz

El cultivo del maíz aumenta día tras día, en consecuencia quedan grandes cantidades de residuos después de aprovechado el grano; estos se utilizan de la manera siguiente:

El rastrojo, formado por los troncos de los tallos y las raíces, es usado como abono en el mismo terreno de cultivo. Las hojas y los tallos verdes son empleados para forraje; y antiguamente los mayas extraían miel de estos tallos. Las hojas y los tallos secos

sirven también como alimento forrajero y para fabricar papel.

Las brácteas u hojas de la mazorca sirven de envoltura como en el tamal y la panela; bruñido, para hacer cigarrillos; reducido a tiras muy delgadas, para rellenar cojines y colchones; para lavar bancos, mesas y banquetas.

La tusa se usa como base para extraer diversos productos químicos, como por ejemplo, furfural y xilosa. Además se utiliza como tapa en botellas y otros envases; molido se emplea como forraje, principalmente si se mezcla con melaza; también se usa como combustible.

El cabello de la tusa o estigmas del maíz se utilizan como diurético, aunque hay quienes suponen que es perjudicial su uso. Generalmente se hace una decocción con 30 gramos de estigmas en un litro de agua, para tomar durante un día.

En Estados Unidos, donde el cultivo del maíz se encuentra muy desarrollado, la médula de las cañas se emplea para rellenar los espacios vacíos de los buques y para fabricar explosivos [22].

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo de la presente investigación se ejecutó en los laboratorios de Bioproductos y Biología Molecular del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Campus “Gustavo Galindo” ubicado en el Km. 30.5 de la vía Perimetral de la ciudad de Guayaquil, Ecuador. Los materiales y estrategia metodológica que se utilizaron se detallan a continuación:

2.1 Materiales

2.1.1 Muestras de Bioinsumos

Para la realización de este trabajo se utilizó enmiendas orgánicas líquidas previamente elaboradas por investigadores del Programa de Maestría en Biotecnología Agrícola (PMBA), su preparación fue realizada con diferentes inóculos para cada bioinsumo mediante descomposición anaeróbica de los mismos. Estos bioinsumos fueron aplicados en haciendas del cantón Daule, provincia del Guayas y resultaron ser los más eficientes en campo según los datos reportados.

La Tabla I muestra la codificación utilizada para cada una de las formulaciones de enmiendas orgánicas líquidas liofilizadas que se usaron para el desarrollo de esta investigación con su respectiva composición.

TABLA I

Código	Composición
EAB1	Contenido ruminal
EAB2	Estiércol bovino
EAB3	Microorganismos comerciales

CODIFICACIÓN Y COMPOSICIÓN DE LAS ENMIENDAS ORGÁNICAS LIQUIDAS

2.1.2 Muestras de maíz

Las muestras de tusa, hojas y granos de maíz que se usaron para el desarrollo de esta investigación se obtuvieron a partir de mazorcas de maíz tierno o choclo recolectadas en un centro de abastos de la ciudad de Guayaquil en el mes de marzo del año 2011. En la Tabla II se presenta la codificación y composición utilizada para cada muestra.

TABLA II

Código	Composición
EAMT	Tusa de maíz
EAMH	Hoja de maíz
EAMG	Grano de maíz

CODIFICACIÓN Y COMPOSICIÓN DE LAS MUESTRAS DE MAÍZ (ZEA MAYZ)

2.1.3 Reactivos

Los reactivos requeridos para los distintos análisis se detallan en la siguiente tabla:

TABLA III

Reactivos	Análisis
Acetato de etilo (99.9%)	Extracción líquido-líquido
Acetonitrilo (grado HPLC)	Cromatografía TLC
Ácido acético glacial (100.0%)	Extracción de trans-zeatina, cromatografía HPLC
Ácido clorhídrico (37%)	Preparación de solución de trans-zeatina
Ácido sulfúrico (96%)	Ajuste de pH
Agua destilada	Todos los análisis
Butilhidroxitolueno	Extracción de trans-zeatina
Etanol Absoluto	Cromatografía TLC
Metanol anhidro (99.8%)	Extracción de trans-zeatina,
Metanol (grado HPLC)	Cromatografía TLC
Trans-zeatina (97%)	Cromatografía TLC, Cromatografía HPLC

R

REACTIVOS PARA EL AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE TRANS-ZEATINA

2.1.4 Equipos

Los equipos que se utilizaron para la extracción, identificación y cuantificación de trans-zeatina se describen a continuación:

La extracción de humedad de las muestras se llevó a cabo en una estufa marca Memmert, con cámara de flujo de aire.

La determinación de los pesos para las muestras y los diferentes reactivos sólidos se realizaron en una balanza analítica digital marca Mettler Toledo, con una capacidad de carga máxima de 210 g.

El almacenamiento de los extractos líquidos se llevó a cabo en un refrigerador marca Indurama, temperatura mínima de -17 °C. Además se utilizó un desecador de vidrio con cama desecante de gel de sílice para mantener las muestras libres de humedad luego del proceso de secado.

Previo al proceso de maceración se realizó agitación constante de cada una de las muestras en una Zaranda Shaker Marca New Brunswick Scientific, Model Classic 40.

En el proceso de filtración por gravedad quedan sólidos que no se logran separar de los extractos líquidos. Para este propósito se llevó las muestras a una centrífuga marca Thermo Scientific.

Para recuperar el disolvente usado en la extracción y concentrar los extractos líquidos se utilizó un rotavaporador marca Heidolph, Laborota 4100 series.

La evaporación de trazas de disolventes de cada una de las muestras se efectuó un equipo de baño maría marca VWR Scientific Products, temperatura máxima de 100°C.

El ajuste de pH con ácido sulfúrico se hizo en un pHmetro Marca Oakton, modelo Ion 510 con pH/Ion/mV/temperature meter.

La cromatografía TLC se realizó en una cámara de vidrio de 29x29cm. Para el revelado de las placas se utilizó un plato calentador marca Ikamag® RCT basic. El equipo posee 300 °C de temperatura máxima.

La cuantificación de los extractos se realizó en un equipo con Sistema: HPLC-UV, marca Hewlett Packard, modelo: Series 1050. Equipado con: inyector automático, bomba cuaternaria, Detector UV (ABI 783A Programmable). Los datos fueron interpretados con el Software Peak Simple 3.29.

2.2 Metodología

A continuación se presenta la estrategia metodológica seguida para el desarrollo de esta investigación. Ver Figura 2.1.

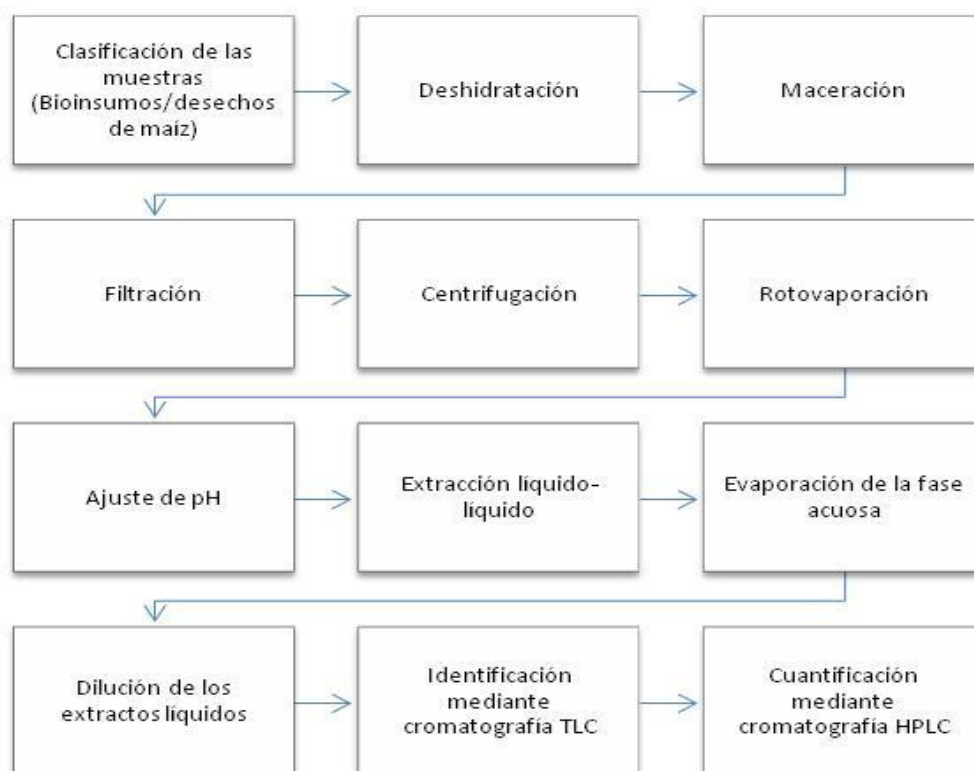


FIGURA 2.1 DIAGRAMA DE BLOQUES PARA EL AISLAMIENTO,

IDENTIFICAIÓN Y CUANTIFICACION DE TRANS-ZEATINA EN BIOINSUMOS, GRANOS Y DESECHOS DE MAIZ (ZEA MAYS)

Para el aislamiento de trans-zeatina se tomó como referencia los procedimientos descritos por Olivella *et al.* (2001) y Ortiz *et al.* (2008). La identificación mediante cromatografía TLC se realizó mediante el protocolo descrito por García-Florez *et al.* (2009) y finalmente para la cuantificación en cromatografía HPLC se utilizó el protocolo descrito por Ortiz *et al.* (2008), [6], [7], [8].

2.2.1 Curva de calibración de trans-zeatina

Para realizar la curva de calibración se prepararon varias diluciones del patrón de trans-zeatina marca Sigma con No. CAS. 1637-39-4. Estas diluciones con concentración conocida se leyeron en el equipo HPLC a condiciones dadas (ver sección 2.2.1.2) para determinar los picos cromatográficos.

Con los picos de cada una de las diluciones y sus correspondientes áreas se generó una gráfica Concentración vs. Área bajo el pico de trans-zeatina con la cual, luego de un análisis matemático en Microsoft Excel 2010 se consiguió determinar la concentración de cada una de las muestras, tanto de enmiendas orgánicas líquidas como muestras de maíz.

2.2.1.1 Disolución del patrón de trans-zeatina

La preparación del patrón de trans-zeatina se realizó mediante disolución del patrón sólido en una solución de ácido clorhídrico 0.1N. Se preparó una solución concentrada de 500 ppm la cual se llevó a diferentes diluciones.

TABLA IV

Código	Patrón trans-zeatina (ppm)
TZ-500ppm	500
TZ-400ppm	400
TZ-200ppm	300
TZ-100ppm	100
TZ-50ppm	50

CODIFICACIÓN DE LAS DILUCIONES DEL PATRÓN DE TRANS-ZEATINA

La Tabla IV detalla la codificación utilizada para las diluciones del patrón y sus respectivas concentraciones, que se usaron para el desarrollo de esta investigación.

2.2.1.2 Cromatografía HPLC del patrón de trans-zeatina

Para la cuantificación del patrón de trans-zeatina y sus respectivas diluciones por cromatografía líquida de alta resolución HPLC se utilizó el equipo HPLC-UV marca

Hewlett Packard equipado con una columna C18 250mm x 4mm (5 μ m), manipulando como fase móvil metanol-agua (40:60) acidulada (ácido acético 5%) con una velocidad de flujo de 0.8 mL.min⁻¹, longitud de onda de 280 nm y tiempo de retención de 15 minutos. El volumen de inyección fue de 20 μ L para el patrón y cada una de las diluciones.

2.2.2 Aislamiento, identificación y cuantificación de trans-zeatina

Para el aislamiento de trans-zeatina en granos, desechos de maíz y enmiendas orgánicas líquidas se llevó a cabo una metodología establecida a partir de los procedimientos descritos por Olivella *et al.* (2001) para la determinación de ácido abscísico, ácido indolacético, zeatina y ribósido de zeatina en hojas desarrolladas de *Gerbera jamesonii cv Bolus* ; y Ortiz *et al.* (2008) para la comparación cuantitativa de ácido abscísico y citoquininas en la Tuberización de *Solanum tuberosum L.* y *Solanum phureja Juz. et Buk*, [6], [8].

Es importante mencionar que las muestras de maíz y enmiendas orgánicas líquidas fueron tratadas con los mismos procesos de aislamiento, identificación y cuantificación. Sin

embargo, las muestras se deshidrataron de formas distintas previamente al proceso de aislamiento. Las muestras de maíz fueron secadas en estufa con flujo de aire a 60°C durante 5 horas mientras que las muestras de enmiendas orgánicas líquidas fueron liofilizadas.

2.2.2.1 Aislamiento de trans-zeatina en muestras de maíz y enmiendas orgánicas líquidas

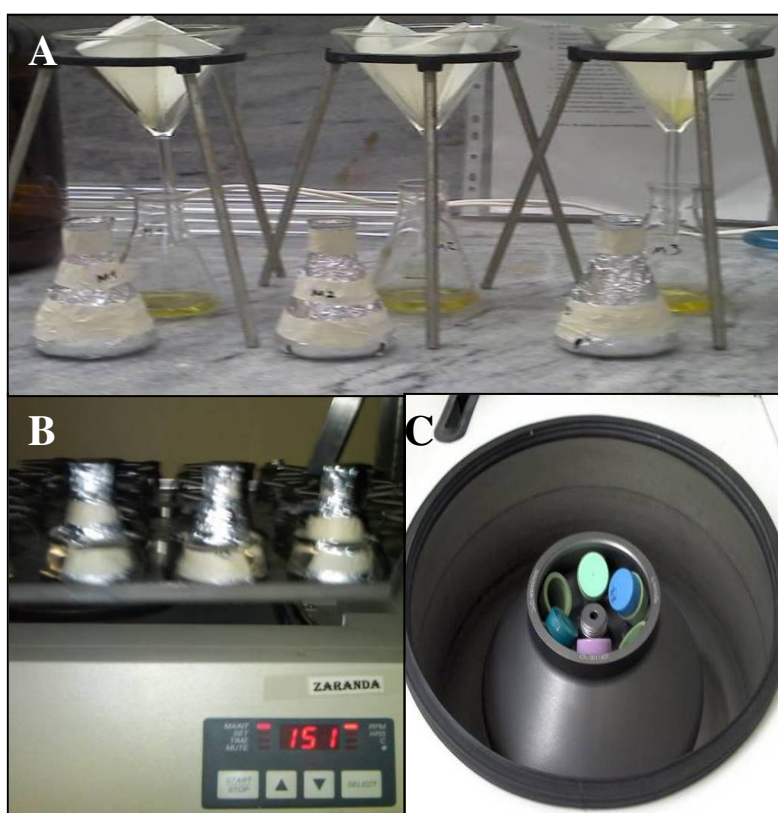


FIGURA 2.2 PROCESO DE EXTRACCIÓN DE TRANS-ZEATINA. A) AGITACIÓN EN ZARANDA; B) FILTRACIÓN POR GRAVEDAD; C) CENTRIFUGACIÓN. CIBE (ESPOL)

Para el aislamiento se efectuó un proceso de extracción mediante maceración de 0.5 g en peso seco de muestras de bioinsumos y 3.0 g en peso seco de muestras de maíz. Este proceso incluye la adición de 50 mL de una solución metanol-ácido acético 0.2M (80:20) y 100 mg/mL de butilhidroxitolueno, durante 24 horas, en ausencia de luz y -17°C. Previo a las 24 horas de reposo las muestras se homogenizaron en una zaranda a 151 RPM, durante 1 hora. Ver Figura 2.2.

Posteriormente se llevó a filtración por gravedad para librar los extractos de partículas sólidas. Además, se centrifugó en tubos falcon de plástico a 5000 RPM y 5°C durante 10 minutos para la posterior sedimentación de otras partículas sólidas visibles en los extractos. Ver Figura 2.2.

Los extractos fueron concentrados en un rotovaporador a 50°C, 600 mmHg de vacío y 120 RPM recuperando así la mezcla de disolventes utilizada en el proceso de maceración. Ver Figura 2.3.

Luego se realizó ajuste de pH a cada uno de los extractos con ácido sulfúrico 1N y además separación de pigmentos con acetato de etilo mediante extracción líquido-líquido. Se recuperó el extracto acuoso de la decantación y se llevó a baño María durante 48 horas y 70°C para la eliminación de trazas de disolventes. Ver Figura 2.3.

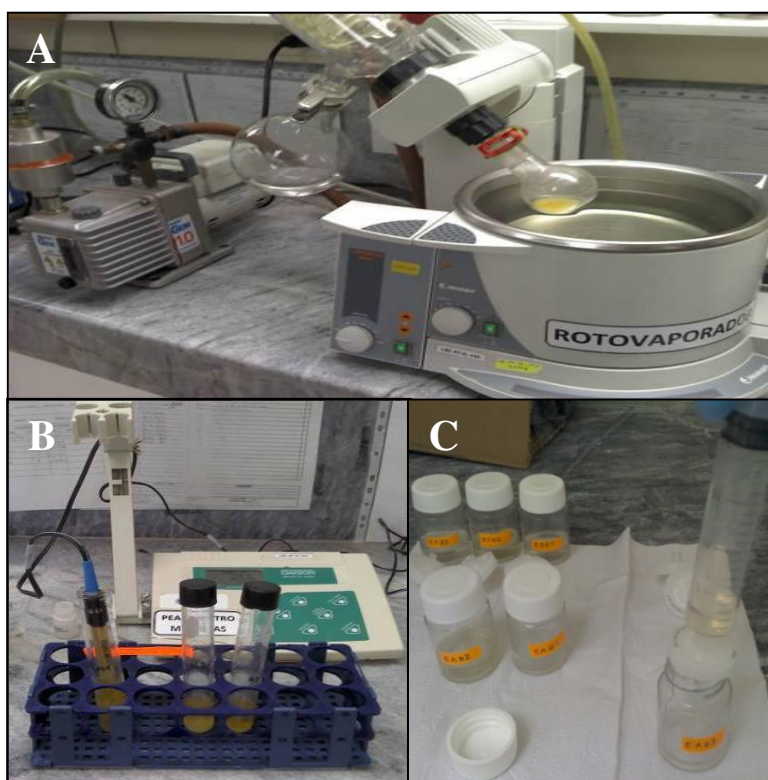


FIGURA 2.3 PROCESO DE EXTRACCIÓN DE TRANS-ZEATINA. A) ROTOVAPORACIÓN DE LOS EXTRACTOS; B) AJUSTE DE pH; C) DILUCIÓN DE LOS EXTRACTOS. CIBE (ESPOL)

Finalmente los extractos líquidos fueron diluidos en una solución de metanol-ácido acético (30:70) y purificados con filtros de Syringe 25 mm y 45 µm Nylon menbrane. Para posteriormente ser identificados por cromatografía TLC y cuantificados mediante cromatografía HPLC. Ver Figura 2.3.

2.2.2.2 Identificación de trans-zeatina en muestras de maíz y enmiendas orgánicas líquidas mediante cromatografía TLC

La cromatografía TLC se efectuó en una cámara de vidrio de 28x28 cm. Se utilizó cromatoplasmas de aluminio Merck 60 F254 TLC de 10x10 cm en la que se colocó 20 µL de cada una de las muestras y el patrón de trans-zeatina. Ver Figura 2.4.

Se utilizó como fase móvil una mezcla de metanol-acetonitrilo (80:20). Las cromatoplasmas se dejaron secar a 40°C durante 1 hora, se rociaron con una solución de etanol-ácido sulfúrico (95:5) como solución reveladora y se identificaron utilizando luz ultravioleta luego de 72

horas.



**FIGURA 2.4 CÁMARA DE CROMATOGRAFÍA.
CIBE (ESPOL)**

Es importante mencionar que el patrón fue diluido en metanol grado HPLC a diferencia del patrón utilizado para la cromatografía HPLC.

2.2.2.3 Cuantificación de trans-zeatina en muestras de maíz y enmiendas orgánicas líquidas mediante cromatografía HPLC

Para la cuantificación de trans-zeatina por cromatografía HPLC de las muestras y cada una de las réplicas se empleó el mismo equipo y condiciones de trabajo descritas en la sección 2.2.1.2.

Lo valores obtenidos de la cromatografía representan la concentración de los viales en los cuales se colocó una fracción del extracto final. Para poder determinar la concentración de las muestras considerando el peso seco de la muestra inicial y el volumen total del extracto final se realizó análisis matemáticos utilizando la ecuación de la curva de calibración en Microsoft Excel 2010 para cada una de las muestras y sus repeticiones. Ver Apéndices A1 y A2.

2.2.3 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de cada una de las muestras fueron sometidos a análisis de varianza y Test de Tukey para comparación de medias entre muestras con 5% de significancia, utilizando el programa estadístico InfoStat versión 2008. Ver Apéndices A3 y A4. Se obtuvo además la media, desviación estándar y el error estándar de cada una de las muestras de bioinsumos y maíz sobre 3 réplicas de cada muestra manejando Microsoft Excel 2010. Ver Apéndices A5 y A6.

CAPÍTULO 3

3. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

En este capítulo se detallan por medio de tablas, figuras y gráficos los resultados que se obtuvieron para la identificación y cuantificación de trans-zeatina en enmiendas orgánicas líquidas y muestras de maíz.

3.1 Identificación de trans-zeatina mediante cromatografía TLC

Los resultados para la identificación mediante cromatografía TLC demuestran la presencia de trans-zeatina en cada una de las muestras de bioinsumos y maíz. Sin embargo, en las cromatoplasas se puede detectar con claridad la presencia de otros compuestos, como en el caso de la tusa de maíz donde podemos observar en mayor cantidad otro compuesto. Ver Figura 3.1.

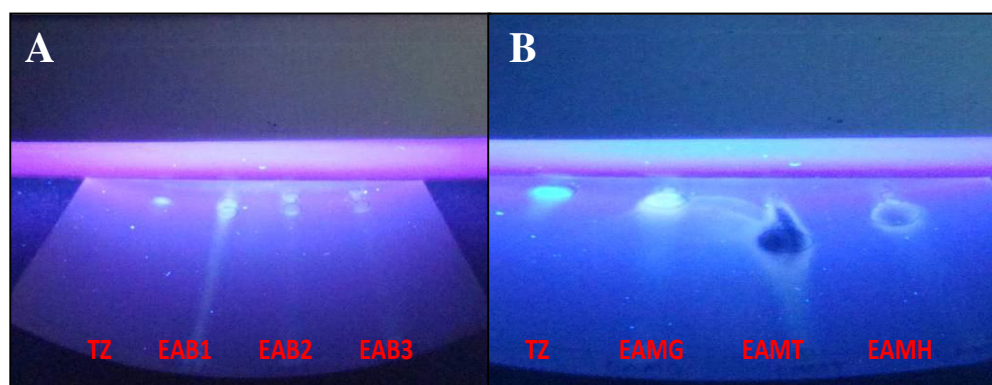


FIGURA 3.1 IDENTIFICACIÓN DE TRANS-ZEATINA CON LUZ UV. A) ENMIENDAS ORGÁNICAS LÍQUIDAS; B) MUESTRAS DE MAÍZ (ZEA MAYZ)

La mezcla de disolventes utilizada difiere a la descrita por García-Flórez *et al.* (2009), ya que los disolventes con las proporciones referenciadas no permitían identificar el compuesto isoprenoídico, de hecho se modificó estas cantidades para variar la polaridad de la fase móvil, pero no se obtuvieron resultados positivos. En el caso de los bioinsumos esta variación puede ser debida a la naturaleza de la muestra.

Los valores de Rf obtenidos para cada una de las muestras no han sido referenciados y nos permitieron identificar la presencia de un compuesto similar a la trans-zeatina, ya que los valores del patrón son aproximadamente iguales si se considera un error de ± 0.02 y ± 0.03 para bioinsumos y muestras de maíz respectivamente. Ver Tabla V.

TABLA V

Muestras		Rf
	trans-zeatina	0,748
Bioinsumos	EAB1	0,729
	EAB2	0,734
	EAB3	0,728
	trans-zeatina	0,833
Muestras de Maíz	EAMT	0,809
	EAMH	0,803
	EAMG	0,818

VALORES Rf OBTENIDOS DE LA CROMATOGRFÍA TLC

3.2 Curva de calibración de trans-zeatina

En la Gráfica 1 se puede observar la curva de calibración de trans-zeatina (curva gris). Esta se efectuó en Microsoft Excel 2010 con los datos de concentración y área bajo el pico del patrón de trans-zeatina en distintas diluciones. Para su realización se utilizó el software del equipo de cromatografía HPLC.

Los resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC para el patrón de trans-zeatina no han sido referenciados, a continuación se presentan el cromatograma del patrón con una concentración de 500 ppm empleando metanol-agua (40:60) acidulada (ácido acético 5%) y longitud de onda de 280 nm.

La Figura 3.2 expresa el pico del patrón trans-zeatina en el cromatograma, el mismo que posee un tiempo de retención de 2.850 minutos y un área bajo el pico de 3953.16.

Con cada dilución del patrón se obtuvieron diferentes valores de área bajo el pico y tiempos de retención relativamente cercanos. Los tiempos fueron de 2.683, 2.616, 2.766 y 2.783 minutos para las muestras del patrón con 400 ppm, 200 ppm, 100 ppm y 50 ppm de concentración respectivamente. Por lo tanto, cada pico

cromatográfico de las diferentes muestras analizadas se evaluará en el rango estimado entre 2.616 y 2.850 minutos. Los cromatogramas de las diferentes diluciones del patrón los podemos observar en los apéndices B1, B2, B3 y B4.

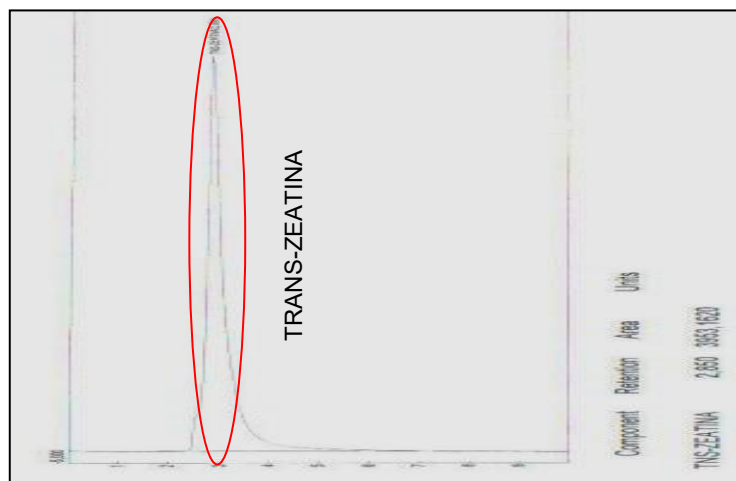


FIGURA 3.2 CROMATOGRAMA DEL PATRON TRANS-ZEATINA, 500 ppm

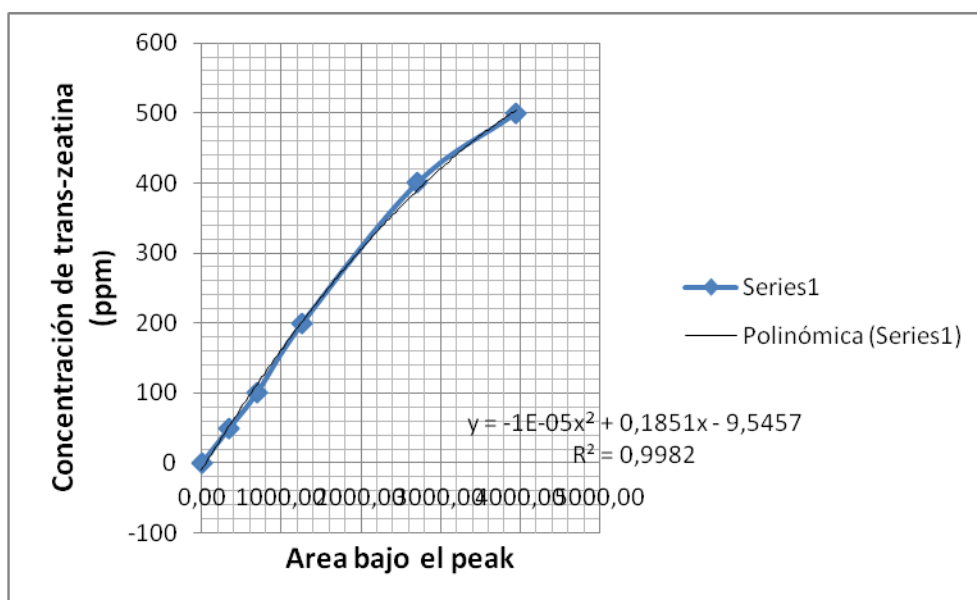
En la Tabla VI se presentan los valores de área bajo el pico de las diferentes diluciones del patrón de trans-zeatina con los que se graficó la curva de calibración.

TABLA VI

Concentración (ppm)	Área bajo el Pico
500	3953,16
400	2706,96
200	1264,02
100	688,95
50	342,31

RESULTADOS HPLC DEL PATRON DE TRANS-ZEATINA

Para mayor precisión de las concentraciones a obtener de cada una de las muestras, la curva de calibración resultó de un análisis de linealización donde se determinó un coeficiente de correlación $R^2 = 0.998$ con línea de tendencia polinómica de orden dos de la gráfica procedente de los datos iniciales (curva azul). Sin embargo, la ecuación de la curva de calibración sólo es válida para valores numéricos de área bajo el pico mayores o iguales que 51.74.



GRÁFICA 1. CURVA DE CALIBRACIÓN DE TRANS-ZEATINA

3.3 Cuantificación de trans-zeatina mediante cromatografía HPLC

Para el desarrollo de éste análisis se emplearía los extractos de trans-zeatina aislados a partir de los desechos de maíz (*Zea mays*) con la finalidad de dar utilidad a estos residuos. Sin embargo, debido a problemas económicos no se logró cumplir por completo con ésta

meta. La curva de calibración realizada a partir del patrón químico descrita en el inciso 3.2 con la que se validaría la curva realizada a partir de los extractos de los desechos de maíz (*Zea mays*) se utilizó para cuantificar trans-zeatina en las enmiendas orgánicas líquidas de producción local, otorgando así validez científica a los resultados obtenidos.

A pesar de no aprovechar los extractos de trans-zeatina correspondientes a los desechos de maíz (*Zea mays*) para efectuar el análisis cuantitativo de las enmiendas orgánicas líquidas, se logró establecer una metodología para el aislamiento y cuantificación de trans-zeatina en desechos de maíz (*Zea mays*) por métodos cromatográficos TLC y HPLC.

Los resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC para las muestras de bioinsumos y desechos de maíz (*Zea mays*) no han sido referenciados,

A continuación se presentan los cromatogramas de los extractos de bioinsumos y muestras de maíz empleando metanol-agua (40:60) acidulada (ácido acético 5%) como fase móvil.

La Figura 3.3 expresa el pico del extracto EAB11 en el cromatograma leído a 280 nm, se observan dos picos con tiempos de retención de 2.95 y 3.20 minutos. A pesar de que ninguno de los tiempos de retención establecidos se encuentra dentro del rango para el patrón, en la cromatografía TLC para esta muestra se observa claramente la presencia de trans-zeatina. Por lo tanto se eligió al pico con tiempo de retención 2.95 minutos y área bajo el pico de 83.99, ya que se encuentra en la vecindad del rango permitido si se considera un error aproximado de ± 0.1 minutos. Además, es importante mencionar que los tiempos de retención de las réplicas para ésta muestra son similares (2.766 minutos) y se encuentran dentro del rango determinado para el patrón. Ver Apéndices C1 y C2

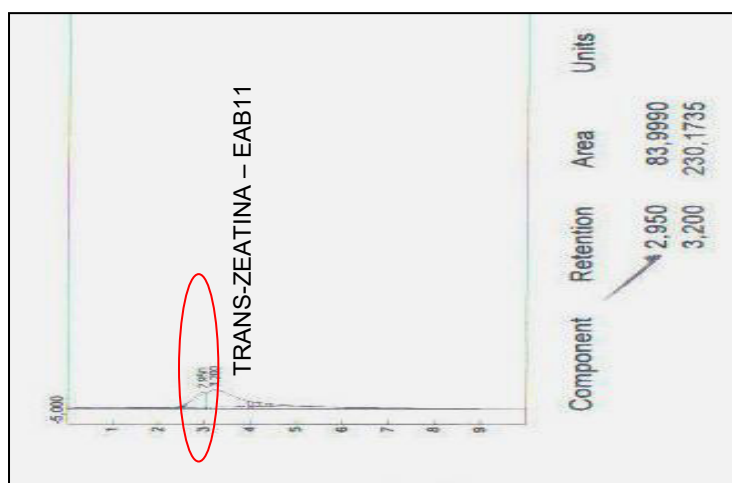


FIGURA 3.3 CROMATOGRAMA DEL EXTRACTO EAB11

En la Figura 3.4 se puede observar dos picos para el extracto EAB21 en el cromatograma leído a 280 nm. Se seleccionó el pico con tiempo de retención 2.86 minutos y un área bajo el pico de 57.31 ya que el tiempo de retención de éste se encuentra en la vecindad del rango determinado para trans-zeatina. Sin embargo, los tiempos de retención de las réplicas se encuentran alejados del rango ya mencionado, pero las cromatografías TLC de las mismas identifican un compuesto similar al patrón. Por este motivo se seleccionaron los tiempos de retención con valor 3.10 y 3.06 minutos para las réplicas EAB22 y EAB23 respectivamente. Ver Apéndices C3 y C4.

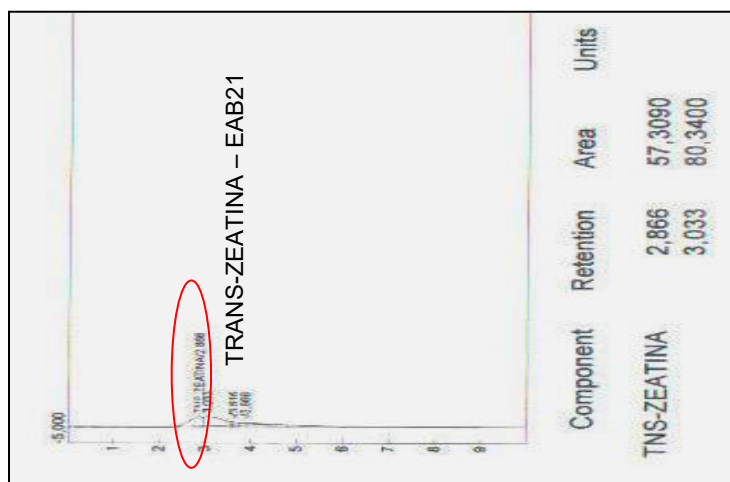


FIGURA 3.4 CROMATOGRAMA DEL EXTRACTO EAB21

La Figura 3.5 muestra dos picos en el cromatograma para el extracto EAB31 leído a 280 nm. Se eligió el pico con tiempo de retención 2.98 minutos y un área bajo la curva de 76.59 ya que el tiempo de

retención se encuentra en la vecindad del rango permitido si se considera un error aproximado de ± 0.2 minutos. Además la cromatografía TLC para las réplicas EAB32 y EAB33 identifica la presencia de un compuesto similar al patrón. Sin embargo, los tiempos de retención de estas réplicas no se encuentran dentro del rango determinado para el patrón. Ver Apéndices C5 y C6.

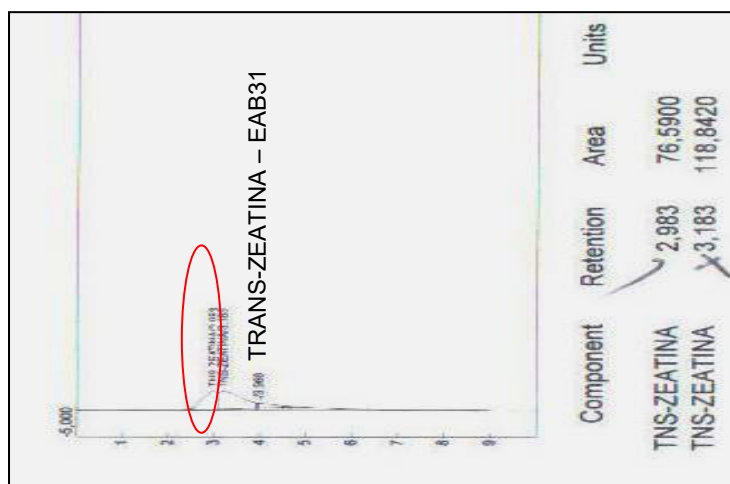


FIGURA 3.5 CROMATOGRAMA DEL EXTRACTO EAB31

En el caso de las muestras de granos y desechos de maíz, la Figura 3.6 expresa el pico del extracto EAMT1 en el cromatograma leído a 280 nm. Realmente el pico generado posee un tiempo de retención de 3.083 minutos que está fuera del rango determinado para el patrón, tratándose de otro compuesto. Sin embargo, se puede observar un pico solapado en la parte inferior izquierda con tiempo de retención de 2.75 minutos y área bajo el pico de 654.96.

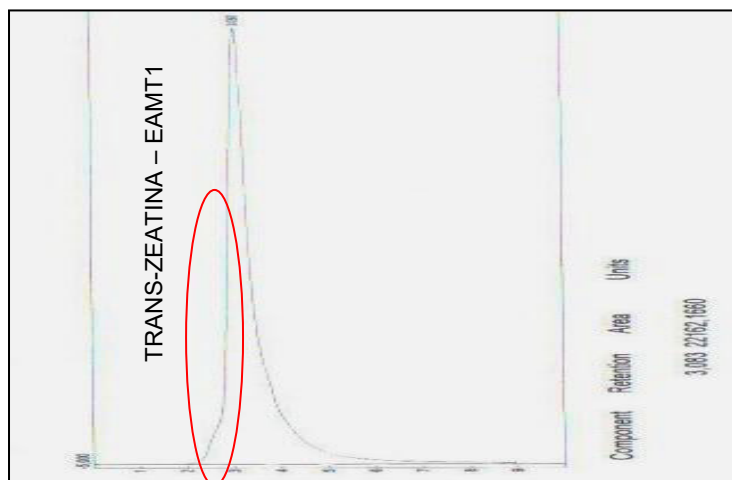


FIGURA 3.6 CROMATOGRAMA DEL EXTRACTO EAMT1

La Figura 3.7 expresa el peak del extracto EAMH1 en el cromatograma leído a 280 nm, de manera similar como ocurre con el extracto EAMT1 existe la presencia de trans-zeatina en un pico solapado con tiempo de retención de 2.80 minutos y un área bajo el pico de 584.89. No obstante, la solapación del pico en la parte inferior izquierda es más pronunciada que en el caso anterior.

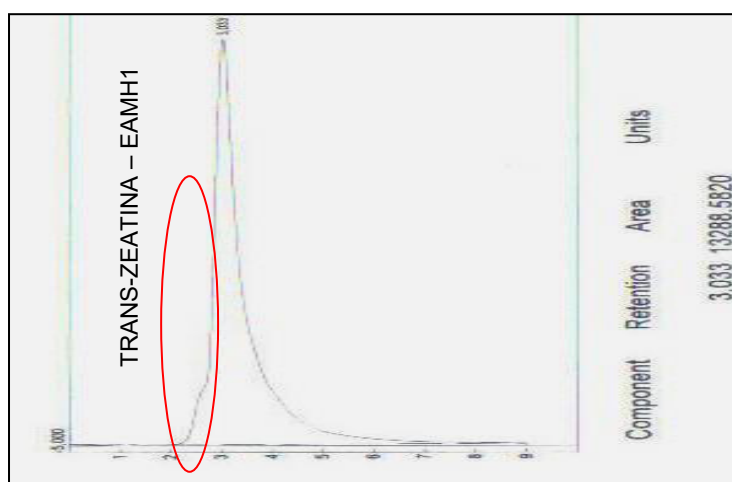


FIGURA 3.7 CROMATOGRAMA DEL EXTRACTO EAMH1

El cromatograma de la Figura 3.8 muestra el pico del extracto EAMG1 leído a 280 nm. En este caso se puede observar claramente la presencia del compuesto en estudio ya que está representado por el pico que posee mayor altura, un tiempo de retención de 2.66 minutos y un área bajo el pico de 2049.07. Existe además la presencia de otro compuesto al igual que en los extractos EAMT1 y EAMH1, de hecho se podría aseverar que se trata del mismo compuesto ya que el tiempo de retención es similar en las diferentes muestras.

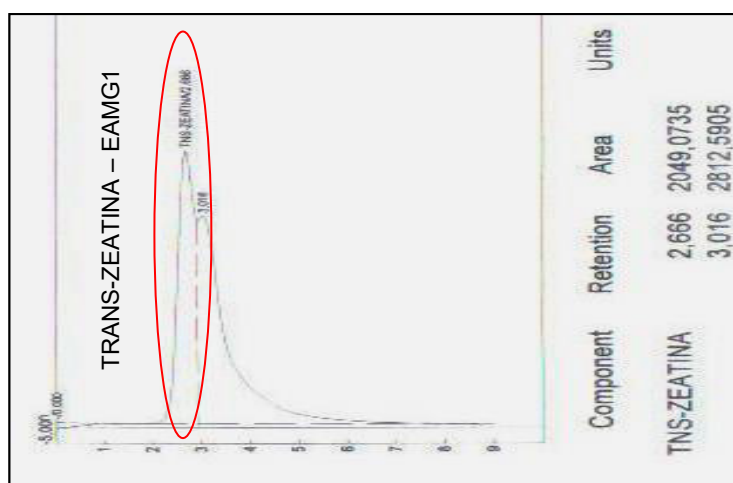


FIGURA 3.8 CROMATOGRAMA DEL EXTRACTO EAMG1

En los Apéndices C7, C8, C9, C10, C11 Y C12 podemos observar los cromatogramas de cada una de las réplicas para las muestras de tusa, hojas y granos de maíz.

La Tabla VII muestra las concentraciones medias de trans-zeatina para las muestras de bioinsumos y maíz establecidas a partir de la ecuación de la curva de calibración. El análisis estadístico de los resultados obtenidos se pueden observar en los Apéndices A3, A4, A5 y A6.

TABLA VII

Muestras		Concentración de trans-zeatina (mg/g)
Bioinsumos	EAB1	0,072c
	EAB2	0,021 ± 0,007d
	EAB3	0,057 ± 0,017c
Muestras de Maíz	EAMT	0,176 ± 0,040b
	EAMH	0,296 ± 0,037b
	EAMG	0,730 ± 0,044a

Valores medios (n = 3) ± desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre muestras según Test de Tukey (p<= 0,05).

CONCENTRACIÓN DE TRANS-ZEATINA EN BIOINSUMOS Y MUESTRAS DE MAÍZ (ZEA MAYS)

El Apéndice A7 muestra una gráfica comparativa de las concentraciones obtenidas en las diferentes muestras, con la cual se puede determinar que el grano de maíz posee la mayor concentración de trans-zeatina.

Las concentraciones de trans-zeatina (0.072, 0.021 y 0.057 mg/g muestra seca) obtenidas en las enmiendas orgánicas líquidas EAB1,

EAB2 y EAB3 respectivamente no han sido referenciadas. Pese a que las muestras EAB2 y EAB3 poseen concentraciones muy bajas de trans-zeatina, se podrían considerar útiles para su aplicación, confirmando los beneficios de estos bioinsumos como reguladores del crecimiento vegetal.

El valor de la muestra EAB1 no es un valor promedio, como ocurre con la otras muestras ya que la concentración del compuesto en la réplicas era tan pequeño que al realizar la operación matemática se tenía como resultado un valor negativo. Por ésta razón éste valor no es será tomado como resultado final al no poseer validez estadística. Por lo tanto la mayor concentración de la fitohormona se manifestó en la enmienda orgánica líquida EAB3, cuya formulación poseía microorganismos comerciales.

Las concentraciones de trans-zeatina (0.176, 0.296 y 0.730 mg/g muestra seca) obtenidos en las muestras EAMT, EAMH y EAMG respectivamente, correspondientes a tusa, hojas y granos de maíz difieren de los reportados para *Solanum Tuberosum L.* y *Solanum phureja Juz et buk* [7].

Pese a que las muestras EAMT (0.176 mg/g) y EAMH (0.296 mg/g)

poseen concentraciones muy bajas de trans-zeatina en relación a la obtenida con la muestra EAMG (0.730 mg/g) se las podría considerar para dar utilidad económica y ecológica a los residuos de maíz.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos de la presente investigación nos permiten concluir lo siguiente:

4.1 Conclusiones

- Se estableció la curva de calibración del patrón de trans-zeatina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para determinar la concentración de ésta fitohormona en cualquier tipo de muestra. La ecuación de esta curva de calibración es válida para valores numéricos de área bajo el pico mayores o iguales que 51.74.
- Se logró aislar, identificar y cuantificar la fitohormona trans-zeatina en los desechos de maíz (*Zea mays*) por métodos Cromatográficos (TLC y HPLC).
- La presencia de Trans-zeatina en los extractos provenientes de los desechos del maíz, sirvieron de referencia para su identificación en los bioinsumos.

- Se estableció el protocolo CBE-PROT-BP-039 para aislar, identificar y cuantificar trans-zeatina en desechos de maíz (*Zea mays*) por métodos cromatográficos TLC y HPLC, indicando la utilidad ecológica y económica de estos desechos.
- Se logró aislar y cuantificar trans-zeatina en todas las muestras de enmiendas orgánicas líquidas con éxito. Los valores obtenidos de concentración, a pesar de ser bajos confirman los beneficios de estos bioinsumos como reguladores del crecimiento vegetal.
- Se estableció el protocolo CBE-PROT-BP-040 para aislar, identificar y cuantificar trans-zeatina en muestras de enmiendas orgánicas líquidas de producción local por métodos cromatográficos TLC y HPLC.

4.2 Recomendaciones

- Se recomienda utilizar esta investigación como soporte para realizar trabajos posteriores que estudien la actividad biológica del compuesto extraído en cultivos in vitro, además de la implementación de una planta piloto para la extracción del mismo con el fin de aprovechar estos residuos agrícolas.
- Este trabajo puede ser aplicado en otros tipos de bioinsumos, como purinas, té de estiércol, té de plantas, lixiviados de desechos descompuestos, entre otros; con el fin de confirmar su potencial beneficio como reguladores del crecimiento vegetal.
- Se puede realizar la obtención del extracto sólido mediante el proceso de liofilización para separar con mayor efectividad el extracto de trazas de solventes.
- Para lograr una separación e identificación más eficiente del compuesto en las muestras de maíz (*Zea mays*) se recomienda mejorar la eficiencia de la cromatografía HPLC manipulando las condiciones de operación del equipo.

APÉNDICES

APÉNDICE A

APÉNDICE A1

**Tabla para la cuantificación de trans-zeatina en las muestras
de enmiendas orgánicas líquidas**

Muestras	Peso de las muestras (g)	Área bajo el pico	Concentración del vial (ppm)	Factor de dilución (L)	Concentración de la muestra (mg/g)
EAB11	0,5012	83,999	5,924257	0,00605	0,071512
EAB21	0,5005	57,309	1,024322	0,00630	0,012894
EAB22	0,5005	64,284	2,306216	0,00630	0,029029
EAB23	0,5005	61,240	1,746805	0,00630	0,021988
EAB31	0,5006	76,590	4,565490	0,00630	0,057456
EAB32	0,5006	85,731	6,241737	0,00630	0,078552
EAB33	0,5006	67,083	2,820262	0,00630	0,035493

APÉNDICE A2

Tabla para la cuantificación de trans-zeatina en las muestras de granos y desechos de maíz (Zea mays)

Muestras	Peso de las muestras (g)	Área bajo el pico	Concentración del vial (ppm)	Factor de dilución (L)	Concentración de la muestra (mg/g)
EAMT1	3,0028	654,960	107,333	0,0065	0,232338
EAMT2	3,0028	452,630	72,143	0,0065	0,156164
EAMT3	3,0028	409,290	64,498	0,0065	0,139616
EAMH1	2,4984	584,890	95,239	0,0065	0,247779
EAMH2	2,4984	790,270	130,410	0,0065	0,339282
EAMH3	2,4984	702,290	115,447	0,0065	0,300353
EAMG1	2,9991	2049,074	327,547	0,0065	0,709897
EAMG2	2,9991	1982,650	317,936	0,0065	0,689069
EAMG3	2,9991	2316,233	365,309	0,0065	0,791740

APÉNDICE A3

Análisis de Varianza y Test de Tukey realizado a las muestras de enmiendas orgánicas líquidas

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Concentración de la	7	0,73	0,59	37,09	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2,8E-03	2	1,4E-03	5,33	0,0744
Muestras	2,8E-03	2	1,4E-03	5,33	0,0744
Error	1,1E-03	4	2,6E-04		
Total	3,9E-03	6			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,05683
Error: 0,0003 gl: 4

Muestras	Medias	n	E.E.	
EAB2	0,02	3	0,01	A
EAB3	0,06	3	0,01	A
EAB1	0,07	1	0,02	A

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

APÉNDICE A4

Análisis de Varianza y Test de Tukey realizado a las muestras de granos y desechos de maíz

Análisis de la varianza						
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV		
Concentración de la	9	0,97	0,96	12,48		
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo	0,51	2	0,26	102,04	<0,0001	
Muestras	0,51	2	0,26	102,04	<0,0001	
Error	0,01	6	2,5E-03			
Total	0,53	8				
Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,12526						
Error: 0,0025 gl: 6						
Muestras	Medias	n	E.E.			
EAMT	0,18	3	0,03	A		
EAMH	0,30	3	0,03	A		
EAMG	0,73	3	0,03	B		
Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)						

APÉNDICE A5

Tabla para la determinación del promedio, desviación y error estándar de cada una de las muestras de enmiendas orgánicas líquidas

Muestras	Concentración (mg/g)	Número de muestras (n)	Concentración promedio (mg/g)	Desviación estándar (S)	Error estándar (ϵ)
EAB11	0,071512	1	0,071512	N/D	N/D
EAB12	N/D				
EAB13	N/D				
EAB21	0,012894	3	0,021304	0,006605	0,003813
EAB22	0,029029				
EAB23	0,021988				
EAB31	0,057456	3	0,057167	0,017580	0,010150
EAB32	0,078552				
EAB33	0,035493				

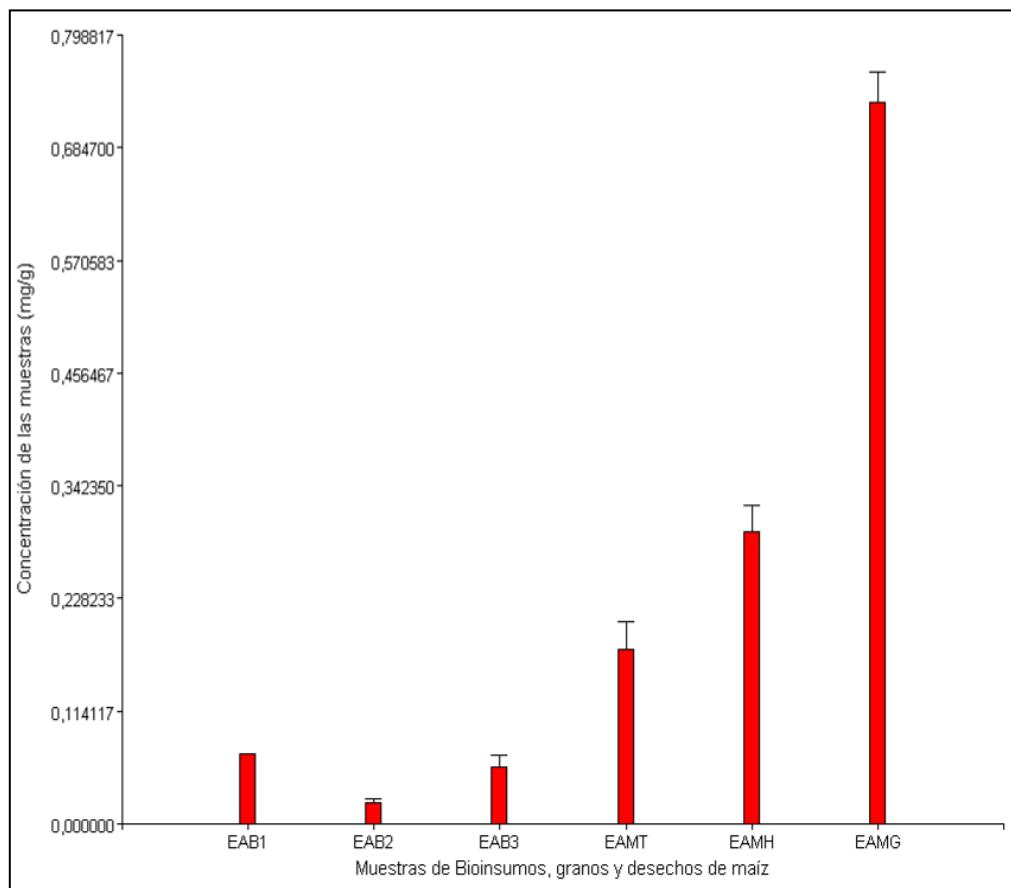
APÉNDICE A6

Tabla para la determinación del promedio, desviación y error estándar de cada una de las muestras de granos y desechos de maíz (*Zea mays*)

Muestras	Concentración (mg/g)	Número de muestras (n)	Concentración promedio (mg/g)	Desviación estándar (S)	Error estándar (ϵ)
EAMT1	0,232338	3	0,176039	0,040378	0,023312
EAMT2	0,156164				
EAMT3	0,139616				
EAMH1	0,247779	3	0,295805	0,037494	0,021647
EAMH2	0,339282				
EAMH3	0,300353				
EAMG1	0,709897	3	0,730235	0,044314	0,025585
EAMG2	0,689069				
EAMG3	0,791740				

APÉNDICE A7

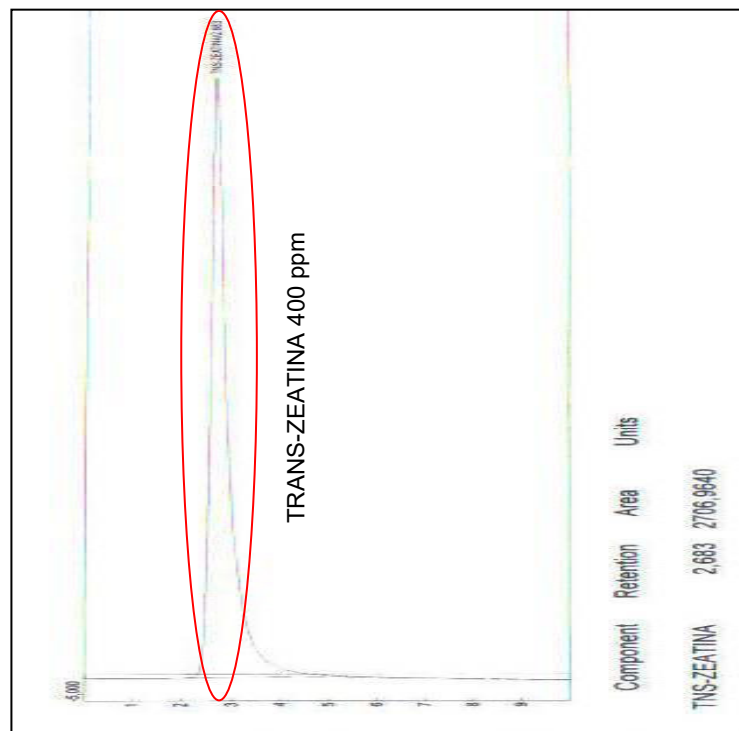
Gráfica comparativa de la concentración promedio de cada una de las muestras de enmiendas orgánicas líquidas, granos y desechos de maíz (*Zea mays*)



APÉNDICE B

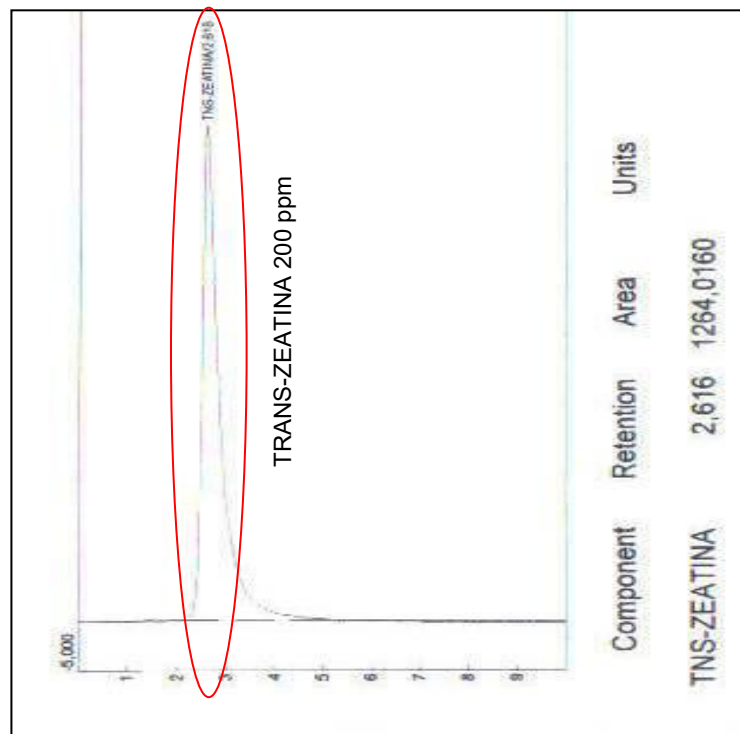
APÉNDICE B1

Cromatograma del patrón trans-zeatina
de concentración 400 ppm



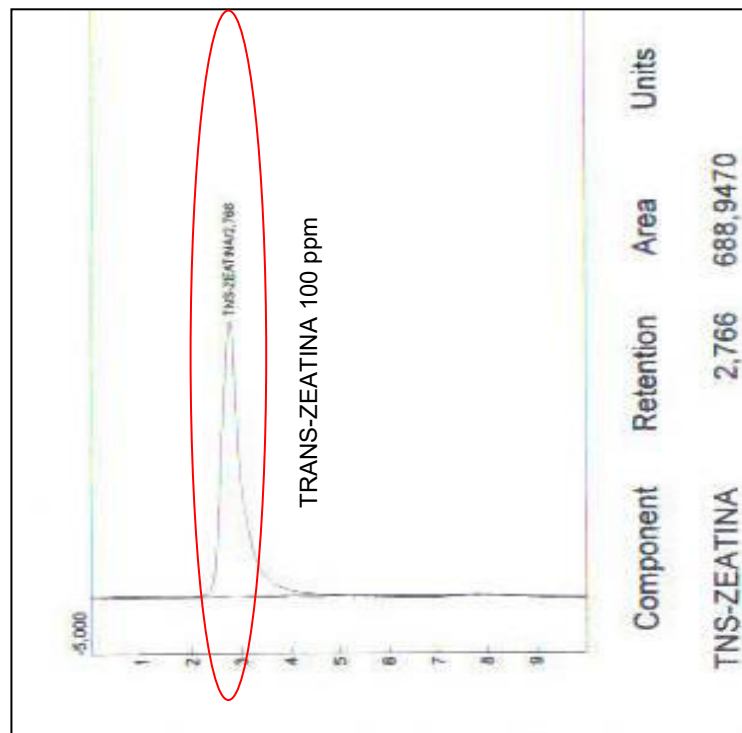
APÉNDICE B2

Cromatograma del patrón trans-zeatina
de concentración 200 ppm



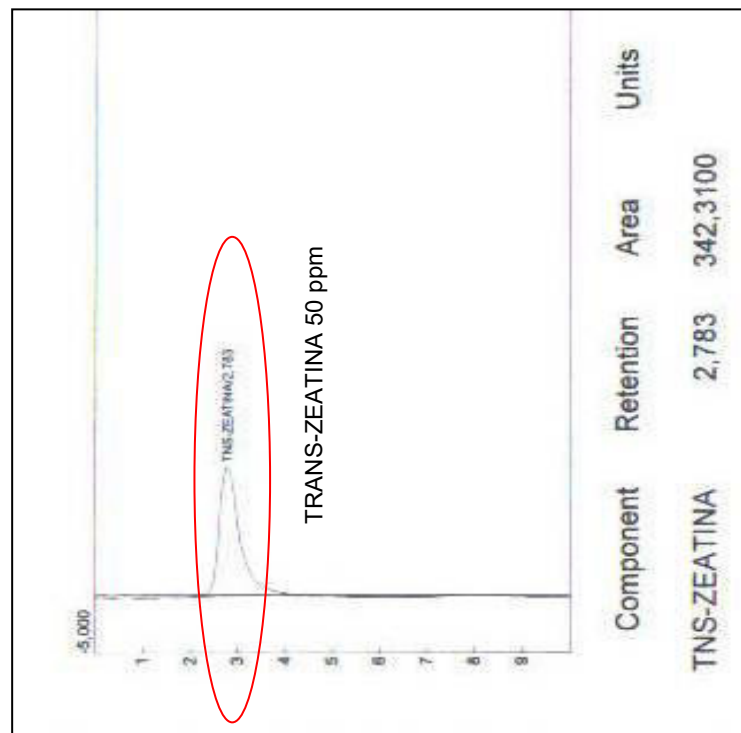
APÉNDICE B3

Cromatograma del patrón trans-zeatina
de concentración 100 ppm



APÉNDICE B4

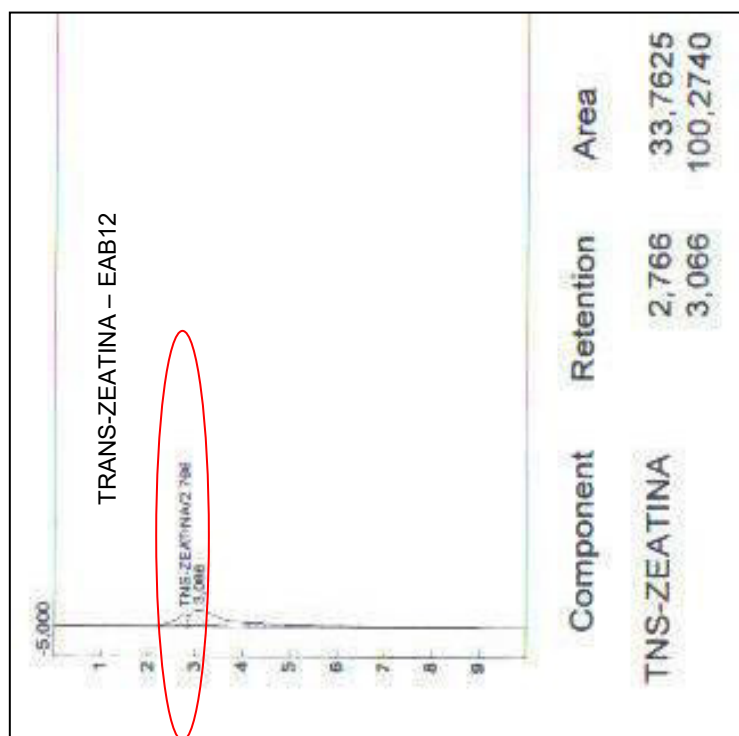
Cromatograma del patrón trans-zeatina
de concentración 50 ppm



APÉNDICE C

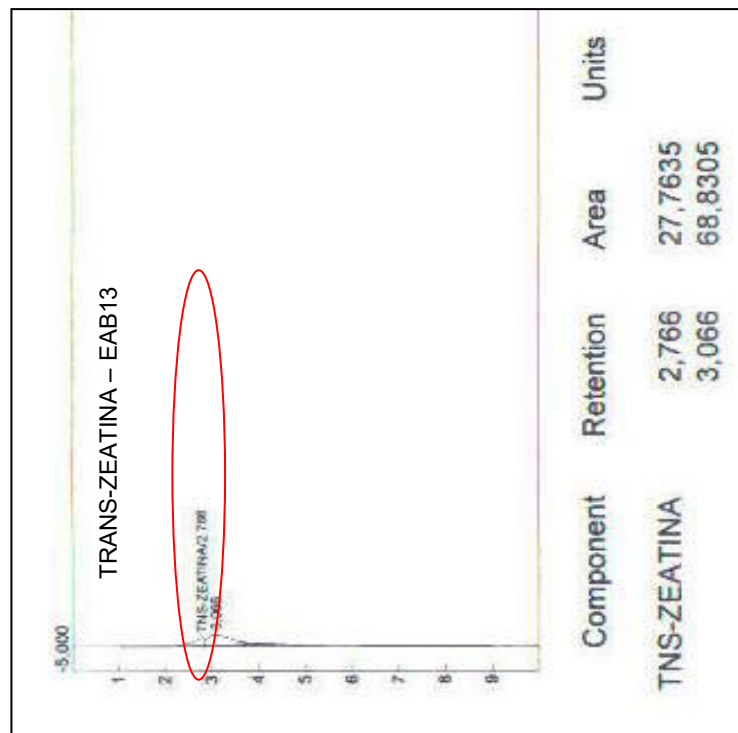
APÉNDICE C1

Cromatograma de la réplica EAB12, muestra de enmienda orgánica líquida



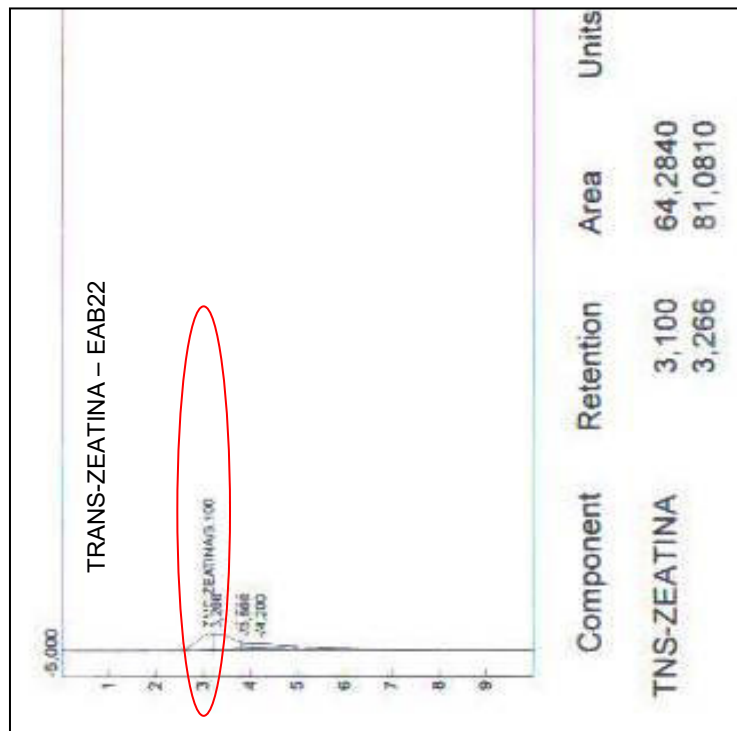
APÉNDICE C2

Cromatograma de la réplica EAB13, muestra de enmienda orgánica líquida



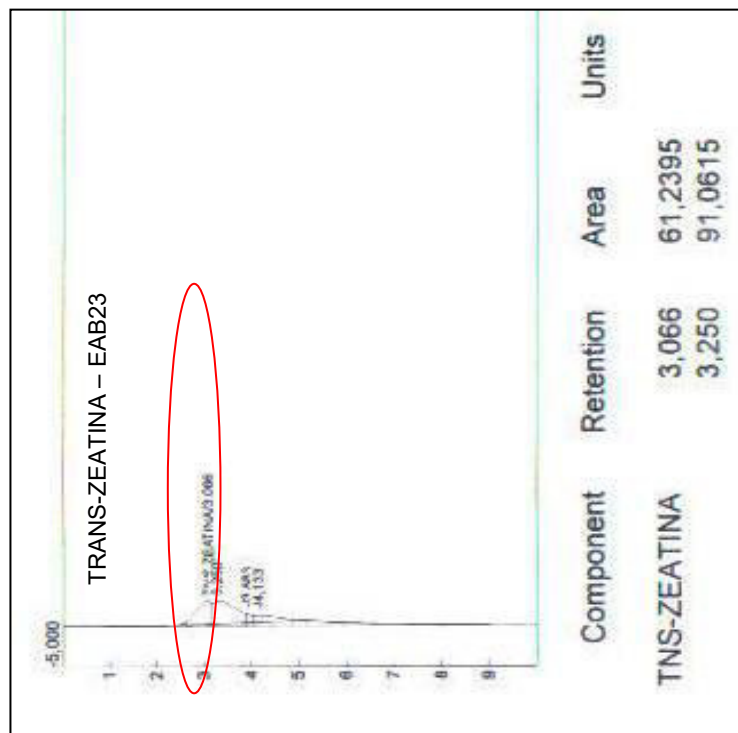
APÉNDICE C3

Cromatograma de la réplica EAB22, muestra de enmienda orgánica líquida



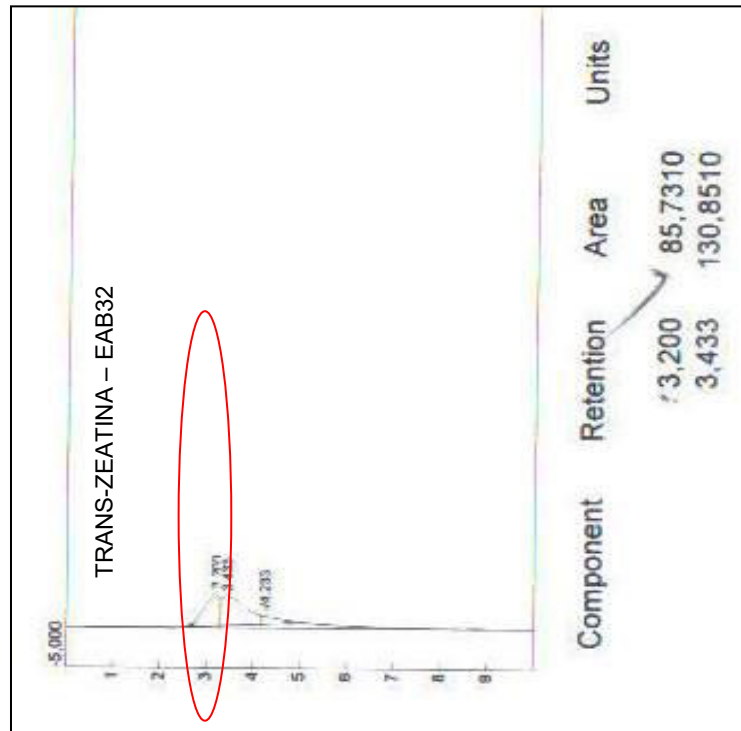
APÉNDICE C4

Cromatograma de la réplica EAB23, muestra de enmienda orgánica líquida



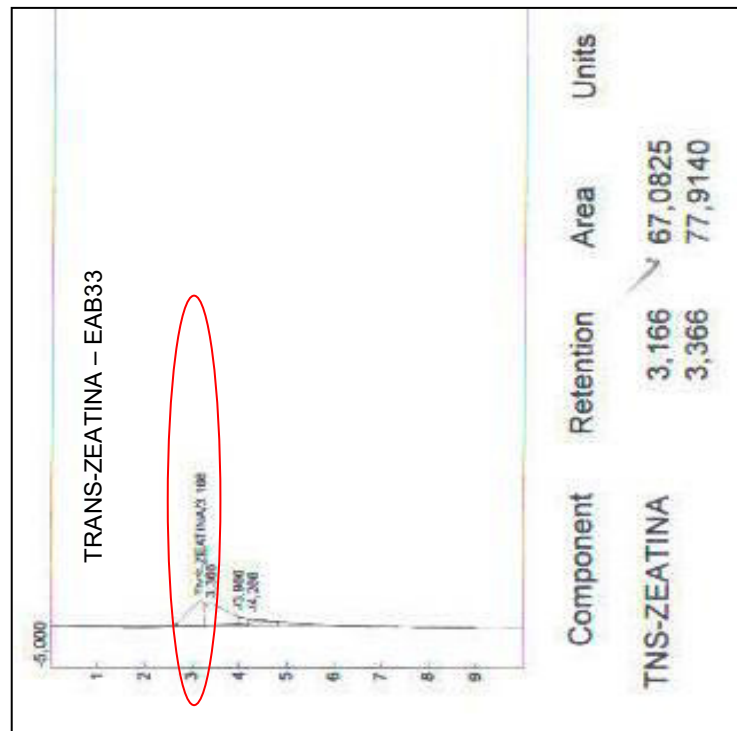
APÉNDICE C5

Cromatograma de la réplica EAB32, muestra de enmienda orgánica líquida



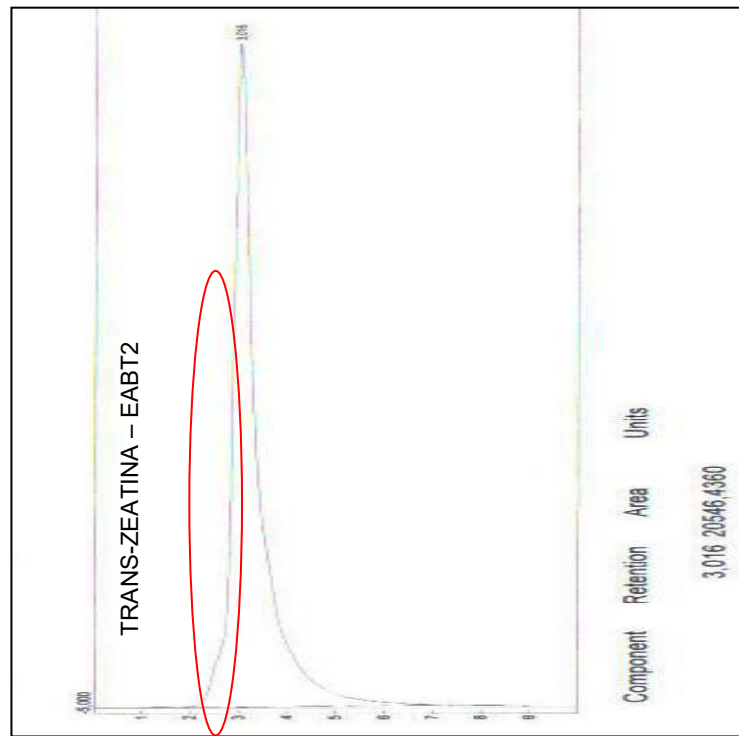
APÉNDICE C6

Cromatograma de la réplica EAB33, muestra de enmienda orgánica líquida



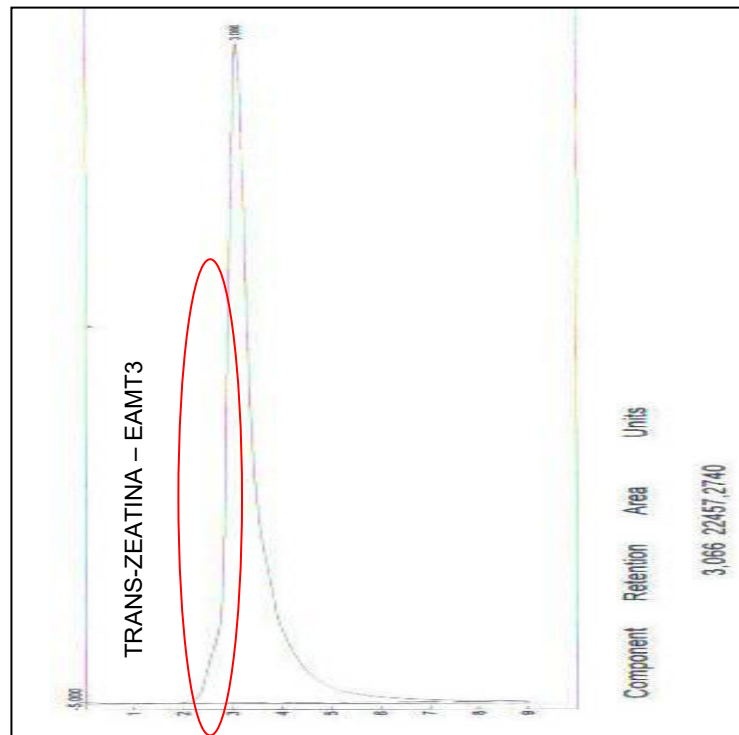
APÉNDICE C7

Cromatograma de la réplica EAMT2, muestra de tusa de maíz



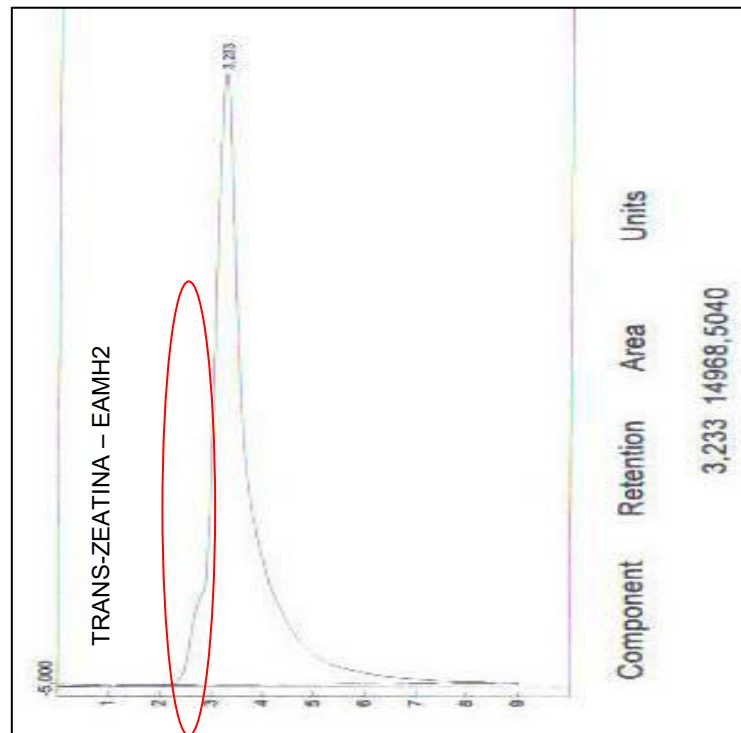
APÉNDICE C8

Cromatograma de la réplica EAMT3, muestra de tusa de maíz



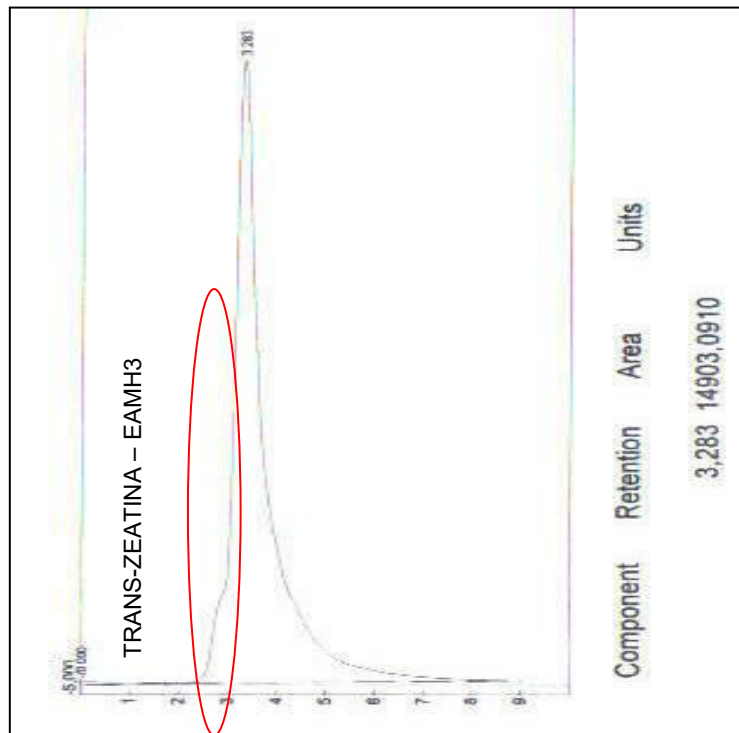
APÉNDICE C9

Cromatograma de la réplica EAMH2, muestra de tusa de maíz



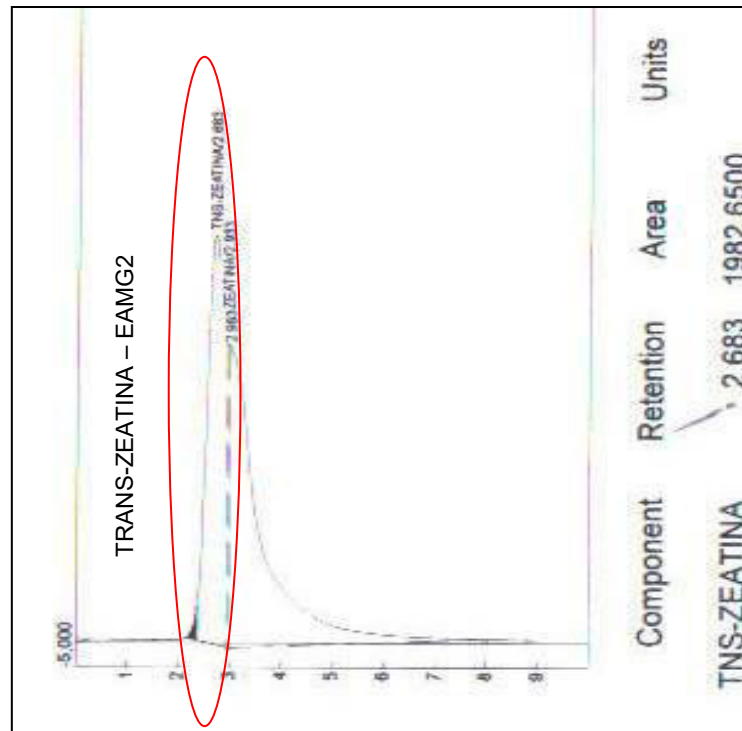
APÉNDICE C10

Cromatograma de la réplica EAMH3, muestra de hojas de
maíz



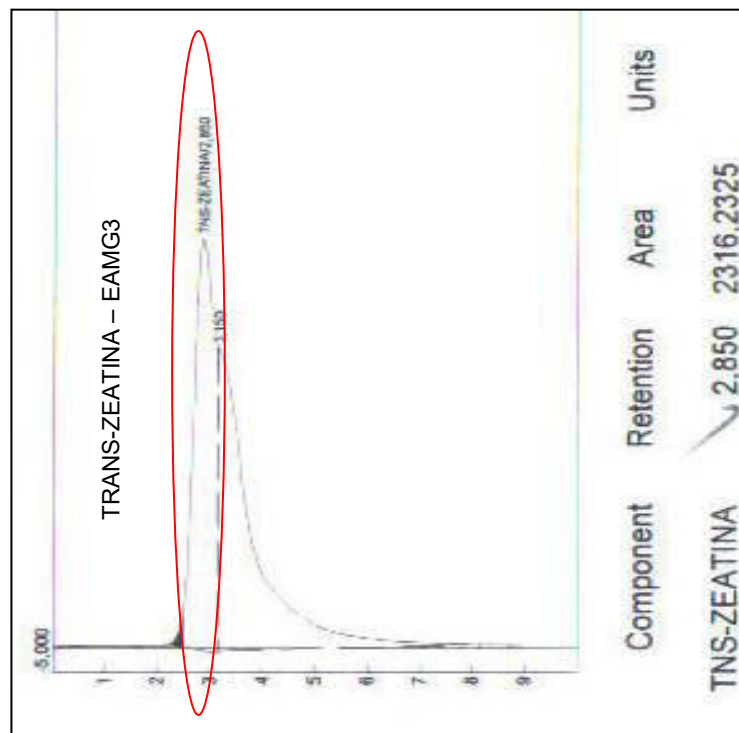
APÉNDICE C11

Cromatograma de la réplica EAMG2, muestra de granos de maíz



APÉNDICE C12

Cromatograma de la réplica EAMG3, muestra de granos de maíz



BIBLIOGRAFÍA

- [1] Banco Central del Ecuador. Producto Interno Bruto por clase de actividad económica, Ecuador, 2010.
- [2] Instituto Nacional de Normalización, INN-Chile. Norma Chilena oficial : NCh2880.Of2004. Chile, 2005, pp 3-6.
- [3] García I. y González L. Análisis e identificación de bioestimulantes indólicos en una composta. Investigación Universitaria Multidisciplinaria. Universidad Simón Bolívar, Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec. México D.F., 2005, pp. 7-13.
- [4] López T. y Padró L. Estudio fitoquímico preliminar de las hojas y tallos de la especie *Pedillanthustihymaloides (L). poit.* Revista Cubana de Química. Facultad de Ciencias Naturales - Universidad de Oriente, Cuba, 2003, (3), pp.14-17.
- [5] Taiz L. y Zeiger E., Fisiología Vegetal, Publicaciones de la Uniiversidad Jaume, España, 2006, (2), pp. 943-975.
- [6] Olivella C., Vendrell M. y Savé R. Determinación de ácido abscísico, ácido indolacético, zeatina y ribósido de zeatina en hojas desarrolladas de *Gerbera jamesonii cv Bolus* y su variación con la edad. Departamento de Tecnología Hortícola. Investigación Agrícola: Prod. Prot. Veg.,

Barcelona, 2001(3).

- [7] Garcia M., Portela A. y Florez V. Sustancias con actividad citoquinínica estimulan la brotación de yemas en tuberculos de papa. Revista de ciencias agronómicas, Instituto Agronómico de Campinas, Brasil, 2009, 68(3), pp. 555-562.
- [8] Ortiz L. y Flórez V. Comparación cuantitativa de ácido abscísico y citoquininas en la Tuberización de *Solanum tuberosum* L. Y *Solanum phureja* Juz. Et Buk. Revista Agronomía Colombiana, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, 2008, 26(1) pp. 32-39.
- [9] Chong-Maw Ch. The discovery of Cytokinins. Discoveries in plant biology. World Scientific Publishing Co. Pte.Ltd. Estados Unidos, 1998, (1), pp. 1-14.
- [10]Manzano P., Chóez I., Ayllón M., Orellana A., Peralta E. Determinación de fitohormonas en enmiendas orgánicas líquidas (bioles). Libro de memorias. XIX Reunión Internacional ACORBAT, Medellín-Colombia, 2010, (1), pp. 585.
- [11]Garcia F. Programa de la asignatura Biología y Botánica, Fitorreguladores, Parte III, Tema 14, Universidad Politécnica de Valencia. España, 2003
- [12] Taiz L. y Zeiger E. Plant Physiology online, Fifth edition, tema 21, 2010

- [13]Ingham E. The compost tea brewing manual, Fifth edition, Soil Foodweb Incorporated. Oregon, USA. 2005, pp.69.
- [14]Arévalo J. Efecto del bioabono líquido en la producción de pastos y en la fertilidad del suelo. 1998.
- [15]Diver S. Notes on Compost Teas: A 2001 supplement to the ATTRA publication: Compost Teas for Plant Disease Control. 2001.
- [16]Ingham, E. The compost tea brewing manual, Thirth Edition. Soil Foodweb Incorporated. Oregon, USA. 2003, pp.54.
- [17]Suquilanda M. Manejo alternativo de Sigatoka Negra en Ecuador. Cultivos Controlados. 2001, pp.4.
- [18]Gómez J. Abonos Orgánicos. FERIVA. Cali, Colombia. 2000, pp.105.
- [19]Grubinger V. Compost tea to suppress plant disease. vegetable and berry specialist University of Vermont Extension. 2005.
- [20]Brinton W., Trankner A. y Droffner M. Investigations into liquid compost extracts. 1996. pp. 68-70.
- [21]Depósito de Documentos de la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). El maíz en la nutrición Humana. Roma. 1993.
- [22]Souza N. Aprovechamiento del maíz. Universidad Autónoma de Yucatán,

México. 2001.