

55



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**EFFECTO DE PACLOBUTRAZOL EN Solanum Tuberosum  
BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO**

**T É S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
P R E S E N T A :  
PARRA OAXACA LUIS ALBERTO**

**ASESOR: Dr. Ricardo V. Santiago Díaz**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AYUNTAMIENTO DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE

A/TN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Efecto del paclobutrazol en Solanum tuberosum bajo condiciones de invernadero.

que presenta el pasante: Parra Oaxaca Luis Alberto

con número de cuenta: 956047R-5 para obtener el TITULO de:  
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 18 de Abril de 2001

PRESIDENTE

Dr. Ricardo V. Santiago Díaz

VOCAL

O.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda

SECRETARIO

I.Q.I. Guadalupe Sevilla Díaz

PRIMER SUPLENTE

C. Arcadia Hernández Beltrán

SEGUNDO SUPLENTE

O.F.B. Gabriela Escalante Reynoso

## **AGRADECIMIENTOS:**

**A mis padres por haberme dado  
la mejor de las herencias, una carrera.**

**A mis profesores de la Facultad, por haber  
contribuido a mi formación profesional. En  
especial a los profesores: Ricardo V. Santiago  
Díaz, Ramón Cendejas, Rene Miranda, Ma.  
Esther Revuelta, por su inestimable ayuda a la  
realización de este trabajo.**

**A mis compañeros de generación:  
Beatriz Vázquez, Rosalba y Marco, por su  
ayuda en la elaboración del trabajo escrito.**

# INDICE

<b>Resumen.</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción.</b>	<b>2</b>
<b>2. Generalidades.</b>	<b>4</b>
2.1. Origen de la papa en América.	4
2.2. Clasificación taxonómica	6
2.3. Importancia nacional	7
2.4. Calidad y composición del tubérculo.	7
2.5. <u>Solanum tuberosum</u>	12
2.5.1. Distribución geográfica	12
2.5.2. Descripción botánica y características importantes.	12
2.6. Fitohormonas	16
2.6.1. Definición de fitohormona y fitorregulador	16
2.6.2. Clasificación de fitohormonas	16
2.6.3. Mecanismos de acción de fitohormonas	19
2.6.4. Giberelinas	21
2.6.4.1. Biosíntesis	21
2.6.4.2. Efectos fisiológicos en el desarrollo de la planta	28
2.7. Paclobutrazol.	30
2.7.1. Descripción química	30
2.7.2. Mecanismo de acción bioquímico	31
2.7.3. Toxicología	32

<b>2.8. Análisis bromatológico.</b>	<b>33</b>
2.8.1. Definición y utilidad	33
2.8.2. Determinaciones que constituyen un análisis bromatológico.	34
<b>2.9. Análisis estadístico.</b>	<b>35</b>
2.9.1. Análisis de varianza	35
2.9.2. Técnica de Studen-Newman-Kuel	37
<b>2.10. Cromatografía de gases.</b>	<b>39</b>
2.10.1. Fundamento y descripción de la cromatografía de gases	39
2.10.2. Equipos para cromatografía de gases.	39
<b>2.11. Espectrometría de masas.</b>	<b>48</b>
2.11.1. Fundamentos y descripción de la Espectrometría de masas	48
2.11.2. Equipos para espectrometría de masas.	50
<b>3. Hipótesis.</b>	<b>57</b>
<b>4. Objetivos</b>	<b>57</b>
<b>5. Materiales y Métodos.</b>	<b>59</b>
5.1. Diseño experimental	59
5.2. Métodos	61

5.2.1. Recolección de tubérculos y toma de datos	61
5.2.2. Análisis bromatológico	81
5.2.2.1. Preparación de la muestra.	61
5.2.2.2. Determinación de humedad	62
5.2.2.3. Determinación de cenizas totales	63
5.2.2.4. Determinación de lípidos totales.	64
5.2.2.5. Determinación de proteínas totales	67
5.2.2.6. Determinación de carbohidratos	70
5.2.2.6.1. Determinación de almidón	70
5.2.2.6.2. Determinación de fibra cruda	72
5.2.3. Cuantificación de paclobutrazol en tubérculos por cromatografía de gas – Espectrometría de masas	74
6. Resultados	75
7. Análisis estadístico.	94
8. Análisis y discusión de resultados.	100
9. Conclusiones.	103
10. Bibliografía.	104

## RESUMEN

Se evaluó el rendimiento y calidad de tubérculos de Solanum tuberosum tratados con paclobutrazol, a la cosecha, bajo condiciones de invernadero. Las plantas fueron crecidas en cubetas de 20 lt, sin fertilizante, aplicándose por vía foliar, una sola vez a los 30 días de la siembra paclobutrazol, en una de sus formas comerciales, Cultar 25 SC (MR). El paclobutrazol redujo la longitud de los tallos en plantas tratadas, incrementándose este efecto al aumentar la concentración aplicada, incrementó el rendimiento de los tubérculos a la cosecha de forma estadísticamente significativa al ser aplicado a una concentración del 4% v/v (de Cultar 25 SC), mediante un aumento de la tuberización, la cual se refiere a un mayor número de tubérculos por planta. Se realizó un análisis bromatológico para evaluar la calidad alimenticia de los tubérculos, del cual se concluyó que no hay una modificación significativa en la cantidad y composición de la materia seca, aunque sí se observó una tendencia de aumento en la cantidad de almidón y proteína total. La identificación de paclobutrazol se realizó mediante homogenización y extracción de tubérculos de Solanum tuberosum sin tratar con paclobutrazol y tratados al 4% v/v con Cultar 25 SC, con metanol al 80% v/v, siendo analizados los extractos por cromatografía de gas-espectrometría de masas, obteniéndose como resultado la ausencia de paclobutrazol en los extractos de los tubérculos.

## 1. INTRODUCCIÓN.

La papa (específicamente *Solanum tuberosum*) es uno de los cultivos más importantes como fuente de alimentación humana, superada en cuanto a superficie sembrada, solamente por gramíneas como trigo, arroz, maíz y cebada. En México de las 43 hortalizas que se cultivan la papa ocupa uno de los principales lugares en importancia, proporcionando una producción total nacional de 1,280,882 toneladas de papa, estimándose con un valor económico de 4,068 millones de pesos (Alvarado, 1984, Bautista 1996, INEGI, 1997, inegi gob. 2001)

Por otro lado, la alta demanda de este producto asociado al crecimiento y desarrollo de la población, hace necesario plantear soluciones para elevar, no solo el rendimiento del cultivo, sino también su calidad nutritiva, por lo que este trabajo se enfoca a mejorar el cultivo de *Solanum tuberosum* en los dos aspectos mencionados. Para tal propósito se diseñó un modelo experimental, el cual consiste en aplicar por vía foliar un inhibidor de giberelinas (fitohormonas reguladoras del crecimiento aéreo de la planta), siendo este el paclobutrazol (nombre común) el cual tiene la capacidad de impedir las oxidaciones del precursor de estas hormonas: el kaureno a kaurenol, kaurenal y por último a ácido kaurenico, por medio de una inhibición enzimática de monooxigenasas del citocromo P450, asociado al ciclo del mevalonato, utilizándolo a distintas concentraciones (2% v/v y 4% v/v de Cultar 25 SC) ya que de acuerdo a bibliografía consultada, las giberelinas afectan la distribución de carbohidratos a favor de tallo, además que los niveles de giberelinas es un factor importante en la iniciación y subsiguiente desarrollo del tubérculo (observándose un efecto de inhibición de la tuberización), y por otro lado también inhiben la acumulación de patatina (proteína mayoritaria de la papa) en el tubérculo (Belknap, 1994, Grierson, 1994) Por lo que es factible plantear que al inhibir la síntesis de giberelinas se provoque un aumento en el rendimiento del tubérculo, con lo cual será más productiva la explotación agrícola de *Solanum tuberosum*, además de una mayor acumulación de proteína, mejorando su valor nutritivo

Otro aspecto importante involucrado en el uso de agroquímicos es el toxicológico, para tratar este aspecto se realizó la identificación de paclobutrazol en tubérculos de S. tuberosum tratados al 4% v/v con Cultar 25 SC, por medio de cromatografía de gas – espectrometría de masas, con el fin de asegurar que el paclobutrazol, a las concentraciones utilizadas no presenta ningún riesgo a la salud. Para evaluar los resultados de la aplicación de paclobutrazol en cuanto al rendimiento del tubérculo, se aplicó un análisis estadístico (análisis de varianza y técnica SNK) utilizando como parámetros el número y peso de los tubérculos por tratamiento y unitarios. Para evaluar la calidad alimenticia, se realizó un análisis bromatológico, contemplándose determinaciones de carbohidratos, proteína, lípidos y humedad.

## 2. GENERALIDADES

### 2.1. Origen de la papa en América.

De Candolle (1883) afirma que durante el periodo del descubrimiento de América, el cultivo de la papa era practicado, con todas las apariencias de ser muy antiguo, en las regiones templadas de Chile. No se puede dudar, escribe, que la papa sea originaria de América lo que se necesita determinar es de qué parte del continente (Alvarado, 1989, Baudilio, 1982)

Cañas (1901) afirma: "Después de constantes investigaciones e información recogida en nuestros viajes por las provincias de Concepción, Arauco, Malleco, Cautín, Llanquihue y Chiloé nos creemos autorizados para establecer en forma indubitable, que la papa ha nacido en los bosques del Sur de Chile, que de ahí la hallaron los conquistadores, y que allí se halla todavía silvestre (Alvarado, 1984)

Vavilov (1951) considera que la papa cultivada tuvo dos centros de origen: el centro de origen de Chiloé y el Centro de origen de Ecuador, Perú y Bolivia (Alvarado, 1984, Baudilio, 1982)

Hawkes (1967) en otro trabajo manifiesta que la región del Lago Titicaca sería el centro de origen de la papa cultivada porque allí existe gran número de especies, lo mismo que de variedades cultivadas, allí habría nacido la agricultura más primitiva basada en el cultivo de la papa y otras plantas tuberosas, mientras que el maíz no se introdujo al cultivo sino más tardíamente (Alvarado, 1984)

La papa fue introducida a España a mediados del siglo XIV como ejemplar curioso, cultivado en pequeñas huertas, sin fines económicos. Con el transcurso de los años la papa se empezó a consumir por la gran masa del pueblo de aquella época, carente de alimentos. (Baudilio, 1982).

Franceses, Italianos e Ingleses que visitaron España (particularmente botánicos), pronto se percataron de las posibilidades que ofrecía la planta y que podía cultivarse en casi todos los climas, lo que dio lugar a que, en poco tiempo, se cultivara en casi todos los países de Europa. De hecho, su cultivo no se intensificó hasta la primera década del siglo XIX, por haberse obtenido por cruces e investigación un cierto número de variedades, por el gran consumo que ya se hacía del tubérculo y por su gran producción que hacía de la planta una de las más rentables. A partir del siglo pasado, la papa ya se cultiva en todos los continentes en proporciones masivas debido a su gran consumo humano y a las necesidades de la industria que cada día aumenta paralelamente al desarrollo de la misma, representando una de las más importantes economías de la agricultura (Baudilio, 1982)

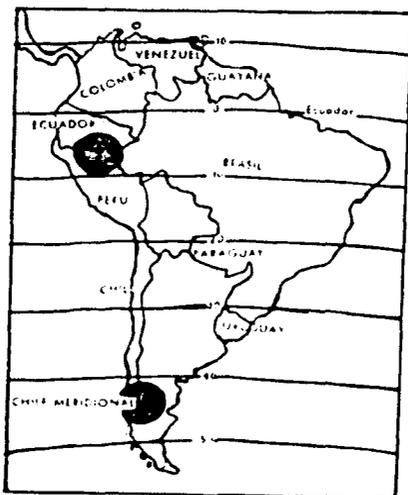


Figura 1: Centros de origen de la patata (Baudilio, 1982)

## 2.2. Clasificación Taxonómica.

La papa pertenece a la familia de las Solanáceas, se compone de un gran número de especies de las que se conocen más de 130 en regiones agrícolas de Estados Unidos, de México y de varios países centroamericanos. Se ubica en el género *Solanum* subgénero *Potatoe*. El subgénero abarca varias secciones, las papas cultivadas y silvestres están ubicadas en la sección *Petota* Dumort. Walp., sección *Tuberosum* y subsección *Potatoe* G. Don (subsección *Hyperbasarthrum* Bitt.) la subsección *Potatoe* comprende 18 series, de las cuales en la serie *Tuberosa* se localiza *S. tuberosum* y en la *Pinnatisecta* a. *S. cardophyllum* (Alvarado, 1989; Alvarez, 1988; Mena, 1985; Stewart, 1962; Cronquist, 1981).

Tabla 1. Clasificación botánica (Sánchez, 1980, citada por Alvarez, 1986)

Reino	Vegetal
División	Espermatofita
Subdivisión	Angiospermae
Clase	Dicotiledoneae
Orden	Tubiflorae
Familia	Solanaceae
Género	<i>Solanum</i>
Especie	<i>Tuberosum cardophyllum</i>

### 2.3. Importancia Nacional.

Solanum tuberosum es uno de los cultivos más importantes como fuente de alimentación humana superada en cuanto a superficie sembrada, como ya se ha mencionado solamente por gramíneas como trigo, arroz, maíz y cebada. En México de las 43 hortalizas que se cultivan, la papa ocupa uno de los principales lugares en importancia al promediar para el año de 1998 62,496 hectáreas cosechadas, proporcionando una producción total nacional de 1,280,882 toneladas de papa estimándose con un valor económico de 4,068 millones de pesos aumentando este valor para 1999 a 4,923 millones de pesos también la papa es el cultivo de mayor rendimiento por hectárea ya que proporciona un rendimiento promedio de 20,457 Ton/Ha (Alvarado 1984, Bautista 1996, INEGI 1997, inegi gob, 2001) (Tablas 2 y 3, gráficas 1 y 2)

Los principales centros productores de papa en México son Puebla, Estado de México, Sinaloa, Chihuahua y Veracruz (INEGI 1997)

### 2.4. Calidad y composición del tubérculo.

La calidad de un tubérculo de papa se determina por dos grupos de factores. El primero está relacionado con la apariencia física (siendo este el de mayor importancia en papas destinadas para consumo en fresco). Dentro de este grupo se consideran

- a) **Tamaño** Es el factor más importante y más fácilmente medible y aunque en México no existen tamaños oficiales, difieren las medidas en cuanto a la localidad en que se produce el tubérculo
- b) **Forma** Se prefieren tubérculos uniformes, sin protuberancias o deformaciones que disminuyan su buena apariencia

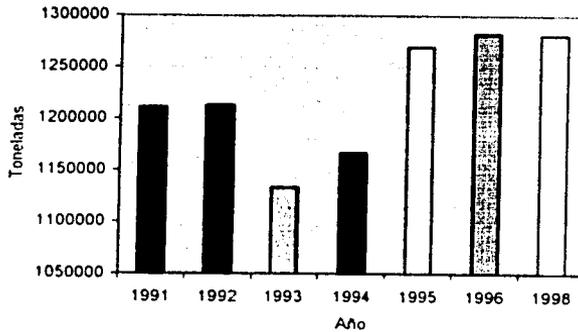
**Tabla No. 2 Producción de Papa anual**  
(INEGI, 1997; Inegi, gob. 2001)

Cultivo	Año	Superficie sembrada (Has)	Superficie cosechada (Has)	Valor (pesos, \$)
Papa	1991	75 376	74 598	1238 912 949
	1992	74 769	72 121	1 161 176 951
	1993	67 819	67 108	1 144 079 271
	1994	61 551	61 159	2 019 091 884
	1995	65 254	63 516	2 248 482 758
	1996	63 558	62 686	3 111 559 008
	1998	—	62496	4 068 000 000

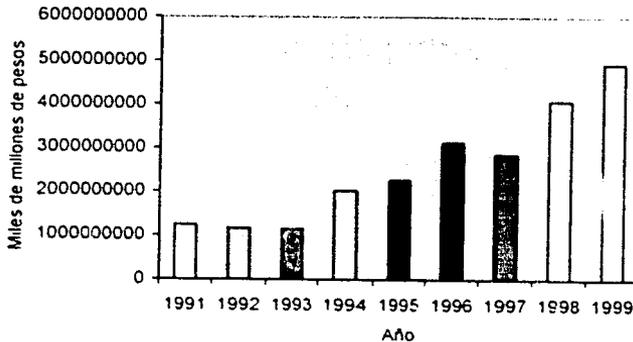
**Tabla No. 3 Superficie cosechada y rendimiento de Producción de papa**  
(INEGI, 1997; Inegi, gob. 2001)

Cultivo	Año	Superficie sembrada (has)	Producción (Toneladas)	Rendimiento (ton / has)	Valor (pesos, \$)
Papa	1991	74 598	1 211 105	16.235	1238 912 949
	1992	72 121	1 212 915	16.818	1 161 176 951
	1993	67 108	1 133 661	16.893	1 144 079 271
	1994	61 159	1 167 186	19.084	2 019 091 884
	1995	63 516	1 269 070	19.980	2 248 482 758
	1996	62 686	1 282 365	20.457	3 111 559 008
	1997	—	—	—	2 847 000 000
	1998	—	1 280 882	—	4 068 000 000
	1999	—	—	—	4 923 000 000

**Grafica No. 1 Produccion de Papa anual  
(Inegi.gob,2001)**



**Grafica No. 2 Valor monetario de la produccion  
de papa anual (Inegi.gob,2001)**



- c) **Sanidad:** Que no presente daños por insectos, pudrición, etc.
- d) **Apariencia de la piel (cutícula):** debe ser tersa, clara, entera, sin rajaduras, ni partidas
- e) **Color:** El color de la variedad

El segundo grupo de factores que determina la calidad es el relacionado con la composición química del tubérculo (de importancia principalmente en papas destinadas para la industria). Entre los factores principales están los siguientes:

- a) **Contenido de azúcares:** Que tenga bajas concentraciones de azúcares, esto ayuda a un buen sabor y fritura de la papa
- b) **Contenido de materia seca:** Entre más altos sea el contenido, menor será el consumo de aceite para freír
- c) **Decoloración después del pelado y cambios de color:** estos son afectados por el pH (Bautista 1996)

En las siguientes tablas se resume la composición química de los tubérculos de la papa blanca, los cuales son comparativos a cualquier otra especie de papa comestible

Tabla 4. Análisis proximal de papa blanca (Talburtt, 1987)

Componente	% Promedio	Intervalo(%)
Agua	77.5	63.2 - 86.9
Sólidos totales	22.5	13.1 - 36.8
Proteínas	2.0	0.7 - 4.6
Grasas	0.1	0.02 - 0.96
<b>Carbohidratos</b>		
Total	19.4	13.3 - 30.53
Fibra cruda	0.6	0.17 - 3.48
Cenizas	1.0	0.44 - 1.9

Tabla 5 Composición de cenizas de papa blanca (Talbur, 1987)

Componente	% Promedio	Intervalo (%)
K <sub>2</sub> O	56	43.95 - 73.61
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	15	6.83 - 27.14
SO <sub>3</sub>	6	0.44 - 10.69
MgO	4	1.32 - 13.58
Na <sub>2</sub> O	3	0.07 - 16.93
CaO	1.5	0.42 - 8.19
SiO <sub>2</sub>	1	0.16 - 8.11

Tabla 6. Composición de aminoácidos de la patatina (Axtmayer, 1992)

Aminoácidos	% Promedio
Alanina	4.9
Leucina	12.2
Cisteina	4.4
Acido glutámico	4.6
Tirosina	4.3
Fenilalanina	3.9
Prolina	3.0
Arginina	4.2
Lisina	3.3
Histidina	2.3
Valina	1.1

## **2.5. Solanum tuberosum.**

### **2.5.1. Distribución geográfica.**

El cultivo de la papa, en la actualidad se práctica en casi todo el mundo, por lo que para delimitar a las especies en estudio, se trata su distribución en el continente Americano, pncipalmente en México

En México se localizan 33 especies de la subsección hyperbasarthrum y de la subsección basarthrum, se encuentran 7 especies (Stewart, 1962)

En cuanto a otros países de América se localizan en general en E U A 5 especies, en Guatemala 14 especies, en Honduras 2 especies, en El Salvador 2 especies, en Costa Rica 8 especies, en Panamá 4 especies, en Colombia 19 especies, en Venezuela 10 especies, en Ecuador 23 especies, en Perú 70 especies (Ver figuras 2 y 3) (Stewart, 1962)

Ubicándose a S. cardiophyllum en la región geográfica que abarca desde la parte central de la Republica Mexicana hasta la parte central de los Estados Unidos de América(ubicada en la sene pinnatisecta de la figura 4), y S. tuberosum ubicada pncipalmente en la parte central de la Republica Mexicana (ubicada en la sene tuberosa de la figura 4) (Bradsnaw, 1994)

### **2.5.2. Descripción botánica y características importantes.**

La papa es una planta suculenta, herbácea y anual por su parte aérea, de tipo arbustivo alcanza una altura entre 40 y 80 cm Su desarrollo y crecimiento depende, principalmente de factores genéticos y condiciones ambientales El ciclo de vida es de 3 hasta 5 meses Es perenne



**Figura 2** Distribución de la sección *Tuberosum* de *Solanum* en América del norte y central  
 1) Subsección *Hyperbasarthrum*, 2) Subsección *Basarthrum*, 3) *Solanum fendleri* (Stewart, 1962)



**Figura 3** Distribución de la sección *Tuberosum* de *Solanum* en América del Sur. 1) Subsección *Hyperbasarthrum*, 2) Subsección *Basarthrum*, 3) Serie *Commersoniana* y *Yungasensa*, 4) Serie *Etuberosa*, 5) *Solanum fernandeziana* (Stewart, 1962)

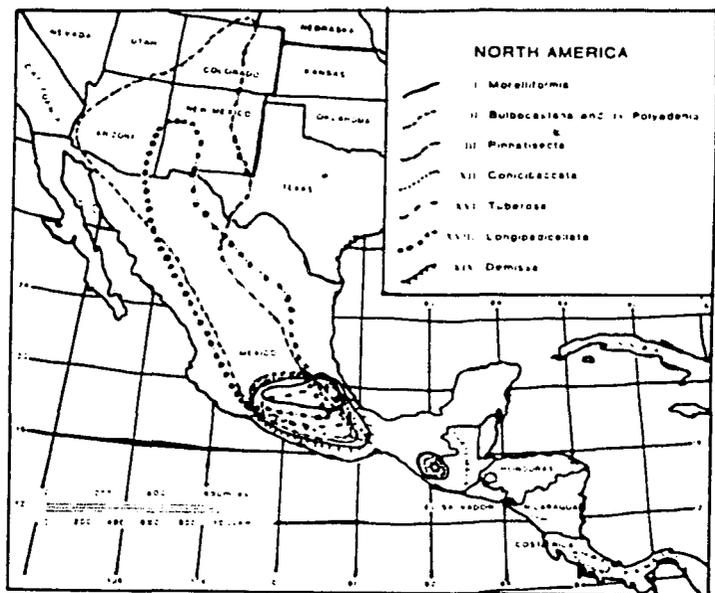


Fig. No. 4 Distribución de series de patatas en América del Norte y Central (Bradsnaw, 1994)

por sus tuberculos que son tallos modificados para el almacenamiento de almidon(subterranos) La parte exterior del tubérculo se denomina periderma, enseguida viene una franja estrecha dificilmente visible a simple vista, la corteza, ambas secciones forman la cascara. La medula o eje del tallo modificado se ramifica hacia las yemas del tubérculo. Los tuberculos se desarrollan al final de los estolones que nacen del tallo, según el numero de yemas que hayan brotado del tuberculo. Los tallos son de sección angular, en las axilas de las hojas con los tallos se forman ramificaciones secundarias (Alvarado, 1984; Álvarez, 1986; Mena, 1983)

Las hojas son alternadas, igual que los estolones. Las primeras hojas tienen el aspecto de simples, vienen despues las hojas compuestas, con 3-4 pares de hojuelas laterales y una terminal. Entre las hojuelas laterales hay hojuelas pequeñas de segundo orden(Alvarado 1984)

La inflorescencia es de tipo corimbo, compuesta de terminal con pedunculos largos. La flor es completa y los 5 pétalos se fusionan formando un tubo floral. Los frutos son redondos, suaves, con un diametro de aproximadamente 2 cm, las semillas del fruto son pequeñas y aplastadas (Alvarado 1989; Manual Agropecuario, Stewart, 1962)

En cuanto a sus características genéticas, Solanum tuberosum posee 48 cromosomas y S. cardiophyllum posee por lo general 24 cromosomas y son menos comunes variedades de 36 cromosomas. En cuanto a resistencia a patogenos, S. cardiophyllum es resistente a Phytophthora infestans y Lepidoptera decemlineata. S. tuberosum es resistente al virus A de la papa (Alvarado, 1984; Braosnaw, 1994; Mena, 1985).

## 2.6. FITOHORMONAS.

### 2.6.1. Definición de fitohormona y fitoregulator.

El desarrollo del vegetal, tanto en el aspecto de mero crecimiento como en el de diferenciación de órganos, se encuentra regulado por la acción de sustancias químicas que activan o deprimen determinados procesos fisiológicos, interactuando entre sí. Ha habido desacuerdo en el uso de términos al sintetizarse diversos compuestos de acción hormonal, sean iguales a los naturales, similares o por completo diferentes en su estructura química. Por lo que conviene fijar la terminología más aceptada de la siguiente forma:

- a) **Fitoregulator** es un compuesto químico capaz de intervenir en el metabolismo, que actúa en muy pequeñas concentraciones para activar o deprimir algún proceso del desarrollo. Puede ser natural o sintético.
- b) **Fitohormona** Es un fitoregulator natural que tiene acción en un lugar de la planta distinto de donde se produce.
- c) **Inhibidor** Es un fitoregulator capaz de deprimir algún aspecto del desarrollo, sea actuando de manera independiente o bien contrarestando la acción de una fitohormona (Bautista, 1996, Primo 1980, Rojas, 1983).

### 2.6.2. Clasificación de fitohormonas.

Las fitohormonas se clasifican en cinco grupos de compuestos conocidos que se encuentran de forma natural en las plantas, cada uno de los cuales exhibe propiedades de regulación del crecimiento de las plantas: se incluyen a las auxinas, citocininas (o citokinas), ácido abscísico, etileno y giberelinas, cada una con una estructura química particular y activas a muy bajas concentraciones dentro de la planta (Azcon, 1993, Hopkins, 1995, Bidwell, 1993, Primo, 1980,

Mientras que cada fitohormona ha sido implicada en un arreglo relativamente diverso de papeles fisiológicos dentro de las plantas, el mecanismo preciso a través del cual funcionan es aun desconocido. A continuación se describe brevemente la función fisiológica de cada grupo

a) **Auxinas:** Son sintetizadas en los tallos y ápices radiculares. Se caracterizan por su capacidad para estimular la elongación celular, en respuestas trópicas, iniciación radicular, diferenciación vascular. La principal auxina en las plantas es el ácido indolacético (IAA) (Bidwell 1993 Hopkins, 1995, Primo 1980, Rojas, 1982)

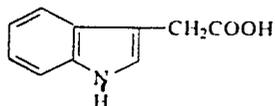
b) **Citocininas** Son compuestos N<sup>6</sup>-substituidos derivados de la adenina, caracterizados por su capacidad para estimular la división celular, movilización de nutrientes, regulación de polirribosomas. La kinetina (N<sup>6</sup>-furfurilamino purina) fue la primer citocinina en ser descubierta. (Bidwell, 1993, Hopkins 1995)

c) **Acido Abscisico:** Es un compuesto involucrado principalmente en regulación de germinación de semillas, induciendo síntesis de proteína y regulando el estrés hídrico (Hopkins 1995)

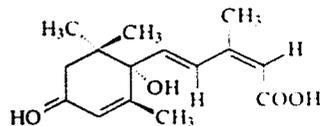
d) **Etileno** Es un hidrocarburo gaseoso  $H_2C=CH_2$ , aparentemente no es requerido para el crecimiento vegetativo normal, aunque puede tener un impacto significativo en el desarrollo de raíces y brotes. Parece que es sintetizado primariamente en respuesta a estrés (Hopkins 1995 Rojas 1982)

e) **Giberelinas** Este grupo de fitohormonas esta implicado en el desarrollo aéreo de la planta, siendo sintetizadas principalmente en zonas de crecimiento activo. Se abordara con

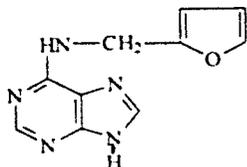
más detalle en el apartado siguiente las características y función de estas fitohormonas (Ver estructuras en la fig 5)



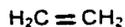
Acido 3 - Indol acético  
(IAA) Auxina



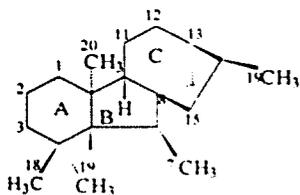
Acido Abscisico



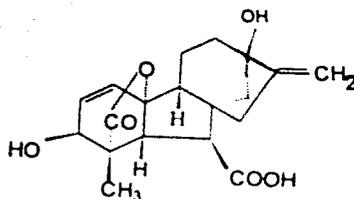
N<sup>6</sup>-Furfuril Adenina (Kinetina)



Etileno



Ent - Gibberelano



Acido Giberilico (GA<sub>3</sub>)

Figura 5. Estructura de hormonas vegetales. (Hopkins, 1995; gente, 2000).

### 2.6.3. Mecanismo de acción de fitohormonas.

Partiendo de los mecanismos generales de acción hormonal de los animales, hay tres preguntas fundamentales con relación a la acción hormonal en las plantas

- 1) ¿Hay proteínas de unión a hormonas de las plantas?
- 2) ¿La respuesta a la hormona involucra segundos mensajeros?
- 3) ¿Las fitohormonas alteran la expresión de genes?

Proteínas de unión a auxinas (ABP) han sido buscadas en tabaco y maíz. Se han reportado tres clases de proteínas de unión para el ácido indolacético (una auxina), en tejidos de callo de tabaco, dos están asociadas a membrana y una se encuentra en el citoplasma. De las proteínas asociadas a membrana, una de ellas tienen menor afinidad a auxinas que la otra, la proteína de menor afinidad, cabe mencionar, que tiene alta afinidad por el ácido naftilmalámico. (Un inhibidor de auxinas). La afinidad de la proteína de unión citoplasmática es varias veces mayor que la de las dos membranales. Se sugiere que la proteína de unión citoplasmática es probablemente un receptor con función similar a los receptores de hormonas esteroideas en animales. Las ABP asociadas a membrana han sido detectadas también en maíz, pero éste no presenta la ABP citoplasmática (Hopkins, 1995).

Los sitios de unión para citocininas no han sido extensamente estudiados, pero hay reportes de la caracterización de la proteína CBF-1 (factor de unión a citocinina -1), la cual parece estar asociada a ribosomas, sugiriéndose que el complejo CBF-1-citocinina juega un papel en la traducción de proteínas. En cuanto a proteínas de unión a giberelinas, ácido abscísico y etileno, no hay reportes confirmados de proteínas de alta afinidad a estas fitohormonas. (Hopkins, 1995).

En cuanto a segundos mensajeros presentes en plantas, hay reportes de la presencia de cAMP, pero no hay evidencia de que este juegue algún papel en la traducción de señales. Hay otros candidatos para segundos mensajeros en plantas, el calcio y fosfoinositóides. El calcio controla numerosos procesos fisiológicos en plantas, incluyendo elongación y división celular, secreción y

actividad de varias enzimas, acción hormonal y respuestas tácticas y tropicas, las plantas tambien contienen diversas proteínas de unión a calcio, aunque la calmodulina parece ser el tipo dominante muchas de las propiedades de la calmodulina de plantas son similares a las calmodulina aislada de cerebro de bovinos, entre estas similitudes tenemos similar peso molecular (17-19 kDa) composición de aminoácidos, propiedades de unión a calcio, ambas sufren cambios conformacionales similares inducidos por el calcio, por lo que estas similitudes pueden ser consideradas como evidencias de un papel en la traducción de señales (Hopkins, 1995)

Grandes cantidades de calcio son almacenadas en el retículo endoplasmico, mitocondria y vacuola central la concentración citoplasmica de calcio se mantiene baja por la acción de una ATPasa dependiente de calcio. La actividad de la ATPasa y consecuentemente la concentración de calcio citoplasmico esta posiblemente bajo el control de varios estímulos como luz y hormonas. En el citoplasma el calcio reacciona con la calmodulina, formando el complejo  $Ca^{2+}$ -calmodulina el cual activa por lo menos dos clases de enzimas, una NAD-cinasa y una protein cinasa (Ver figura

6)

Estímulos  
Luz, hormonas etc

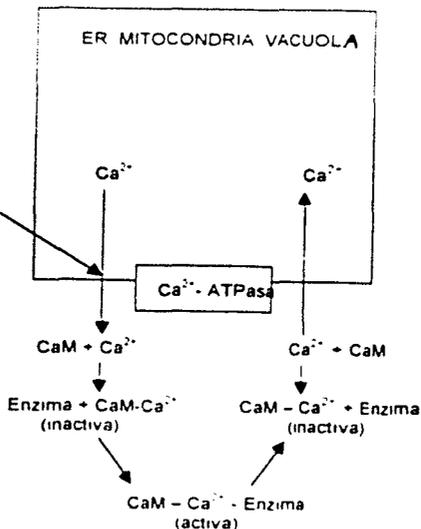


Figura 6. Calcio como segundo mensajero. El intercambio de calcio entre la vacuola y el citosol puede ser regulado por hormonas y otros factores como la luz. El  $Ca^{2+}$  citosólico forma un complejo activo con la calmodulina (CaM), (Hopkins, 1995).

Otro posible segundo mensajero en plantas es el sistema inositol trifosfato. En este sistema el complejo hormona-receptor puede actuar a través de una proteína G, para actuar a una enzima intramembral, la fosfolipasa C que cataliza la descomposición de fosfatidil inositol bifosfato a inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>), y diacilglicerol (DAG). El IP<sub>3</sub> y el DAG pueden funcionar como segundos mensajeros, ya que el IP<sub>3</sub> difunde en el citoplasma, estimulando la liberación de calcio (más probablemente de la vacuola) al mismo tiempo el DAG activa a una Proteínasa, llamada Proteínasa C, catalizando la reacción de fosforilación de proteínas, ambas vías conduciendo a una respuesta (Ver figura 7)

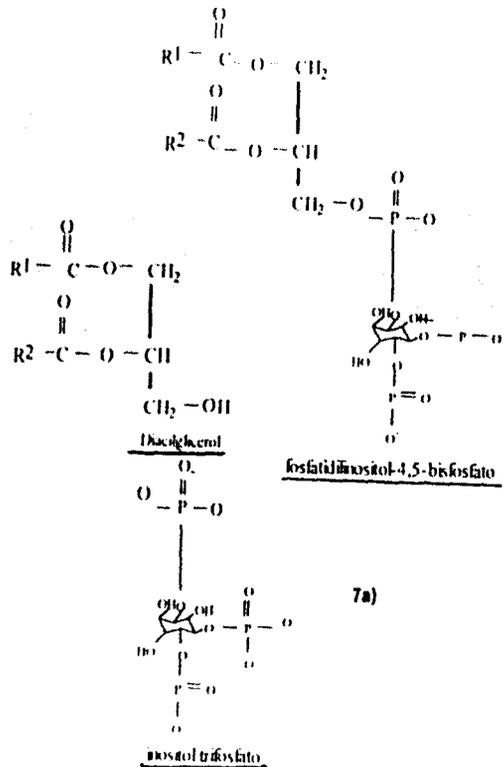
#### 2.6.4. Giberelinas.

El hongo *Gibberella fujikuroi*, produce en el arroz una enfermedad llamada en el Japon bakanae, que provoca una necrosis de diversos tejidos matando la planta. Uno de los primeros síntomas es el alargamiento de los tallos y las hojas de modo que las plantas enfermas sobresalen de las sanas. De este hongo se aisló una sustancia que estimula el crecimiento de las plantas, llamándosele giberelina posteriormente caracterizada en plantas superiores (Azcon 1993 Hopkins 1995)

Todas las giberelinas tienen la estructura anular básica el ent-giberelano (fig 7), las cuales están divididas en giberelinas de 20 y 19 carbonos (Azcon, 1993)

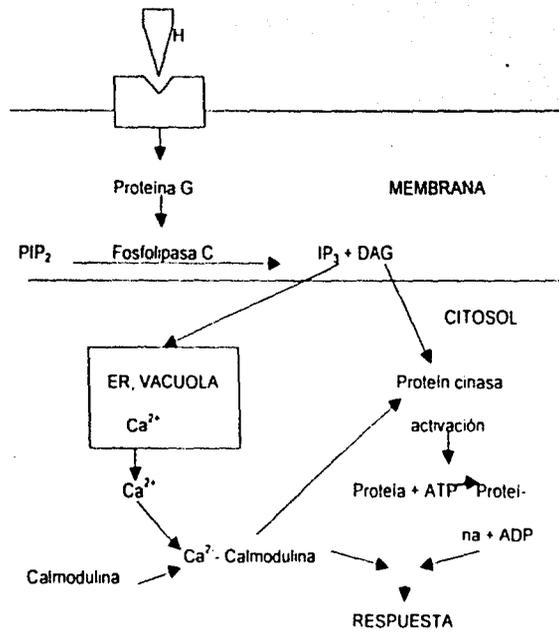
##### 2.6.4.1. Biosíntesis.

La síntesis de giberelinas (GAs) se ha demostrado principalmente en frutos y semillas en desarrollo y en menor medida en las regiones apicales de los brotes en crecimiento. También existen indicaciones de que las GAs pueden sintetizarse en las raíces aunque las evidencias en este caso son menores (Azcon 1993 Hopkins 1995)



7a)

7b)



**Figura 7.** 7a) Estructura química del fosfatidil inositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>), inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol(DAG). R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son ácidos grasos. 7b) modelo para el sistema inositol trifosfato. La hormona activa una enzima de membrana (Fosfolipasa C), la cual cataliza la ruptura del PIP<sub>2</sub> y DAG. El IP<sub>3</sub> difunde en el citoplasma donde estimula la liberación de calcio y formación del complejo Ca<sup>2+</sup>-calmodulina. El complejo puede estimular la respuesta directamente o a través de una protein cinasa. El DAG media la respuesta a través de la activación de una protein cinasa. (Hopkins, 1995)

Los primeros pasos en la ruta de síntesis son comunes al resto de compuestos terpenoides (un terpenoide es una sustancia compuesta por bloques o unidades de cinco átomos de carbono denominados isoprenos). Por conveniencia, la síntesis de giberelinas se divide en tres partes: a) conversión de ácido mevalónico a *ent*-kaureno b) conversión de *ent*-kaureno a GA<sub>12</sub>-aldehído, y c) rutas metabólicas a partir de GA<sub>12</sub>-aldehído (Azcon, 1993)

#### **a) Conversión de ácido mevalónico a *ent*-kaureno.**

El ácido mevalónico (MVA, que se sintetiza a partir de acetil CoA, es el primer compuesto de la ruta biosintética de los terpenoides (El MVA se fosforila en presencia de ATP y Mg<sup>2+</sup> y se descarboxila posteriormente para formar isopentenil pirofosfato (IPP), el primer compuesto isoprenoide de la vía. La isomercación (reversible) del IPP produce dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Ambos isómeros se condensan formando el intermediano de 10 carbonos geranyl pirofosfato (GPP). El GPP se condensa de nuevo con otra molécula adicional de IPP para dar farnesil pirofosfato (FPP). Este compuesto, junto con otra molécula de IPP, produce geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), que es el precursor de todos los diterpenos. La GGPP sintetasa una prenil transferasa soluble que requiere Mn<sup>2+</sup> es la enzima que cataliza estas tres últimas reacciones de condensación.

La transformación del GGPP a *ent*-kaureno, la forma enantiomérica del (+)-kaureno, está catalizada por la enzima kaureno sintetasa. Esta enzima es soluble y presenta dos actividades: la actividad A, que cataliza la síntesis del intermediano dicitídico copalil pirofosfato (CPP), y la actividad B que convierte el CPP en el diterpeno tetracíclico *ent*-kaureno (Azcon, 1993, Hopkins, 1995).

#### **b) Conversión de kaureno a GA<sub>12</sub>-aldehído.**

En esta parte de la vía, el grupo metilo (CH<sub>3</sub>) del carbono C-19 del *ent*-kaureno se oxida sucesivamente a CH<sub>2</sub>OH, CHO y COOH para dar respectivamente, *ent*-kaurenol, *ent*-kaurenal y

ácido *ent*-kaurenoico. Posteriormente, el ácido kaurenoico se hidroxila sintetizándose el ácido *ent*-7 $\alpha$ -hidroxikaurenoico. La primera GA producida, GA<sub>7</sub>-aldehído, se forma mediante contracción del anillo B por exclusión del C-7 del ácido *ent*-7 $\alpha$ -hidroxikaurenoico.

Las enzimas que catalizan la oxidación del kaureno son microsomales (a diferencia de las enzimas de la parte anterior de la ruta), son dependientes del sistema P-450 del citocromo y presentan características propias de las oxigenasas de función intermedia, puesto que requieren O<sub>2</sub> y NADPH (Azcon, 1993; Bidwell, 1993; Hopkins, 1995).

### ***c) Rutas metabólicas a partir de GA<sub>7</sub>-aldehído.***

La conversión de GA<sub>7</sub>-aldehído a otras giberelinas puede proceder por, al menos, tres vías principales. La vía de la 13-hidroxilación (todos los grupos presentan un grupo hidroxilo en la posición C-13); la vía de la 3 $\beta$ -hidroxilación (todos los miembros presentan un grupo hidroxilo en la posición 3 $\beta$ ); y la vía de la no-hidroxilación (vía de GAs que no presentan grupos hidroxilos en las posiciones 3 $\beta$  y 13). Estas tres rutas biosintéticas siguen una secuencia general de interconversiones paralelas. En algunos vegetales se han descrito otras rutas metabólicas que incluyen GAs hidroxiladas en la posición 11 $\beta$ , 12 (Azcon, 1993).

La ruta de la 13-hidroxilación es la vía predominante en la mayoría de las especies. La secuencia de conversiones de esta vía es la siguiente: GA<sub>7</sub>-aldehído se oxida en C-7 para dar el ácido dicarboxílico GA<sub>8</sub>, que posteriormente incorpora un grupo hidroxilo en C-13, transformándose en GA<sub>9</sub>; esta GA constituye el origen de la ruta de la 13-hidroxilación. GA<sub>9</sub> sufre dos oxidaciones sucesivas en el C-20 convirtiéndose primero en GA<sub>10</sub> (C-20 = CH<sub>2</sub>OH), y posteriormente en GA<sub>11</sub> (C-20 = CHO). En una ramificación lateral de la ruta metabólica principal, el C-20 de GA<sub>9</sub> puede ser oxidado de nuevo dando lugar a GA<sub>12</sub> (C-20 = COOH). Esta ramificación constituye un proceso de inactivación irreversible que produce compuestos tricarboxílicos sin actividad biológica. La ruta de la 13-hidroxilación continúa con la eliminación del C-20 de GA<sub>11</sub>, sintetizándose GA<sub>12</sub>, que es la primera GA C<sub>19</sub> de las rutas. La incorporación de un grupo hidroxilo de la posición 3 $\beta$  de GA<sub>12</sub> tiene

$GA_{19}$ , este compuesto posee elevada actividad biológica y se cree que es la hormona mayoritaria "verdadera" de la ruta de la 13-hidroxilación. En algunos vegetales como el maíz  $GA_{20}$  también se convierte aunque en menor proporción en  $GA_{19}$ , que es el precursor de  $GA_{13}$ , otra GA con elevada actividad biológica. Al final de la ruta, las GAs  $C_{19}$  se desactivan de forma irreversible mediante la 2 $\beta$ -hidroxilación. Así,  $GA_{20}$  y  $GA_{19}$  se transforman en los productos inactivos  $GA_{22}$  y  $GA_{21}$ , respectivamente. Las GAs 2 $\beta$ -hidroxiladas pueden ser oxidadas para formar productos catabólicos. Las GAs se conjugan covalentemente a otras moléculas menores, principalmente glucosa, formando los conjugados de GAs (Azcon, 1993; Bidwell, 1993).

La síntesis de GAs también puede proceder por la vía de la no-hidroxilación. Si  $GA_{19}$  "escapa" a la hidroxilación inicial en la posición C-13, se obtiene una vía paralela a la de la 13-hidroxilación pero compuesta por miembros no hidroxilados. En esta vía,  $GA_{19}$  se transforma sucesivamente en  $GA_{18}$ ,  $GA_{14}$ ,  $GA_{11}$  (y  $GA_{22}$ ) y en  $GA_{10}$ . En semillas de manzana  $GA_{10}$  puede convertirse además en  $GA_7$  mediante deshidrogenación de las posiciones C-2,3 y posterior a 3 $\beta$ -hidroxilación, es un proceso paralelo a la síntesis de  $GA_{13}$  a partir de  $GA_{20}$  descrito en la ruta de la 13-hidroxilación. Al igual que  $GA_{13}$ ,  $GA_{10}$  también es una GA muy activa. De igual modo, la vía de la 3 $\beta$ -hidroxilación ( $GA_{13}$ ,  $GA_{12}$ ,  $GA_4$  (y  $GA_{15}$ ) y  $GA_{14}$ ) se obtienen cuando los primeros miembros de la ruta de la no-hidroxilación incorporan un grupo en la posición 3 $\beta$  (Azcon, 1993; Bidwell, 1993).

Las tres rutas anteriores están conectadas entre sí mediante hidroxilaciones (3 $\beta$  ó 13) a otros niveles distintos de los descritos (ver fig. 8 y 9).

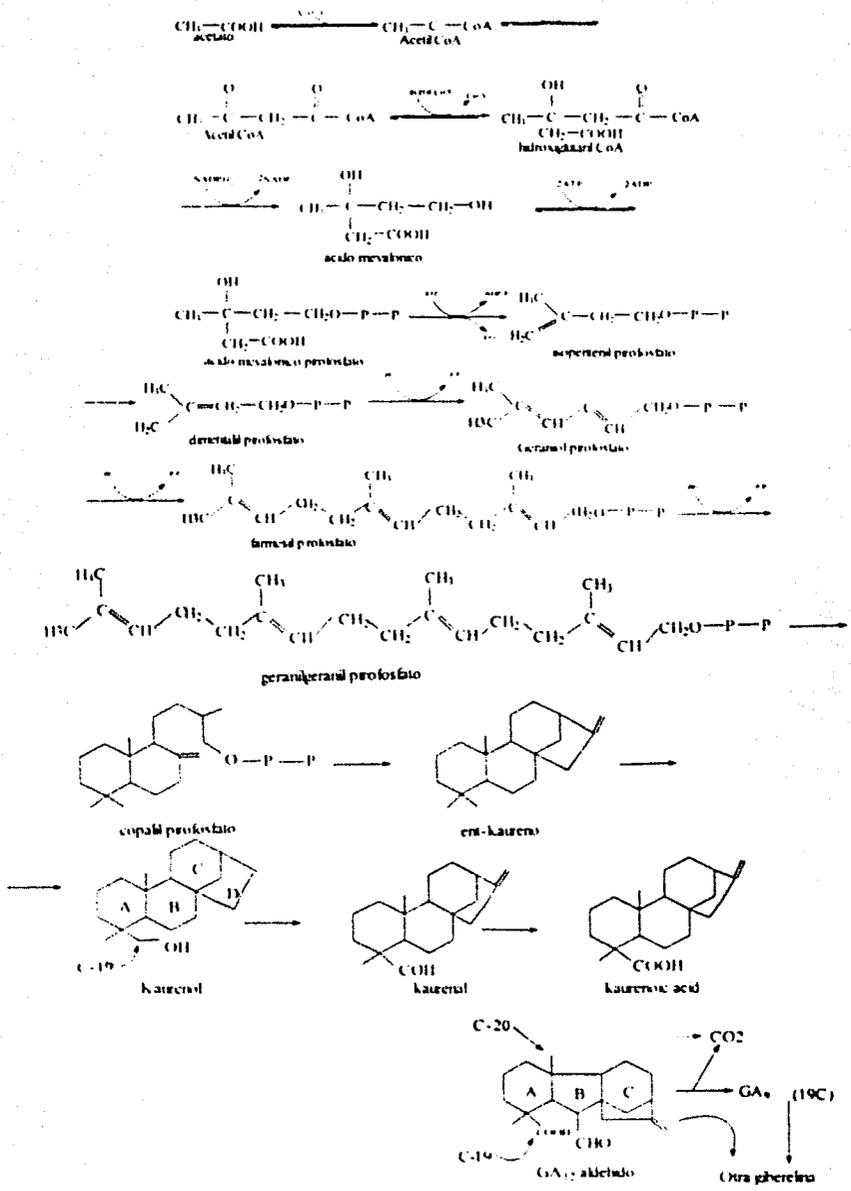


Figura 8. Ruta biosintética de GAs a partir de acetato. (Bidwell, 1993).

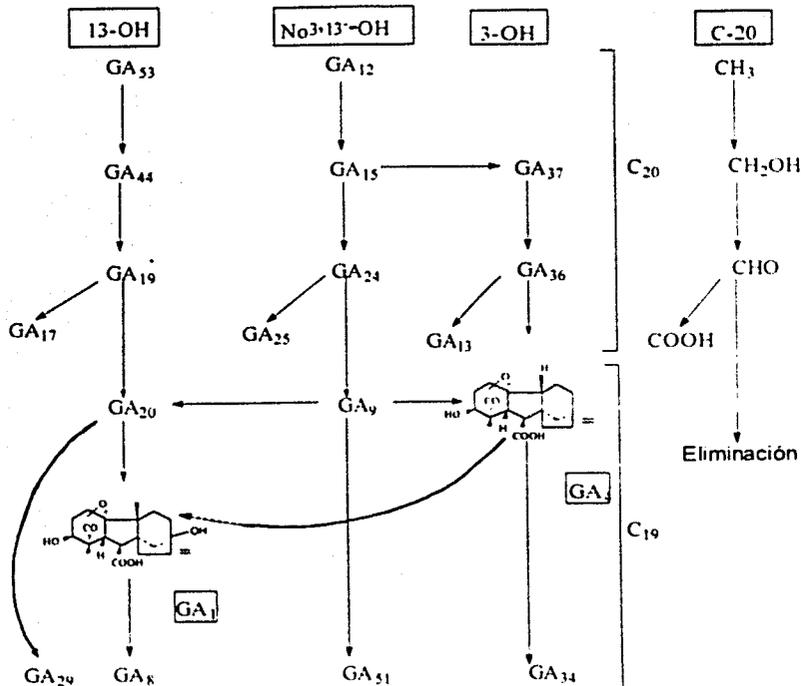


Figura 9. Rutas mayoritarias de conversión de GAs en los tejidos de *Arabidopsis Thaliana*  
 13-OH - Ruta de la 13-hidroxilación. Los miembros de esta ruta presentan un grupo hidroxilo en la posición C-13. No 3,13-OH - Ruta de la no hidroxilación. Los miembros de esta ruta no presentan grupos hidroxilos ni en las posiciones 3 $\beta$  ni en la 13. 3-OH - Ruta de la 3 $\beta$ -hidroxilación. Los miembros de esta ruta presentan un grupo hidroxilo en la posición 3 $\beta$ . C-20 - Estado de oxidación del C-20 de las GAs C<sub>20</sub> en lasd tres rutas. (Azcon, 1993).

## 2.6.4.2. Efectos fisiológicos en el desarrollo de la planta.

El efecto más notable de aplicar giberelinas (GAs) exógenas es la estimulación del crecimiento. Los tallos de las plantas se vuelven generalmente mucho más largos, se estimula el crecimiento en los internodos más jóvenes y frecuentemente se incrementa la longitud de los internodos individuales, mientras el número de nudos permanece constante. Las GAs pueden provocar la floración en muchas especies que requieren temperaturas frías. La aplicación de GAs a los tallos produce un incremento pronunciado de la división celular en los meristemos subapicales y provoca el crecimiento rápido de plantas arrocetadas. Este veloz crecimiento rápido es resultado tanto del número mayor de células formadas como de aumento en expansión de las células individuales. Estos efectos de las GAs pueden ser debidos a un efecto sobre el ciclo celular: al promover la replicación del DNA observándose una reducción del tiempo del ciclo (fig. 10) (Bidwell, 1993; Devlin, 1983; Salisbury, 1992; Weaver, 1976; Wilkins, 1984).

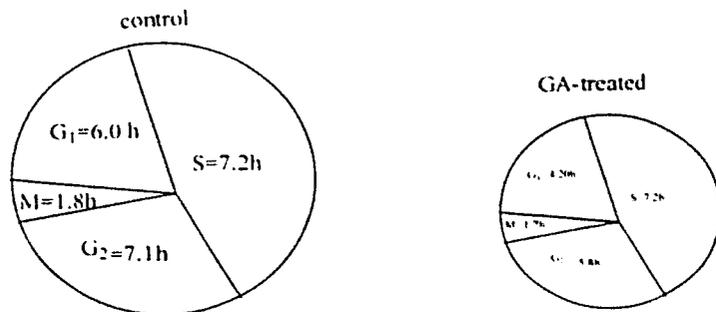


Figura 10. Efecto de las GAs en la duración en horas de las fases G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, M del ciclo celular de plantas de sandía. (Wilkins, 1984)

Específicamente sobre el efecto de expansión celular, el mecanismo no se conoce bien, pero hay varias teorías. Las GAs pueden inducir la expansión mediante la inducción de

enzimas que debilitan las paredes celulares ya que al dar tratamiento con giberelinas provoca la síntesis de enzimas proteolíticas. Otro mecanismo propuesto es que provocan la expansión celular por hidrolizar el almidón como resultado de la producción de alfa-amilasa pudiendo incrementar la concentración de azúcares y elevando así la presión osmótica de modo que el agua entra a la célula y tiende a expandirla.

Uno de los ejemplos mejor conocidos de la inducción de enzimas debida a las giberelinas es la producción de alfa-amilasa provocada en las aleuronas de semillas (principalmente estudiado en cebada). Los embriones de la cebada producen una GA que se traslada al interior de las capas de aleurona de los endospermos donde se produce la síntesis de enzimas. Estas enzimas incluyen amilasas, proteasas y lipasas que descomponen rápidamente las paredes celulares de los endospermos e hidrolizan después los almidones y proteínas liberando así los nutrientes y energía necesaria para el desarrollo de los embriones. Se ha demostrado que  $GA_3$  provoca la síntesis de novo de alfa-amilasa (Weaver 1976; Wilkins 1984).

En resumen se sostiene la teoría que las GAs tienen relación con la síntesis de RNA, dirigida por el DNA en el núcleo, y así puede ejercer su efecto sobre la expansión celular, así como sobre otras actividades de crecimiento y desarrollo vegetal.

Ahora en caso específico de las GAs en tubérculos de papa se sostiene que GA esta correlacionado con la inhibición de la tuberización también ha sido mostrado que reduce el rendimiento del tubérculo por lo que existe la teoría de que GA afecta la distribución de carbohidratos a favor del tallo. Ha sido demostrado que  $GA_3$  tiene un efecto inhibitorio de la acumulación de patatina (proteína mayoritaria de la papa es una glicoproteína de 40KD) utilizando un sistema de cultivo de estolones in vitro el cual dio como resultado que al cultivar estolones en un medio inducido (6% sacarosa y 10  $\mu$ M kinetina) el 75% de los estolones formo tubérculos con 3mg de patatina por gramo de peso fresco en medio no inducido la cantidad de patatina fue de 500  $\mu$ g por gramo de peso fresco y en un medio con 3  $\mu$ M de  $GA_3$  + 10  $\mu$ M de kinetina se obtuvo una cantidad menor de 10  $\mu$ g de patatina (Beiknap 1994; Grierson 1991).

## 2.7. Paclobutrazol.

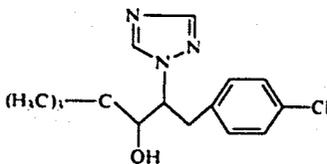
### 2.7.1. Descripción Química.

Nombre Común Paclobutrazol

Nombre Químico (IUPAQ): (2RS, 3RS)- 1-(4-clorofenil)-4-dimetil-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)pentan-3-ol

Fórmula empírica  $C_{15}H_{20}ClN_3O$

Estructura química



Apariencia sólido blanco cristalino

Punto de fusión 165-166°C

Densidad 1.22 g/cm<sup>3</sup>

Solubilidad en agua 35mg/lit, metanol 15%, propilenglicol 5%, acetona 11% ciclohexanona

18% cloruro de metileno 10% hexano 1% y Xileno 6%

Presión de vapor a 20°C 1X10<sup>6</sup>Pa

Peso molecular: 293.80

Estabilidad: estable a temperaturas inferiores a 50°C por un periodo de 8 meses (Merck Index, 1996 Technical data, 1997)

### **2.7.2. Mecanismo de acción bioquímico.**

El paclobutrazol al ser aplicado por vía foliar o bien dirigido a suelo se absorbe a través de los tejidos de tallos, hojas o raíces siendo transportado de forma acropetala por medio del xilema hasta donde ejerce su acción (lugares en donde hay síntesis de giberelinas), principalmente en los meristemas subapicales (Technical data, 1997).

El efecto inhibitorio de la síntesis de giberelinas se da por medio de la interacción con el citocromo P-450 inhibiendo las monooxigenasas dependientes de este sistema y por tanto, la oxidación del kaureno a kaurenol, kaurenal y ácido kaurenico (Azcon, 1993, Technical data, 1997) (Figura 11).

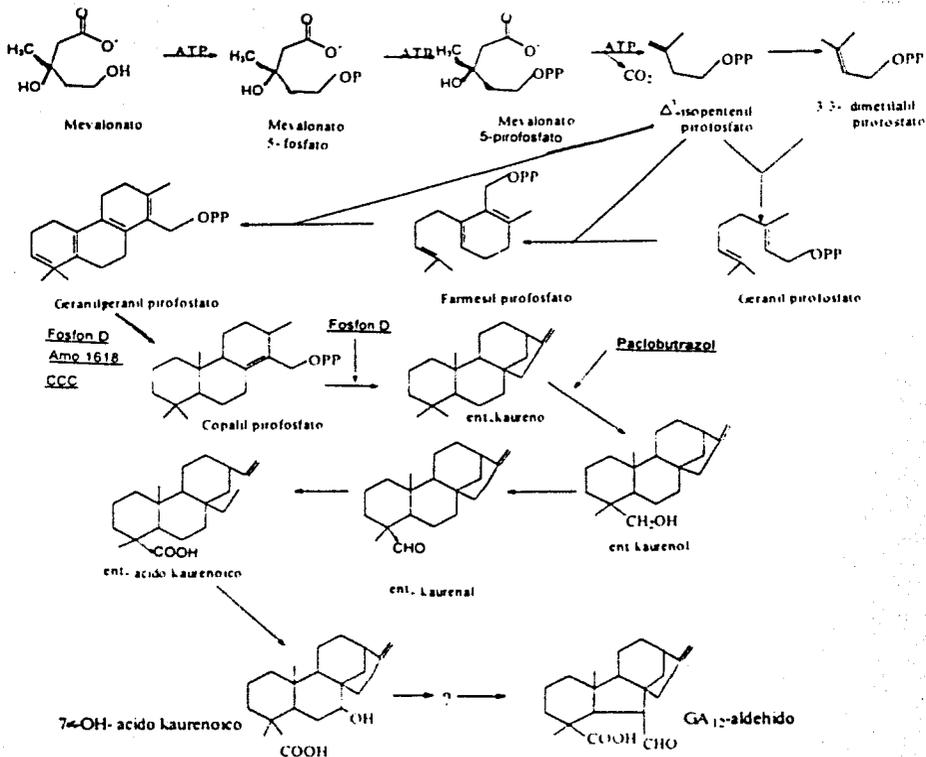


Figura No 11. Mecanismo de acción del paclobutrazol.

### 2.7.3. Toxicología.

El paclobutrazol en su presentación comercial (bonzi: Cultar 25 SC) es de muy baja toxicidad a las especies acuáticas aves y mamíferos no se ha detectado fitotoxicidad en su uso a las dosis y épocas recomendadas (Rosenstein 1996 Technical Data 1997)

Las dosis no tóxicas de paclobutrazol en ratones son de 15 mg/kg en ratas es de 10 mg/kg en perros de 75 mg/kg y en hombres de 0 a 0.1 mg/kg (FAO 1988)

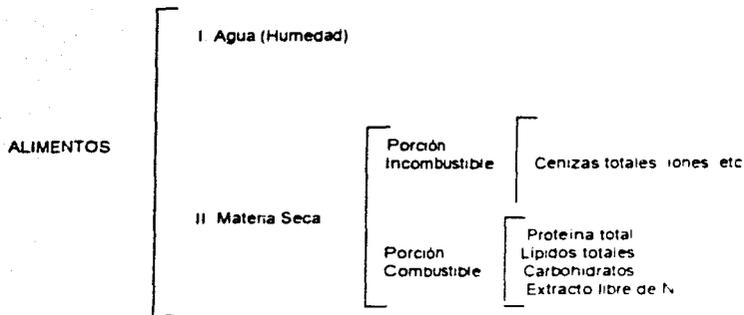
En caso de intoxicación por ingestión accidental no provocar vómito, efectuar lavado gástrico teniendo cuidado de no aspirar los contenidos gástrico, dar tratamiento sintomático y de sostén. Si hubiera contacto con los ojos o la piel, se recomienda lavarse rápidamente con abundante agua durante 10 a 15 minutos (Rosenstein, 1996; Technical Data, 1997).

Como medidas de protección al ambiente se recomienda destruir el envase rompiéndolo para enterrarlo. El envase PET biodegradable puede ser quemado, en el caso de CULTAR 25 5C), transportar y almacenar en lugar seguro, seco y ventilado, no junto a productos alimenticios, ropa o forrajes, manteniendo herméticamente cerrado el envase (Rosenstein, 1996).

## **2.8. Análisis bromatológico.**

### **2.8.1. Definición y utilidad.**

El análisis químico bromatológico o químico proximal es una herramienta esencial para valorar el valor nutritivo de un alimento, el contenido o tipos de nutrientes, pues se determinan mediante él, cuantitativamente, los principios inmediatos que lo constituyen. Si se tratara de determinar todos y cada uno de los elementos constitutivos de un alimento sería una larga y compleja tarea, por lo tanto los procedimientos empleados comúnmente en los análisis bromatológicos, consisten en determinar grupos de sustancias que se asemejan en cualidades o composición, llamados principios inmediatos, los cuales son (Flores, 1983; Morfin):



Se llaman principios inmediatos por ser los primeros en identificarse en los procesos de desintegración analítica en el laboratorio (Flores, 1983)

### 2.8.2. Determinaciones que constituyen un análisis bromatológico.

Todos los alimentos están constituidos por dos componentes fundamentales que son el agua y la materia seca. El agua o humedad se determina comúnmente por desecación mediante evaporación. La porción combustible de la materia seca está a su vez constituida por compuestos orgánicos que se distribuyen en dos grupos: los nitrogenados y no nitrogenados. En el primer grupo se encuentran las proteínas que son determinadas principalmente por el método Kjeldahl o biuret; los segundos se subdividen en otros dos grupos: lípidos, los cuales son determinados mediante el método Goldfish (extracción cloroformo-metano); Soxhlet y los carbohidratos-fibra cruda (almidón, azúcares reductores, etc.) determinados por procesos de digestión y cuantificación yodométrica, métodos espectrofotométricos, etc. También se consideran en varios casos para cuantificación a

carotenos, pigmentos carotenoides, vitaminas, clorofila, cenizas, distintos iones, etc. (Flores 1983, Osborne, 1986, Pearson, 1986)

## 2.9 Análisis estadístico.

### 2.9.1 Análisis de Varianza.

El análisis de varianza se define como una técnica en la que la varianza total de un conjunto de datos se divide en varios componentes y cada uno de ellos se asocia a una fuente específica de variación de manera que durante el análisis es posible encontrar la magnitud con la que contribuye cada una de esas fuentes en la variación total. El análisis de varianza se utiliza para dos propósitos: estimar y probar hipótesis respecto a varianzas poblacionales; estimar y probar hipótesis respecto a las medias de las poblaciones (en este caso se aplica el segundo propósito) (Wayne, 1995; Scheffé, 1981).

El tipo más simple de análisis de varianza es el que se conoce como análisis unilateral de varianzas para el cual se investiga una sola fuente de variación o factor (esto es una extensión a tres o más muestras del procedimiento de la prueba  $t$  de Student). Este tipo de análisis se utiliza para probar la hipótesis nula que indica que tres o más tratamientos son igualmente efectivos. El experimento se diseña de tal forma que los tratamientos de interés se asignan de manera aleatoria a los individuos u objetos en los que se han de realizar las determinaciones para medir la efectividad de los tratamientos. Por esta razón el diseño se llama diseño experimental completamente aleatorio (o al azar) (Wayne, 1995; Scheffé, 1981).

Los cálculos efectuados para el análisis de varianza se resumen en la siguiente tabla

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón de variancia
Entre los grupos	$SC_{entre} = \sum_{j=1}^k n_j (\bar{x}_{.j} - \bar{x}_{..})^2$ $= \sum_{j=1}^k \frac{T_{.j}^2}{n_j} - \frac{T_{..}^2}{N}$	$k - 1$	$CM_{entre}$ $= SC_{entre} / (k - 1)$	$R.V. = \frac{CM_{entre}}{CM_{dentro}}$
Dentro de los grupos	$SC_{dentro} = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x}_{.j})^2$ $= \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} x_{ij}^2 - \sum_{j=1}^k \frac{(T_{.j})^2}{n_j}$	$N - k$	$CM_{dentro}$ $= SC_{dentro} / (N - k)$	
Total	$SC_{total} = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x}_{..})^2$ $= \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} x_{ij}^2 - \frac{T_{..}^2}{n}$	$N - 1$		

Tabla No. 7. Tabla de análisis de variancia para el diseño completamente aleatorizado.

(Wayne, 1995).

## 2.9.2. Técnica de Student-Neumann-Kuels.

Las técnicas de recorridos múltiples están basadas en el concepto general de que cuando aumenta el número de grupos de tratamientos hay mayor probabilidad de que los extremos presenten una diferencia significativa falsa cuando son comparados con la técnica t de Student (Scheffler, 1981)

La técnica de Student-Neumann-Kuels o SNK, suministra una especie de escala móvil de diferencias mínimas que deben ser igualadas o excedidas para establecer la significación (Flores 1995 Scheffler, 1981)

El procedimiento es el siguiente

- a) Se ordenan las medias en forma ascendente.

$$x_1 \quad x_2 \quad x_3 \quad \dots \quad x_n$$

- b) Se calcula una estimación del error estándar

$$S_e = \frac{S^2}{n}$$

$$S^2 = \frac{q_2}{n-t}$$

c) Se forma la tabla

K	2	3	4.....r
Rp			
S <sub>rp</sub> (DMS)			

Donde

Rp = Valor de tablas (r o q)

S<sub>rp</sub> = Diferencias mínimas significativas(DMS)

d) Se compara la diferencia entre las diferentes parejas de medias con su respectiva DMS, aquellas parejas de medias cuya diferencia sea mayor que DMS se dice que difieren significativamente

## 2.10. Cromatografía de gases.

### 2.10.1 Fundamento y descripción.

En cromatografía de gas (GC), la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elusión se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte, y a diferencia de la mayoría de los tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito, su única función es la de transportar el analito a través de la columna. Existen dos tipos de cromatografía de gases: la *cromatografía gas-sólido* (GSC) y la *cromatografía gas-líquido* (GLC) (Skoog, 1998, Willard, 1988).

La *cromatografía gas-sólido* se basa en una fase estacionaria sólida en la cual se produce la retención de los analitos como consecuencia de la adsorción física. La *cromatografía gas-sólido* ha tenido una aplicación limitada debido a la retención semipermanente de las moléculas activas o polares y a la obtención de picos de elusión (Skoog, 1998, Willard, 1988).

La *cromatografía gas-líquido* se basa en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte (Skoog, 1998).

### 2.10.2. Equipo para cromatografía de gases.

Los componentes básicos de un instrumento para la cromatografía de gases se muestran en la figura 12.

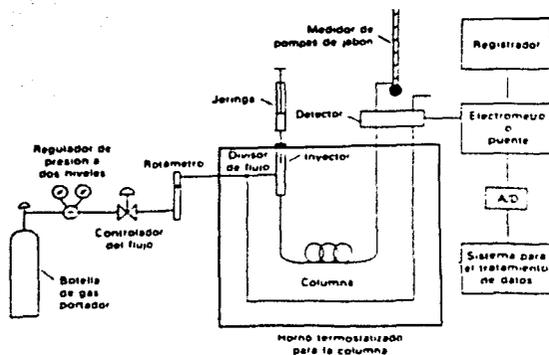


Figura. 12. Representación esquemática de un cromatógrafo de gases (Skoog,1998).

#### a) Gas portador.

Entre los gases portadores, que deben ser químicamente inertes, se encuentran el helio, argón, nitrógeno, dióxido de carbono y el hidrógeno. La elección del gas está con frecuencia determinada por el tipo de detector que se utiliza. Con el suministro del gas se encuentran asociados los reguladores de presión, manómetros y medidores de flujo. Además, el sistema de gas portador contiene a menudo un tamiz molecular para eliminar el agua u otras impurezas (Skoog 1998, Willard 1988).

Los caudales se controlan normalmente mediante un regulador de presión. El rango de presiones de entrada normalmente oscila de 10 a 50 psi (por encima de la presión del ambiente), lo que conduce a caudales de 25 a 150 mL/min con las columnas de relleno, y de 1 a 25 mL/min en las columnas capilares (Skoog 1998).

## **b) Sistema de inyección de muestra.**

El método más común de inyección de muestra implica el uso de una microjeringa para inyectar una muestra líquida o gaseosa a través de un diafragma o «septum» de goma de silicona, en una cámara de vaporización instantánea situada en la cabeza de columna, la cámara normalmente está a unos 50°C por encima del punto de ebullición del componente menos volátil de la muestra (Skoog, 1998, Willard, 1988)

Para las columnas analíticas ordinarias, el tamaño de muestra varía desde unas pocas décimas de microlitro a 20 µL. Las columnas capilares exigen muestras mucho menores ( $\sim 10^{-3}$  µL), en estos casos se emplea un divisor de la muestra que permite pasar a la columna solamente una pequeña fracción de la muestra, desechándose el resto. Las muestras sólidas se introducen como disoluciones (Skoog, 1998)

## **Configuraciones de columna y hornos.**

En cromatografía de gases se usan dos tipos generales de columnas, las empaquetadas, o de relleno y las tubulares abiertas, o capilares. Las columnas de relleno actuales se fabrican con tubo de vidrio, metal (acero inoxidable, cobre, aluminio) o de Teflón, con una longitud característica de 2 a 3 m y un diámetro interno de 2 a 4 mm. Estos tubos se empaquetan densamente con un material de relleno sólido, finamente dividido y homogéneo, que se recubre con una delgada capa (0.05 a 1 micrometro) de la fase estacionaria líquida. Con el objeto de poder introducirlos en un horno termostático, los tubos se configuran en forma helicoidal con un diámetro aproximado de unos 15 cm (Willard 1988)

**Las columnas capilares o abiertas**, son de dos tipos básicos, denominados **capilares de recubierta (WCOT)** y **capilares con soporte recubierto (SCOT)**. Las columnas de pared recubierta son simplemente tubos capilares con la pared interna recubierta de una fina capa de fase estacionaria. En las columnas abiertas con soporte recubierto, la superficie interna del capilar está revestida de una fina capa ( $\sim 30 \mu\text{m}$ ) de un material soporte, tal como tierra de diatomeas. Este tipo de columnas contiene varias veces la fase estacionaria de una columna capilar de pared recubierta y, por tanto, tienen una mayor capacidad de carga. Generalmente, la eficacia de una columna SCOT es menor que la de una columna WCOT, pero es sensiblemente mayor que la de una columna de relleno (Skoog 1998, Willard, 1988).

Al principio las columnas WCOT se construían de acero inoxidable, aluminio, cobre o plástico, posteriormente se utilizó el vidrio. Con frecuencia las columnas de vidrio se trataban químicamente para transformarlas en una superficie rugosa, donde la fase estacionaria se unía más fuertemente. Las nuevas columnas WCOT, que se introdujeron, son *columnas tubulares abiertas de sílice fundida* se fabrican a partir de sílice especialmente purificada con un contenido mínimo de óxidos metálicos (Skoog 1998, Willard 1988).

En la tabla 8 (mostrada en la siguiente página) se comparan las características de funcionamiento de las columnas capilares de sílice fundida con las de otros tipos de columnas como las de pared recubierta, y también las de soporte recubierto y las de relleno.

Tabla 8.

Propiedades y características de las columnas para cromatografía de gases (Skoog, 1998).

Parámetros	Tipo de columna*			
	FSOT	WCOT	SCOT	Relleno
Longitud. m	10-100	10-100	10-100	1-6
Diámetro interno. mm	0.1-0.53	0.25-0.75	0.5	2-4
Eficacia. platos/m	2000-4000	1000-4000	600-1200	500-1000
Tamaño de la muestra. ng	10-75	10-1000	10-1000	10-10 <sup>6</sup>
Presión relativa	Baja	Baja	Baja	Alta
Velocidad relativa	Rápida	Rápida	Rápida	Lenta
Inactividad química	Mejor			Peor
¿Flexible?	Si	No	No	No

\* FSOT. Columna capilar de sílice fundida  
 WCOT. Columna capilar de pared recubierta  
 SCOT. Columna capilar con soporte recubierto

La temperatura de la columna es una variable importante que para un trabajo preciso ha de regularse a las décimas de grado, por ello la columna normalmente se introduce dentro de un horno termostalizado. La temperatura óptima de la columna depende del punto de ebullición de la muestra y del grado de separación requiendo. En la práctica con una temperatura igual o

ligeramente superior al punto de ebullición promedio de la muestra, se obtienen tiempos de elusión razonables (2 a 30 min.) (Willard, 1988).

**c) La fase estacionaria.**

En la columna cromatográfica de gas-líquido las propiedades deseables para una fase líquida inmobilizada incluyen (1) *baja volatilidad* (idealmente, el punto de ebullición del líquido debe ser al menos 100°C mayor que la temperatura de trabajo máxima de la columna), (2) *estabilidad térmica* (3) *químicamente inerte* (Skoog, 1998)

La Tabla 9 relaciona en orden de polaridad creciente las fases estacionarias más frecuentemente utilizadas en columnas de cromatografía de gases, tanto de relleno como capilares. Probablemente, esos seis líquidos pueden proporcionar separaciones satisfactorias para el 90% o más de las muestras con que se puede encontrar

Cinco de los líquidos listados en la Tabla 9 son poldimetilsiloxanos que tienen la estructura general:

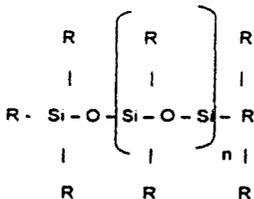


Tabla 9.

Algunas fases estacionarias comunes en cromatografía gas-liquido (Skoog, 1998).

Fase estacionaria	Nombre comercial común	Temperatura máxima, °C	Aplicaciones comunes
Polidimetilsiloxano	OV-1, SE-30	350	Fase no polar de uso general. hidrocarburos aromáticos plunnucleares drogas esteroides PCBs
Poli (fenilmetilfenil) siloxano (10% fenil)	OV-3, SE-52	350	Esteres metilicos de acidos grasos. alcaloides drogas. compuestos halogenados
Poli(fenilmetil) siloxano (50% fenil)	OV-17	250	Drogas esteroides pesticidas. glicoles
Poli (trifluoropropildimetil) siloxano	OV-210	200	Aromáticos clorados. nitroaromaticos bencenos alquilsustituidos
Poli(etilén glicol)	Carbowax 20M	250	Acidos libres alcoholes. eteres. aceites esenciales. glicoles
Poli(dicianoalildimetil) siloxano	OV-275	240	Acidos grasos poliinsaturados. acidos de la colofonia. acidos libres. alcoholes

En el primero de ellos, polidimetilsiloxano, los grupos -R son todos -CH<sub>3</sub>, originando un líquido que es relativamente no polar. En los otros polisiloxanos indicados en la tabla, se sustituye una fracción de los grupos metilo por grupos funcionales tales como fenilo (-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, CN), y

trifluoropropilo (-C.H.CF<sub>3</sub>) Estas sustituciones aumentan en distinto grado la polandad de los líquidos(Skoog. 1998)

La quinta entrada de la Tabla 9 es un polietilenglicol que tiene la estructura



El polietilenglicol se aplica extensamente para la separación de especies polares

#### d) Detectores.

En cromatografía de gases, un detector ideal tiene las siguientes características

1. Adecuada sensibilidad En general, las sensibilidades de los detectores actuales se encuentran en el intervalo de  $10^{-6}$  a  $10^{-12}$  g de analitos
2. Buena estabilidad y reproducibilidad
3. Una respuesta lineal para los analitos que se extienda a varios órdenes de magnitud
4. Un intervalo de temperaturas de trabajo comprendido desde la temperatura ambiente hasta al menos 400°C
5. Un tiempo de respuesta corto que lo haga independiente del caudal
6. Alta fiabilidad y manejo sencillo
7. No destructivo de la muestra (Skoog 1998 )

## DETECTOR DE IONIZACIÓN DE LLAMA.

En cromatografía de gases, el detector de ionización de llama (FID) es uno de los detectores más extensamente utilizados y, por lo general, uno de los más aplicables. En un quemador, el efluente de la columna se mezcla con hidrógeno y con aire para luego encenderse eléctricamente. La mayoría de los compuestos orgánicos, cuando se pirolizan a la temperatura de una llama de hidrógeno/aire, producen iones y electrones que pueden conducir la electricidad a través de la llama. Entre el extremo del quemador y un electrodo colector situado por encima de la llama, se aplica una diferencia de potencial de unos pocos cientos de voltios, y para la medición de la corriente resulta ( $\sim 10^{-11}$  A) se utiliza un amplificador operacional de alta impedancia (Skoog, 1998 ; Willard, 1988 )

El detector de ionización de llama debido a que es un detector que responde al número de átomos de carbono que entra en el detector por unidad de tiempo, es un detector *sensible a la masa*, más que un sistema sensible a la concentración

Grupos funcionales, tales como carbonilo, alcohol, halógeno y amina, originan en la llama pocos iones o prácticamente ninguno (Skoog, 1998 )

## DETECTOR TERMOIÓNICO.

El detector termoiónico (TID) es un detector selectivo de los compuestos orgánicos que contienen fósforo y nitrógeno. Su respuesta a un átomo de fósforo es aproximadamente 10 veces mayor que a un átomo de nitrógeno, y de  $10^2$  a  $10^7$  veces superior que a un átomo de carbono.

Estas propiedades hacen de la detección termoiónica un sistema particularmente útil para la detección y determinación de muchos pesticidas que contienen fósforo.

Un detector termiónico tiene una configuración similar al detector de llama. El efluente de la columna se mezcla con hidrogeno, pasa a través de la llama, y se quema. El gas caliente fluye alrededor de una bola de silicato de rubidio calentada eléctricamente, la cual se mantiene a unos 180 V con respecto al colector. La bola caliente forma un plasma que alcanza una temperatura de 600 a 800 °C. Lo que ocurre exactamente en el plasma, que hace que se produzcan insolitamente una gran cantidad de iones a partir de las moléculas que contienen fósforo o nitrógeno, realmente no está bien establecido, pero el resultado es una gran corriente de iones, la cual se utiliza para la determinación de compuestos que contienen esos dos elementos (Skoog, 1998. Willard, 1988).

Otros detectores utilizados son los de conductividad térmica, de captura de electrones, de emisión atómica.

## 2.11. Espectrometría de masas

### 2.11.1. Fundamento y descripción.

Los espectro de masas se obtienen por conversión de los componentes de una muestra en iones gaseosos que se mueven rápidamente y se separan en función de su relación masa-carga. La espectrometría de masas es capaz de suministrar información sobre (1) la composición cualitativa y cuantitativa tanto de analitos orgánicos como inorgánicos en muestras complejas, (2) las estructuras de una amplia variedad de especies moleculares complejas, (3) las relaciones isotópicas de los átomos en las muestras y (4) la estructura y composición de superficies sólidas (Skoog, 1998. Willard, 1988).

TE. IS. C. N.  
FALLA LE. CR. ER.

El diagrama de bloques de la Figura 13 muestra los componentes principales de los espectrómetros de masas. El objetivo del sistema de entrada es de introducir una pequeña cantidad de muestra (un micromol o menos) en el espectrometro de masas donde sus componentes se convierten en iones gaseosos. A menudo, el sistema de entrada contiene un medio para la volatilización de muestras sólidas o líquidas (Skoog, 1998)

La fuente de iones de un espectrometro de masas convierte los componentes de una muestra en iones por bombardeo con electrones, iones, moléculas o fotones. Alternativamente la ionización se lleva a cabo por energía térmica o eléctrica. En muchos casos el sistema de entrada y la fuente de iones están combinados en un único componente. En ambos casos, lo que se obtiene es un haz de iones positivos o negativos (frecuentemente positivos) que es entonces acelerado en el analizador de masas (Willard, 1988; Kiser, 1965)

La función del analizador de masas es parecida a la de la rejilla de un espectrometro óptico. En el primero sin embargo la dispersión está basada en las relaciones carga-masa de los iones del analito en vez de en la longitud de onda de los fotones. Existen diversos tipos de espectrometros de masas dependiendo de la naturaleza del analizador de masas (Skoog, 1998)

Al igual que en un espectrometro óptico, un espectrometro de masas contiene un detector (para iones) que convierte el haz de iones en una señal eléctrica que puede ser entonces procesada, almacenada en la memoria de un ordenador y mostrada o registrada de varias maneras. Un hecho característico de los espectrometros de masas, que no es común con los instrumentos ópticos (pero que se encuentra en los espectrometros de electrones), es la necesidad de un sistema de vacío adecuado para mantener bajas presiones ( $10^{-4}$  a  $10^{-6}$  torr) en todos los componentes del instrumento excepto el procesador de señal y dispositivo de lectura (Skoog, 1998; Kiser, 1965; Willard, 1988)

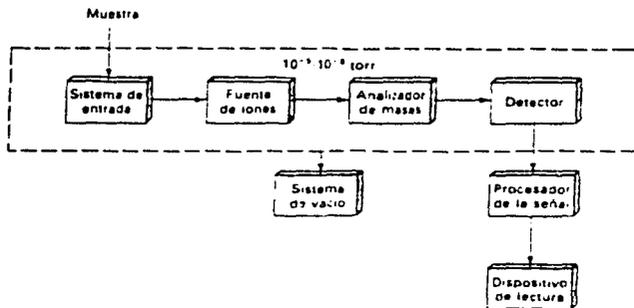


Figura 13. Componentes de un espectrómetro de masas (Skoog, 1998).

### 2.11.2. Equipo para espectrometría de masas.

#### a) Sistemas de entrada de muestra.

La finalidad del sistema de entrada es la de permitir la introducción de una muestra representativa en la fuente de iones con la mínima pérdida de vacío. Los espectrómetros de masas están equipados con tres tipos de entradas capaces de acomodar diversos tipos de muestras, que incluyen sistemas discretos de entrada, entradas de sonda directa y entradas cromatográficas (Skoog 1998).

#### SISTEMAS DISCRETOS DE ENTRADA.

El sistema de entrada clásico (y más simple) es el discreto, en el cual la muestra se volatiliza externamente y se introduce en la región de ionización que está a baja presión, este

sistema es aplicable a muestras gaseosas y a líquidas que tengan puntos de hasta aproximadamente unos 500 °C. La muestra, una vez en fase gas, entra en el área de ionización del espectrómetro a través de un diafragma de metal o de vidrio que contiene uno o varios pequeños orificios. El sistema de entrada es normalmente vidrio para evitar pérdidas de analitos polares por adsorción (Willard, 1988; Kiser, 1965)

#### **ENTRADA POR Sonda DIRECTA.**

Los líquidos y sólidos no volátiles se pueden introducir en la región de ionización mediante un soporte de muestra o sonda, el cual se inserta a través de una cámara intermedia de vacío (Willard, 1988)

#### **SISTEMAS DE ENTRADA CROMATOGRÁFICOS.**

Los espectrómetros de masas a menudo están acoplados con sistemas cromatográficos de gases o de líquidos de alta resolución que permiten la separación y determinación de los componentes de mezclas complejas. El acoplamiento de una columna cromatográfica a un espectrómetro de masas requiere la utilización de sistemas de entrada especiales. A continuación se describe el acoplamiento de un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas (Skoog, 1998)

#### **CROMATOGRAFIA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASAS.**

El caudal de las columnas capilares en general es suficientemente bajo como para que la salida de la columna pueda introducirse directamente en la cámara de ionización de un espectrómetro de masas. Sin embargo, en el caso de columnas de relleno ha de emplearse un separador de chorro como el que muestra la Figura 14 para eliminar la mayor parte del gas portador que acompaña el analito. En este dispositivo, la salida de gases fluye a través de la

boquilla de un separador de chorro de vidrio, el cual aumenta el momento de las moléculas más pesadas del analito, de tal forma que el 50% o más de éstas se desplazan aproximadamente en línea recta hacia el conductor colector de salida. Por el contrario, los ligeros átomos de helio se desvían por el vacío y son succionados hacia el exterior (Skoog, 1998)

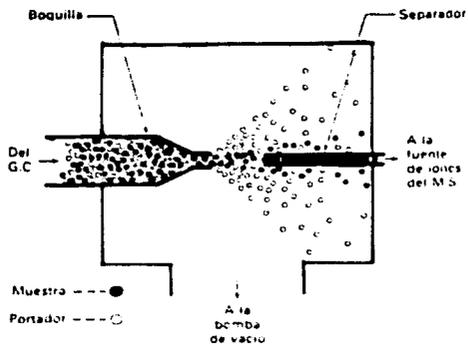


Figura 14. Esquema de un separador de chorro(Skoog, 1998).

## b) Analizadores de masa.

### ANALIZADORES DE SECTOR MAGNÉTICO.

Los analizadores de sector magnético utilizan un imán permanente o un electroimán para hacer que el haz de iones de la fuente se mueva en una trayectoria circular de 180, 90 a 60 grados. La Figura 15 muestra un instrumento de sector de 90 grados en el que los iones formados por impacto de electrones, son acelerados a través de la rendija B hacia el tubo analizador metálico que se mantiene a una presión interna de alrededor de  $10^{-7}$  torr. Se puede llevar a cabo un barrido de los iones de diferente masa a través de la rendija de salida variando la fuerza del campo del imán o el potencial de aceleración entre las rendijas A y B. Los iones que pasan a través de la rendija de salida se recogen en un electrodo colector y dan lugar a una corriente de iones que es amplificada y registrada (Willard, 1988).

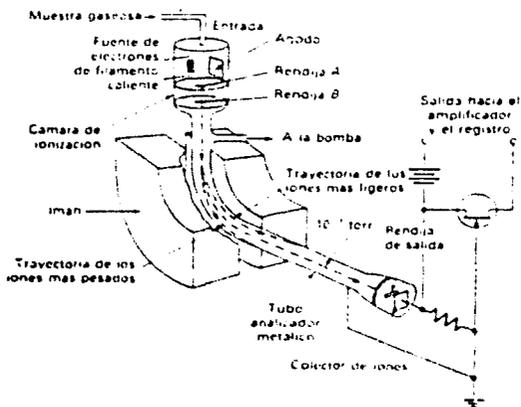


Figura 15. Esquema de un espectrómetro de sector magnético (Skoog, 1998)

## ANALIZADORES DE TRAMPA DE IONES.

Una trampa de iones es un dispositivo en el que los cationes o aniones gaseosos pueden ser formados y confinados durante largos periodos de tiempo por la acción de campos electricos y/o magneticos. Se han desarrollado varios tipos de trampas de iones, y son dos las normalmente utilizadas en los espectrometros de masas comerciales. Una de ellas es la trampa de resonancia de ion ciclotron y otra que es un tipo sencillo de trampa de iones que ha sido desarrollada como detector para cromatografia de gases (GC/MS) (Skoog, 1998; Kiser, 1965).

La figura 16 muestra la seccion longitudinal de una trampa de iones sencilla asequible comercialmente. Consiste en un electrodo anular y un par de electrodos colectores. Se aplica al electrodo anular un potencial de radiofrecuencia variable mientras que los dos electrodos colectores estan conectados con tierra. Los iones con un valor apropiado de  $m/z$  circulan en una órbita estable dentro de la cavidad que esta rodeada por el anillo. Cuando el potencial de radiofrecuencia se aumenta, las orbitas de los iones mas pesados llegan a estabilizarse, mientras que las de los iones mas ligeros se desestabilizan lo que causa colisiones con la pared del electrodo anular. Cuando este dispositivo funciona como un espectrometro de masas una rafaga de iones del analito procedentes de una fuente de impacto de electrones o de ionizacion quimica se introduce a traves de una rejilla en el colector superior. Entonces se hace el barrido del potencial de radiofrecuencia y los iones son atrapados cuando se desestabilizan, dejan la cavidad de electrodo de anillo a traves de una abertura en el colector inferior. Los iones emitidos pasan entonces al detector (Skoog, 1998; Kiser, 1965).

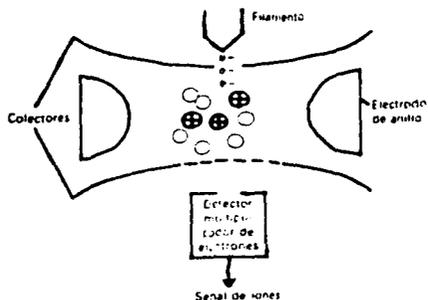


Figura 16 . Espectrómetro de masas de trampa de iones (Skoog, 1998).

#### d) Detectores.

Comercialmente son asequibles, varios tipos de detectores para espectrometros de masas. El multiplicador de electrones es el detector elegido en la mayoría de los experimentos de rutina.

#### MULTIPLICADORES DE ELECTRONES.

Un multiplicador de electrones de dinodos está diseñado para la detección de iones positivos cada dinodo se mantiene a un potencial mas alto que el anterior. El cátodo y los sucesivos dinodos tienen superficies de Cu/Be de las que se emiten ráfagas de electrones al ser alcanzadas por iones o electrones de elevada energía. Se pueden adquirir multiplicadores de electrones con 20 dinodos, que proporcionan normalmente una ganancia de corriente de  $10^7$ .

La figura 17 ilustra un multiplicador de electrones de dinodos continuo, que tiene un diseño en forma de trompeta fabricado de vidrio y que está fuertemente dopado con plomo. Se aplica un potencial de 1.8 a 2 kV a lo largo del detector. Los iones que alcanzan la superficie cercana a la entrada expulsan electrones que saltan a lo largo de la superficie, expulsando más electrones a cada impacto. Los detectores de este tipo tienen ganancias de corriente de  $10^5$ , pero en ciertas aplicaciones se pueden alcanzar ganancias tan altas como  $10^8$  (Willard 1988, Kiser, 1965)

Otros detectores utilizados son La copa de Faraday, placas fotograficas, detectores de centelleo

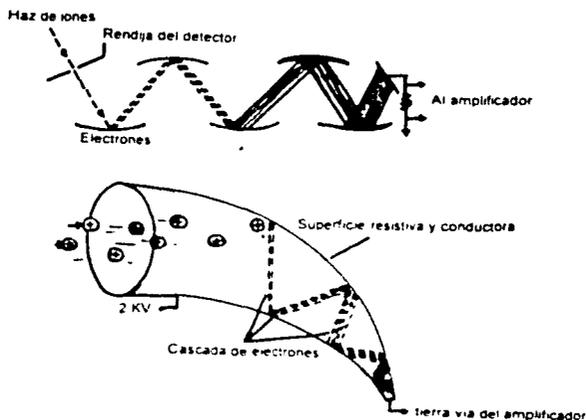


Figura 17. (a) Multiplicador de electrones de dinodos discreto. Los dinodos se mantienen a potenciales sucesivamente más altos mediante un divisor de potencial en múltiples etapas. (b) Multiplicador de electrones de dinodos continuos.

### 3. HIPÓTESIS.

Al inhibir la biosíntesis de giberelinas, como resultado de la aplicación foliar de paclobutrazol, se inducirá en mayor grado el proceso de tubercización, obteniendo como resultado un aumento en rendimiento en peso a la cosecha de tubérculos. Así mismo, se inducirá una mayor acumulación de patatina en el tubérculo, aumentando su valor nutritivo, ambos procesos esperados en Solanum tuberosum

### 4.OBJETIVOS.

#### -Objetivo General:

- Mejorar el rendimiento en peso fresco a la cosecha y evaluar la calidad nutritiva de tubérculos de Solanum tuberosum, mediante la aplicación foliar de paclobutrazol ((2RS-3RS)-1-(4-clorofenil)-4,4-dimetil-2-(1H-1,2,4-triazol-1il)-pentan-3-ol), con el fin de hacer más productiva su explotación agrícola

### **-Objetivos Particulares:**

- 1) Evaluar el efecto en el rendimiento de tubérculos a la cosecha de Solanum tuberosum aplicando diferentes concentraciones de paclobutrazol via foliar, mediante la proposición de un modelo estadístico adecuado al diseño experimental
  
- 2) Evaluar la calidad nutritiva de tubérculos de Solanum tuberosum mediante un análisis bromatológico
  
- 3) Cuantificar e identificar el paclobutrazol residual en tubérculos de Solanum tuberosum mediante Cromatografía de Gas-Espectrometría de masas
  
- 4) Integrar los conocimientos teóricos adquiridos en distintas asignaturas cursadas en la carrera, con otras áreas de estudios, como es la Fisiología y Bioquímica vegetal, con la práctica en el laboratorio experimental

## 5. MATERIALES Y METODOS

### 5.1. Diseño Experimental

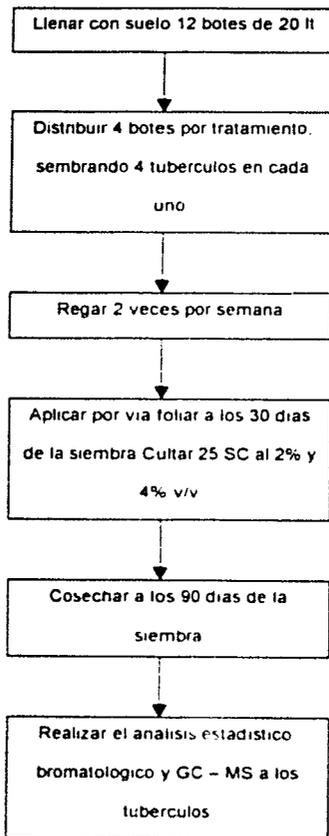
Se empleo un diseño experimental completamente al azar, el cual consiste de 3 tratamientos con 4 repeticiones de la siguiente forma en botes de 20 litros y 30 cm de diametro se coloco suelo (obtenido de las camas de los invernaderos de cristal del area de ingenieria agricola de la F E S - C Campo-4 previa homogenización y tamización) sin fertilizante sembrandose en cada cubeta 4 tuberculos de Solanum tuberosum previamente brotados los tratamientos son los siguientes

Tratamiento	% v/v Cultar 25 SC	Concentración mM
T <sub>1</sub>	0	0
T <sub>2</sub>	2	0.017
T <sub>3</sub>	4	0.034

Las condiciones de desarrollo vegetativo se llevaron bajo ambiente de invernadero de cristal con dos riegos por semana

La aplicacion de paclobutrazol via foliar se realizo con un atomizador normal agregando un adherente comercial para aplicacion de agroquimicos foliares Se realizo una aplicacion de paclobutrazol a los 30 dias de la siembra y se cosecho a los 90 dias despues de la siembra

**DIAGRAMA DE FLUJO  
(DISEÑO EXPERIMENTAL)**



## **5.2. Métodos.**

### **5.2.1. Recolección de tubérculos y toma de datos.**

La cosecha se realizó de forma convencional, tomándose los siguientes datos: peso de tubérculos por cubeta e individual, número de tubérculo por planta y longitud de tallos de todas las plantas. Estos datos se someten posteriormente al análisis estadístico para evaluar el efecto del paclobutrazol en los parámetros antes mencionados.

### **5.2.2. Análisis Bromatológico.**

#### **5.2.2.1. Preparación de la muestra.**

- a) Se toma una muestra de cada tratamiento, realizando un lavado previo con cepillo y agua.
- b) Se procedió a pelar todas las piezas para eliminar la cutícula.
- c) Se sometieron a cocción todas las muestras de cada tratamiento durante 30 minutos a ebullición.
- d) Se registraron los pesos de las muestras antes de la cocción, posteriormente se les cortó en rebanadas delgadas y se sometieron a desecación durante 24 horas a 60 °C, en estufa con corriente de aire, tomándose su peso posteriormente.
- e) Después de desecar las muestras se procedió a triturarlas, usando un molino eléctrico, con malla número 40 quedando de esta forma listas para el análisis (Lees, Morfin).

### **5.2.2.2 Determinación de Humedad.**

#### **Fundamento:**

La humedad de la muestra se extrae por evaporación a temperatura de 100-105 °C hasta peso constante considerándose que la pérdida de peso es agua ( Morfin, Perason 1986 )

#### **Material:**

- Cajas de aluminio con tapadera para humedad
- Estufa con corriente de aire
- Espátula de acero inoxidable
- Pinzas para crisol
- Desecador con gel de sílice o cloruro de calcio
- Balanza analítica

#### **Procedimiento.**

- a) Lavar las cajas de aluminio con agua y detergente
- b) Enjuagarlas con agua destilada y posteriormente con éter
- c) Secarlas en la estufa a 105 °C hasta peso constante (1.5 horas) colocando la tapa en la base de la caja
- d) Enfriarlas en desecador para evitar la hidratación (15 minutos)

- e) Pesarlas en balanza analítica
- f) Pesar dentro de la caja 2 gramos de muestra
- g) Secar en la estufa a 105 °C hasta peso constante (4 horas) colocando la tapa en la base de la caja
- h) Sacar las cajas y colocarlas en un desecador para enfriar (15 minutos)
- i) Pesar en balanza analítica
- j) Usar pinzas en todas las manipulaciones
- k) Efectuar cálculos

$$\frac{\text{Gramos de humedad}}{\text{Gramos de muestra}} \times 100 = \% \text{ de Humedad}$$

### 5.2.2.3. Determinación de cenizas totales.

#### Fundamento:

El método se basa en la eliminación de la materia orgánica de un material por medio de incineración a 600 °C. El residuo restante se considera son las cenizas ( Joshyn 1970 Morfin , Pearson 1980 ,

**Material:**

- Crisoles de porcelana
- Mufia de incineración
- Parrilla con resistencia eléctrica
- Desecador
- Pinzas largas para crisol

**Procedimiento.**

- a) Pesar un gramo de muestra en un crisol de porcelana secado a peso constante
- b) Quemar en la parrilla el contenido del crisol hasta suspensión de gases
- c) Incinerar en la mufia a 600°C durante dos horas
- d) Enfriar en desecador 15 minutos
- e) Pesar y hacer cálculos

$$\frac{\text{Peso de las cenizas}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100 = \% \text{ de cenizas}$$

**5.2.2.4. Determinación de Lípidos totales.**

**Fundamento**

La grasa se extrae de la muestra por agitación con mezcla de cloroformo-metanol a temperatura ambiente. Se añade una cantidad calculada de agua para que se separen dos

fases de las que la capa inferior de cloroformo contienen la grasa. La capa de cloroformo se separa aparte se lava con solución de cloruro de sodio diluida para eliminar el material proteico extraido y se deseca con sulfato de sodio anhidro. El extracto de cloroformo se evapora seguidamente a sequedad en un matraz tarado y se pesa el residuo de grasa (Osborne 1986 Joslyn 1970 )

**Reactivos:**

- Cloroformo
- Metanol
- Solucion de cloruro de magnesio al 20 %
- Solucion de cloruro de sodio al 0.1 %
- Sulfato de sodio anhidro

**Procedimiento:**

- a) Pesar 2 gramos de muestra en un tubo de ensaye
- b) Añadir 5 ml de cloroformo, 10 ml de metanol, 0.05 ml de cloruro de magnesio al 20 %
- c) Mezclar durante 5 minutos ( si se usa un agitador magnetico usar barra magnetica)
- d) Añadir otros 5 ml de cloroformo y mezclar de nuevo durante 5 minutos
- e) Añadir agua destilada hasta que el contenido total de agua ( incluyendo el de la muestra ) sea de 5 ml; mezclar durante 5 minutos adicionales
- f) Filtrar el extracto a través de papel filtro Whatman no. 40 utilizando ligera succión (opcional)
- g) Lavar el tubo de extracción y el residuo sobre la placa filtrante con 3 x 2.5 ml de cloroformo
- h) Agitar el contenido del tubo y seguidamente centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos

- i) Con una pipeta Pasteur eliminar la mayor cantidad posible de la capa acuosa superior sin perturbar la capa de cloroformo
- j) Añadir 10 ml de solución de cloruro de sodio 0.01 % al extracto de cloroformo y mezclar
- k) Centrifugar a 1500 rpm/5 minutos
- l) Eliminar la capa acuosa superior
- m) Añadir 1.5 de sulfato de sodio anhidro y agitar
- n) Filtrar a través de filtro Whatman no. 40 hacia un tubo seco
- o) Lavar el tubo con 3 x 2.5 ml de cloroformo
- p) Transferir el extracto de cloroformo desecado a un matraz tarado
- q) Colocar el matraz sobre un baño de agua y evaporar el cloroformo
- r) Cuando se haya eliminado todo el solvente colocar el matraz conteniendo el residuo de grasa en estufa a 100°C/5 minutos
- s) Enfriar en un desecador y volver a pesar

**Calculos:**

Peso (g) de la muestra =  $W_1$

Peso (g) del matraz vacío =  $W_2$

Peso (g) del matraz +grasa =  $W_3$

% de grasa =  $((W_3 - W_2) / W_1) \times 100$

### 5.2.2.5. Determinación de proteínas totales.

Fundamento:

Estructuras peptídicas que contengan como mínimo dos enlaces peptídicos forman un complejo colorido con los iones de cobre cuantificándose mediante una curva patron por espectrofotometría (Henry, 1980, Campos 1993)

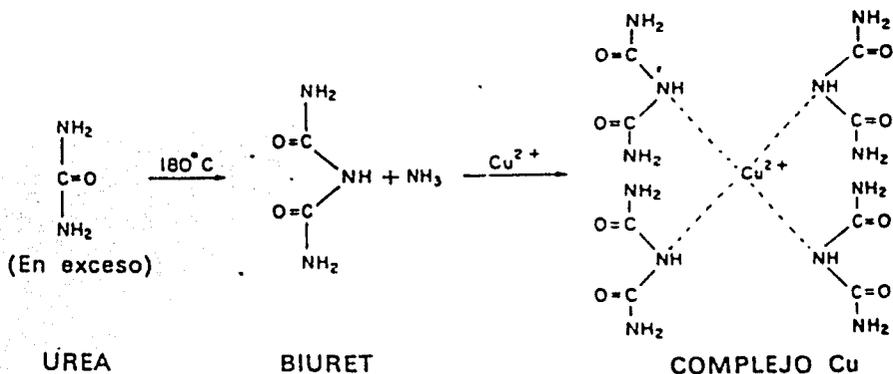


Figura 18 Complejo peptido  $-\text{Cu}^{2+}$ . (Henry, 1980)

**Material:**

- Tubos de ensayo
- Gradilla
- Pipetas graduadas de 5 y 10 ml
- Matraz aforado de 100 ml
- Balanza analítica
- Espectrofotometro
- Mecneros bunsen
- Tripe
- Baño de agua
- Centrifuga

**Reactivos.**

- Hidroxiso de sodio al 20%
- Sulfato de cobre al 25%.
- Solución patrón de albúmina o caseína (concentración de 5mg/ ml)

**Procedimiento.**

**Obtener la curva patrón como sigue:**

Tubo	ml sol. patrón	ml NaOH	ml agua	ml CuSO <sub>4</sub>	mg/ml prot
1	0	1.5	8.25	0.25	0
2	1	1.5	7.25	0.25	0.5
3	2	1.5	6.25	0.25	1.0
4	3	1.5	5.25	0.25	1.5
5	4	1.5	4.25	0.25	2.0
6	5	1.5	3.25	0.25	2.5
7	6	1.5	2.25	0.25	3.0
8	7	1.5	1.25	0.25	3.5

Una vez obtenidas las lecturas de cada sistema en el espectrofotómetro a 540 nm, elaborar la curva de calibración y realizar el análisis de regresión lineal.

**Tratamiento de la muestra:**

- a) pesar entre 20 y 30 mg de muestra seca (como determinación preliminar y ajustar cantidad de acuerdo a los resultados experimentales)
- b) Suspender en 8.25 ml de agua
- c) Adicionar 1.5 ml de NaOH al 20%
- d) Tapar los tubos y calentar en baño de agua a ebullición durante 5 minutos
- e) Dejar enfriar y adicionar 0.25 ml de sulfato de cobre al 25%
- f) Incubar 10 minutos a 50 C° para desarrollar color
- g) Romper el precipitado y centrifugar durante 3 minutos a 1500 rpm
- h) Leer en el espectrofotómetro a 540 nm
- i) Determinar la concentración de proteína por medio de la curva patrón

## **5.2.2.6 Determinación de Carbohidratos.**

### **5.2.2.6.1 Determinación de Almidón.**

#### **Fundamento**

Es un polisacárido de reserva en las plantas superiores. El almidón, consta de dos componentes: la amilosa y la amilopectina. La amilosa da un color azul intenso con el yodo, debido a la capacidad del halógeno para ocupar una posición en el interior de la espiral helicoidal de las unidades de glucosa. que forma la amilosa en suspensión acuosa, la amilopectina produce un color púrpura rojizo con el yodo, prevaleciendo el color azul de la amilosa, con lo cual puede ser cuantificado por espectrofotometría (Conn, 1989; Herrera, 1986; Toporek, 1985).

#### **Reactivos:**

- Solución de almidón estándar (2 mg/ml).
- Solución de tintura de yodo
- Solución de NaOH al 0.313 N
- HCl concentrado

## **Metodología.**

### **A) Espectro de absorción:**

- 1) En el tubo de ensayo agregar 9.4 ml de agua destilada, 0.6 ml de solución de almidón estandar y 2 gotas de tintura de yodo, mezclar.
- 2) Realizar el espectro de absorción en región visible (de 400 a 700 nm), para obtener la longitud de onda ( $\lambda$ ) en donde se obtiene mayor sensibilidad y calcular el coeficiente de absortividad específico

### **B) Curva de calibración:**

Se construye de acuerdo al valor obtenido del coeficiente de absortividad específico, tomando como límites de absorbancia ( $A$ ), desde 0.1 a 0.6, por medio de la ecuación de la Ley de Beer, despejando la concentración para cada límite de  $A$ , preparando como mínimo 5 sistemas entre los límites establecidos

### **C) Cuantificación de muestra:**

- 1) Pesar aproximadamente 10 mg de muestra en un tubo de ensayo
- 2) Agregar 2 ml de solución de NaOH al 0.313 N, poner el baño María a ebullición por 15 minutos
- 3) Enfriar los tubos y ajustar aproximadamente a pH 7, con HCl concentrado
- 4) Aforar a 10 ml, tomar 2 ml de solución y aforar nuevamente a 10 ml, agregar a 2 gotas de tintura de yodo, mezclar
- 5) Leer en espectrofotómetro a la  $\lambda$  obtenida de acuerdo al espectro de absorción y cuantificar.

### **5.2.2.6.2 Determinación de fibra cruda.**

#### **Fundamento:**

Esta se fundamenta en la digestión ácida y posterior digestión alcalina de material previamente desengrasado. Se asume que la materia orgánica del material no digerido es la fibra cruda (Morfin, Pearson, 1986)

#### **Material**

- digestor de fibra cruda
- Vasos Berzelius de 600ml
- Filtros de Lino y papel filtro
- Equipo de filtración a vacío
- Espátula de acero
- Vasos de precipitados de 500 ml
- Pizeta
- Embudos Buchner

#### **Reactivos:**

- Solución de ácido sulfúrico 0.255 N
- Solución de hidróxido de sodio 0.313 N

#### **Procedimiento:**

**Nota:** los reactivos deben estar previamente calentados

- a) **Transferir el residuo de la determinación de lípidos totales de la siguiente forma**
- Pesar el papel filtro con su contenido
  - Vaciar su contenido en un vaso Berzelius de 600 ml
  - Pesar el papel filtro vacío
- b) **adicionar 200 ml de solución de ácido sulfúrico 0.255 N**
- c) **Inmediatamente después conectar el vaso al digestor de fibra cruda con las Parrillas previamente calentadas**
- d) **Hervir vigorosamente durante 30 minutos exactamente, agitando de vez en cuando**
- e) **Filtrar con vacío a través de filtro de lino sobre un embudo Buchner**
- f) **Lavar no menos de 3 veces con agua hirviendo enjuagando previamente el vaso**
- g) **Desprender la muestra del filtro con 200 ml de solución hirviendo de NaOH 0.313 N con ayuda de una pizeta transfiriéndola al vaso original**
- h) **Hervir a reflujó nuevamente por 30 minutos exactos**
- i) **Filtrar a través del papel filtro seco previamente pesado**
- j) **Lavar no menos de 3 veces con agua hirviendo enjuagando previamente el vaso**
- k) **Lavar 2 veces con etanol el filtrado suspendiendo el vacío**
- l) **Desecar los papeles filtros con el residuo 15 minutos a 60 °C**
- m) **Transferir los papeles filtro a una estufa durante 1 hora a 105 °C**
- n) **Sacarlos y enfriar en un desecador 15 minutos**
- o) **Pesar y hacer cálculos**

$$\frac{\text{Gramos de fibra}}{\text{Gramos de muestra}} \times 100 = \% \text{ de fibra cruda}$$

Gramos de muestra

### **5.2.3. Cuantificación de paclobutrazol en tubérculos por cromatografía de gas-espectrometría de masas.**

#### **a) Preparación del estándar.**

Se tomó un mililitro de Cultar 25 5C depositándolo en un vaso de precipitados de 100 ml; se agregaron 10 ml de metanol al 80 % manteniéndose en agitación 5 minutos; se tomó el contenido total del vaso; centrifugándolo 5 minutos a 2000 rpm; se retiró el sobrenadante y se repitieron 2 ciclos más de extracción a la pastilla. Se mezclan los tres sobrenadantes y se llevan a sequedad a 40 °C; se redissuelve el residuo en acetona aforándolo a 20 ml; obteniendo una concentración de paclobutrazol de 12.5 mg/ml. Eluir el paclobutrazol en un cromatógrafo de gas acoplado a un espectrómetro de masas para identificar su espectro de masas; el cual se realiza bajo las siguientes condiciones: eluir 2µl del extracto utilizando una columna capilar ultra 2 fase móvil helio a una presión de 8 psi; al inicio una temperatura de 40°C y final de 300°C (Edward 1986; Dai-Yunqing 1995).

#### **b) Extracción del paclobutrazol de tubérculos.**

Pesar una cantidad de tubérculos de los tratamientos del 0% paclobutrazol y 4% paclobutrazol de *S. tuberosum*. Realizar una homogenización con metanol al 80%; agitar al homogenado por 5 minutos; centrifugar la totalidad del homogenado; separar el sobrenadante y repetir 2 ciclos más de extracción al residuo del homogenado. Mezclar los tres sobrenadantes y llevarlos a sequedad a 40°C; posteriormente redissolver el residuo en acetona; centrifugar si es necesario; y aforar a 10 ml. Identificar la presencia de paclobutrazol en los tubérculos por la presencia de su espectro de masas; cuantificándose si se encontrara.

## 6. Resultados.

### a) Datos de rendimiento de tubérculos y altura de tallos de Solanum tuberosum.

Tabla 10. Número de tubérculos/planta/tratamiento

Tratamiento	Número de tubérculos promedio por planta	s	Num. de plantas totales por tratamiento n
0%* PBZ	6.5	1	12
2% PBZ	7.27	1.55	11
4% PBZ	10.77	2.16	13

\* Paclobutrazol (Cultar 25 SC en % v/v aplicado por vía foliar).

Gráfica No. 3.

Tabla 11. Peso de tubérculos (g)/10 plantas

Tratamiento	Peso de tubérculos (g)/10 plantas	No. de plantas totales por tratamiento n
0% PBZ	561.5	12
2% PBZ	554.45	11
4% PBZ	711.46	13

Gráfica No. 4.

**Tabla 12. Pesos Individuales de tubérculos/tratamiento**

Tratamiento	Peso promedio unitario (g)	Núm. de tubérculos totales por tratamiento	Núm. de plantas totales por tratamiento n
0% PBZ	8.86	78	12
2% PBZ	7.03	80	11
4% PBZ	6.86	140	13

Gráfica No. 5.

**Tabla 13. Altura de tallos/tratamiento**

Tratamiento	Altura promedio de tallos por tratamiento (cm)	s
0% PBZ	37.51	10.51
2% PBZ	22.90	9.27
4% PBZ	16.88	7.27

Gráfica No. 6.

b) Espectro de absorción y curva de calibración obtenidas experimentalmente para la cuantificación de almidón (Tablas 14 y 15; Gráficas No. 7 y No. 8).

c) Curva de calibración para la determinación de proteína obtenida experimentalmente (Tabla 16 y Gráfica 9).

d) Análisis bromatológico de *Solenum tuberosum*.

0 % v/v Cultar 25 SC					
Determinación	%Base húmeda		% Peso en fresco	% Base seca	Gráfica Número
	X	Desv. Est.			
Materia seca	95.80	0.14	25.91	100	8
Humedad	4.20	0.14	74.08	0	9
Proteína total	21.58	1.64	5.83	22.52	10
Lípidos totales	3.83	0.08	1.03	3.99	11
Fibra cruda	2.13	0.09	0.57	2.22	12
Cenizas totales	3.63	0.23	0.98	3.79	13
Almidón	58.45	1.91	15.80	61.01	14

2 % v/v Cultar 25 SC					
Determinación	%Base húmeda		% Peso en fresco	% Base seca	Gráfica Número
	X	Desv. Est.			
Materia seca	95.06	0.03	24.59	100	8
Humedad	4.93	0.03	75.40	0	9
Proteína total	20.37	0.07	5.27	21.43	10
Lípidos totales	2.59	0.4	0.66	2.72	11
Fibra cruda	2.05	0.07	0.53	2.15	12
Cenizas totales	4.00	0.02	1.03	4.20	13
Almidón	58.74	1.21	15.19	61.79	14

**4 % v/v Cultar 25 SC**

Determinación	%Base húmeda		% Peso en fresco	% Base seca	Gráfica Número
	X	Desv. Est.			
Materia seca	95.75	0.01	25.73	100	8
Humedad	4.25	0.01	74.26	0	9
Proteína total	22.65	1.46	6.08	23.65	10
Lípidos totales	2.97	0.02	0.79	3.10	11
Fibra cruda	1.99	0.01	0.53	2.07	12
Cenizas totales	3.64	0.07	0.97	3.80	13
Almidón	62.20	0.81	16.71	64.96	14

\* Los datos reportados para base húmeda son los promedios de al menos 2 repeticiones para cada determinación, mostrándose sus respectivas desviaciones estándar

\* No se muestran medias, ni desviaciones estándar para los datos en peso en fresco y base seca por haberse obtenido éstos, matemáticamente a partir de los datos de base húmeda

\* Los porcentajes se dan en % P/P

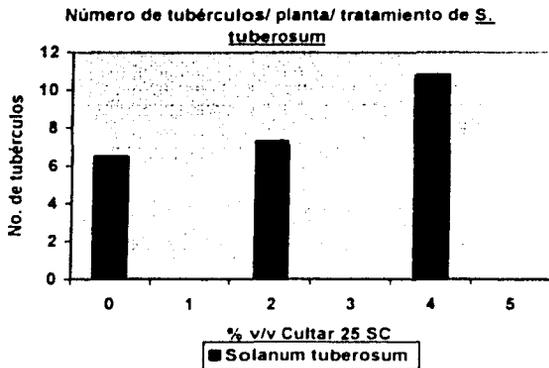
\* Los datos graficados corresponden al% P/P en peso en fresco

**e) Resultado de la cuantificación de paclobutrazol por cromatografía de gas  
-espectrometría de masas en tubérculos de S. tuberosum.**

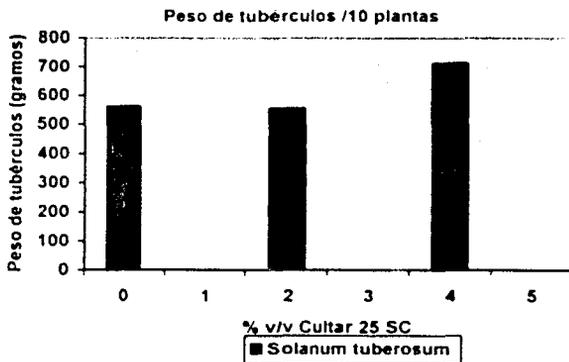
En la gráfica número 17 se muestra el cromatograma de la elusión del estándar de paclobutrazol, donde se observan dos picos, los cuales al analizarlos por espectrometría de masas se identificó al pico número 2 como el correspondiente al paclobutrazol, mostrándose su espectro de masas en la gráfica número 18 y en la tabla número 17

En la gráfica número 19 se muestra la elusión de los dos extractos de tubérculos de papa correspondiendo la gráfica 19a al testigo (0% paclobutrazol) y la 19b al tratamiento del 4% paclobutrazol, mostrándose que no está presente el espectro de masas del paclobutrazol

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

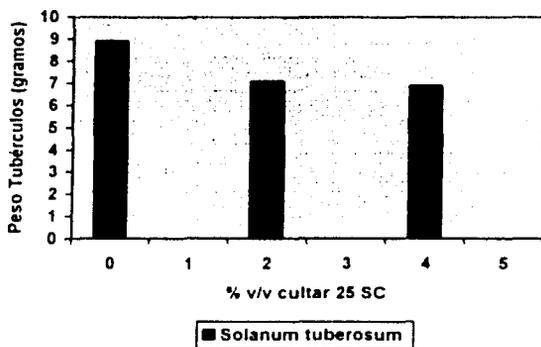


Gráfica No. 3



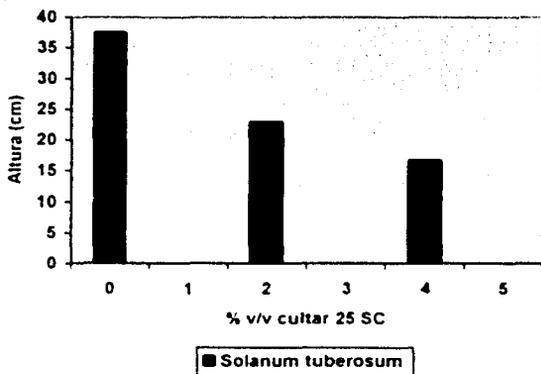
Gráfica No. 4

pesos Individuales de tubérculos/ tratamiento de  
S. tuberosum



Grafica No. 5

Altura de tallos/ tratamiento



Grafica No. 6

b)

ESPECTRO DE ABSORCIÓN  
(ALMIDÓN)

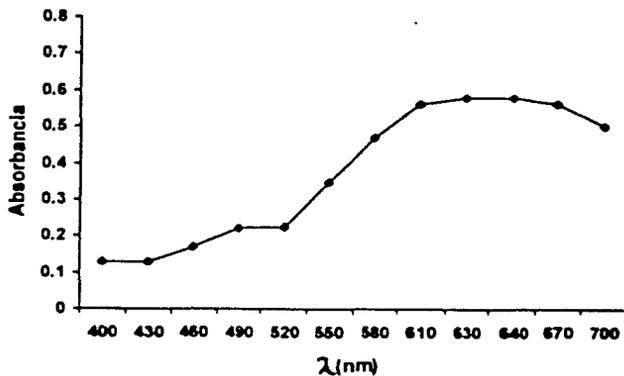
$\lambda$	A
400	0.13
430	0.13
460	0.17
490	0.22
520	0.225
550	0.347
580	0.47
610	0.56
630	0.58
640	0.58
670	0.56
700	0.50

Tabla No. 14.

Almidón: 0.1221 mg/ml.

$A = E_{\text{esp}} LC$

Intervalo de A: 0.1 a 0.6 Para curva de calibración.



Gráfica No. 7.

b)

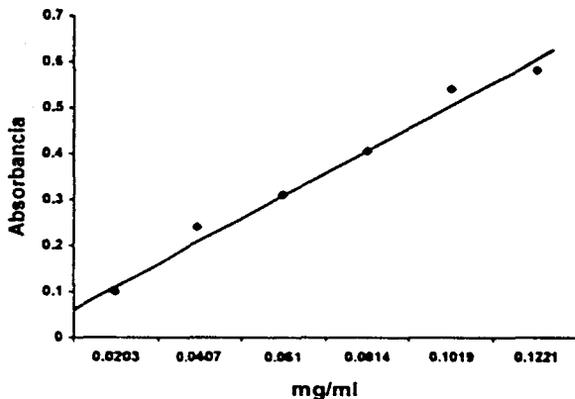
### CURVA PATRÓN ALMIDÓN

$\lambda = 630 \text{ nm.}$   
Almidón: 2.05 mg/ml  
(Sol. madre):

$r = 0.99$   
 $m = 4.82$   
 $b = 0.016$

mg/ml	$A_1$	$A_2$	$\bar{X}A$	S
0.0203	0.10	0.11	0.105	0.007
0.0407	0.24	0.21	0.225	0.021
0.0610	0.31	0.30	0.305	0.007
0.0814	0.405	0.41	0.407	0.003
0.1019	0.54	0.52	0.53	0.014
0.1221	0.58	0.60	0.59	0.014

Tabla 15.



Gráfica No. 8.

c)

### CURVA PATRÓN (PROTEÍNA)

Estándar: Albúmina bovina (97.5% pureza)

Método: Biuret.

$\lambda = 540 \text{ nm}$

Sistema	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	XA	SA
1	0.075	0.079	0.077	0.002
2	0.14	0.14	0.14	0
3	0.20	0.215	0.207	0.01
4	0.26	0.28	0.27	0.014
5	0.315	0.40	0.35	0.06

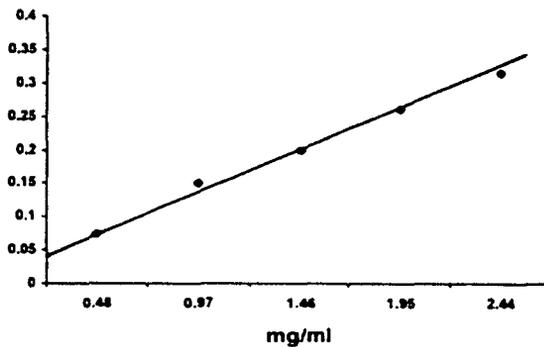
Tabla 16.

$$b = 6 \times 10^{-3}$$

$$m = 0.138$$

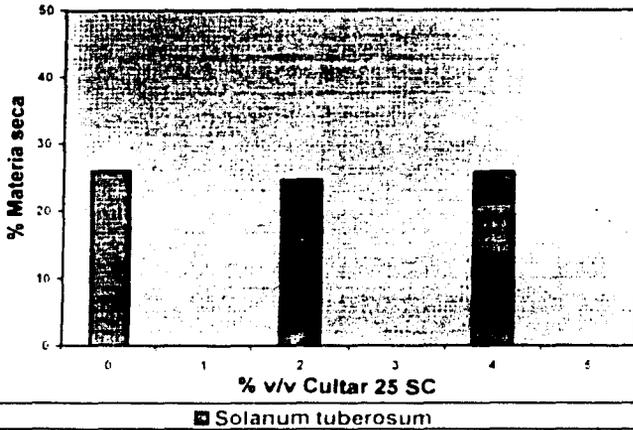
$$r = 0.99$$

$$Y = 0.138x + 6 \times 10^{-3}$$



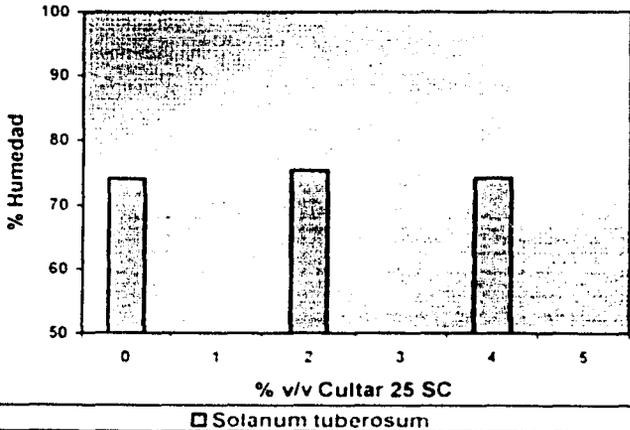
Gráfica No. 9.

## MATERIA SECA



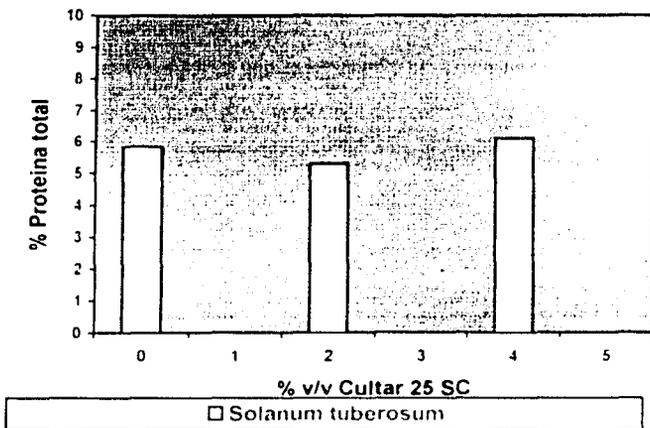
Gráfica No. 10

## HUMEDAD



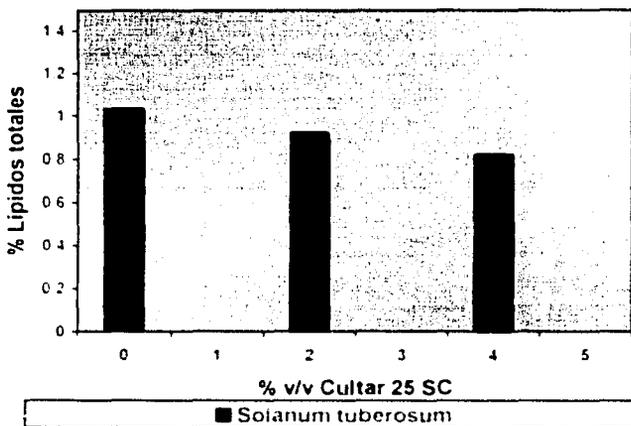
Gráfica No. 11

## PROTEÍNA TOTAL



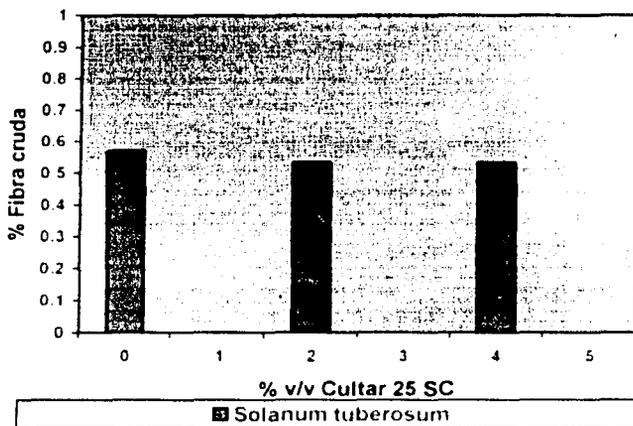
Gráfica No. 12

## LÍPIDOS TOTALES



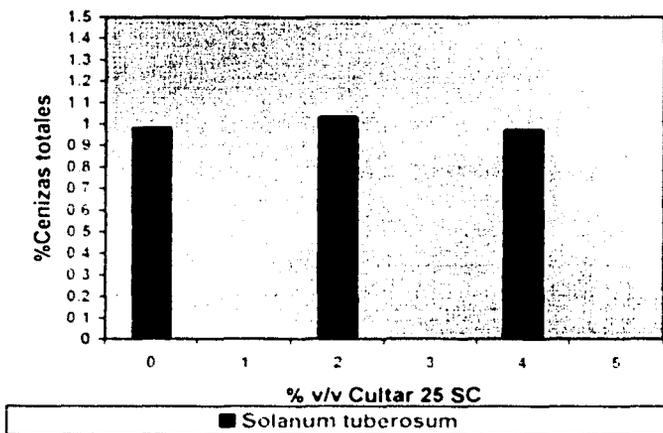
Gráfica No. 13

### FIBRA CRUDA



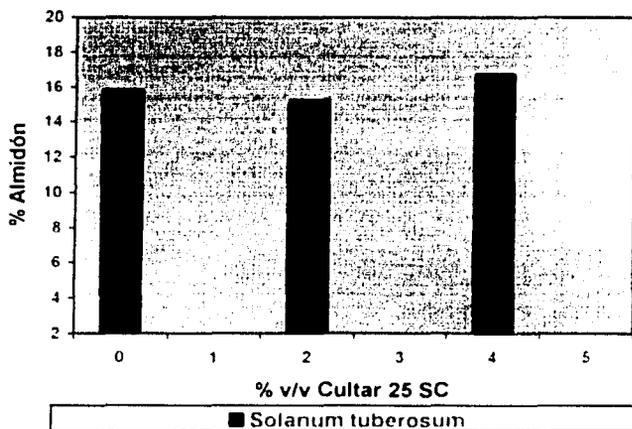
Gráfica No. 14

### CENIZAS TOTALES

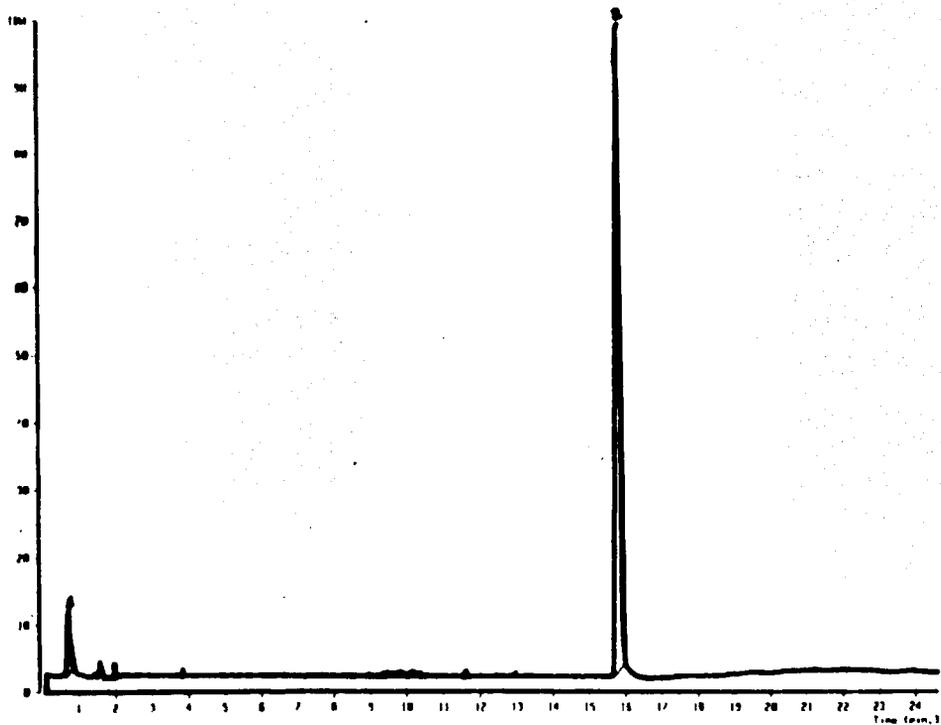


Gráfica No. 15

## ALMIDÓN



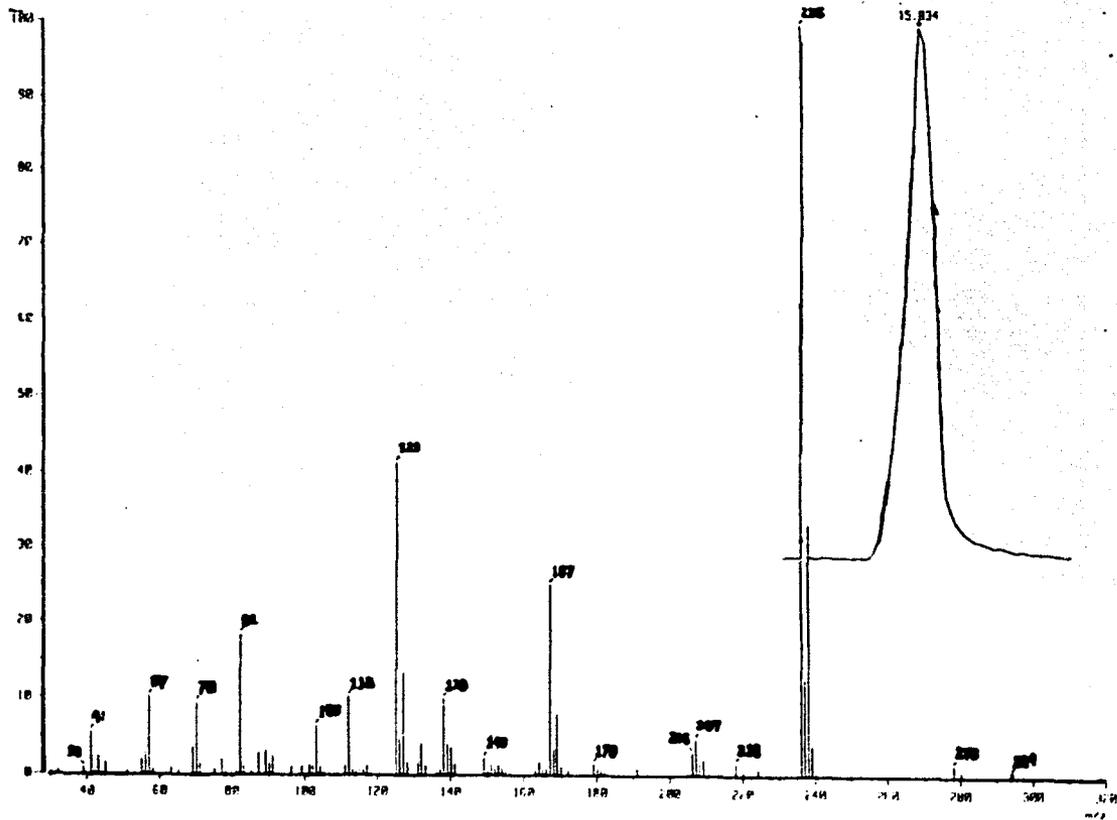
Gráfica No. 16



Grafica No. 17. Cromatograma obtenido de la elusión del estándar de pactobutrazol.

No Pico	TR (min)	Área	% Área	Altura	%Altura
1	0.75	797.52	6.37	237.58	8.98
2	15.83	11727.22	93.63	2313.59	91.04

FALLA LE ORIGEN  
C N

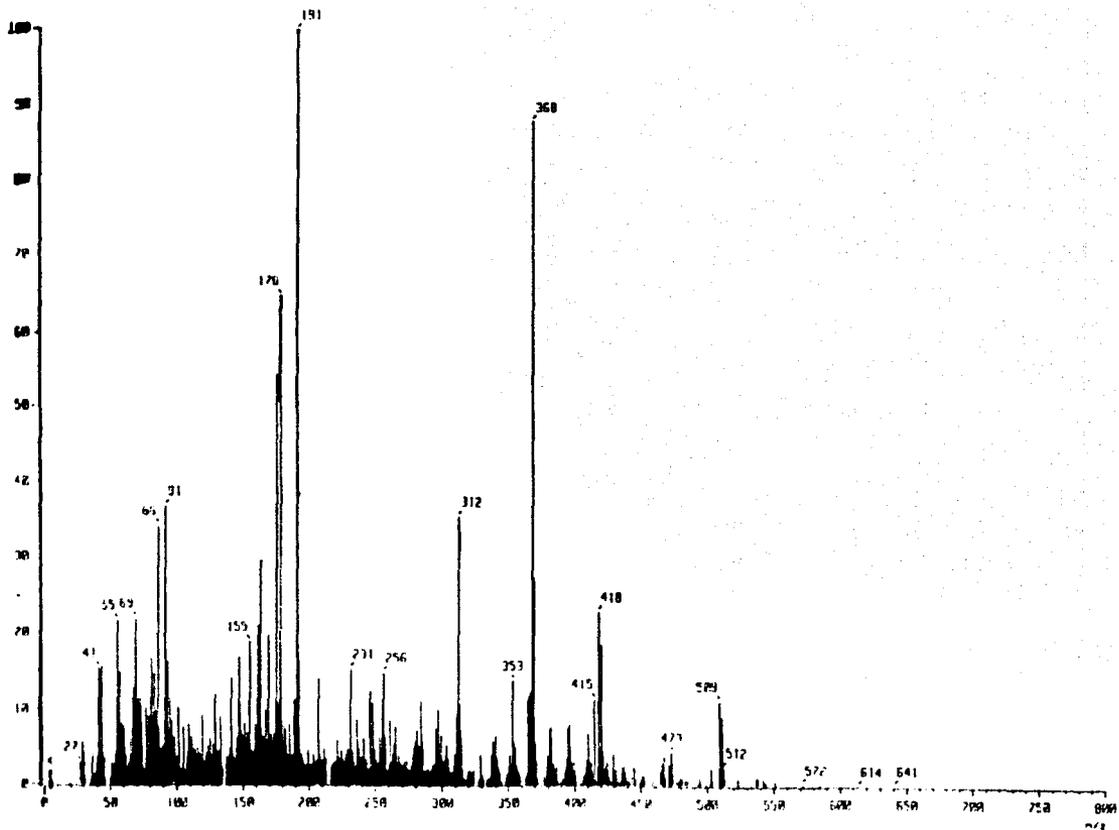


Gráfica No. 18. Espectro de masas del paclobutrazol.

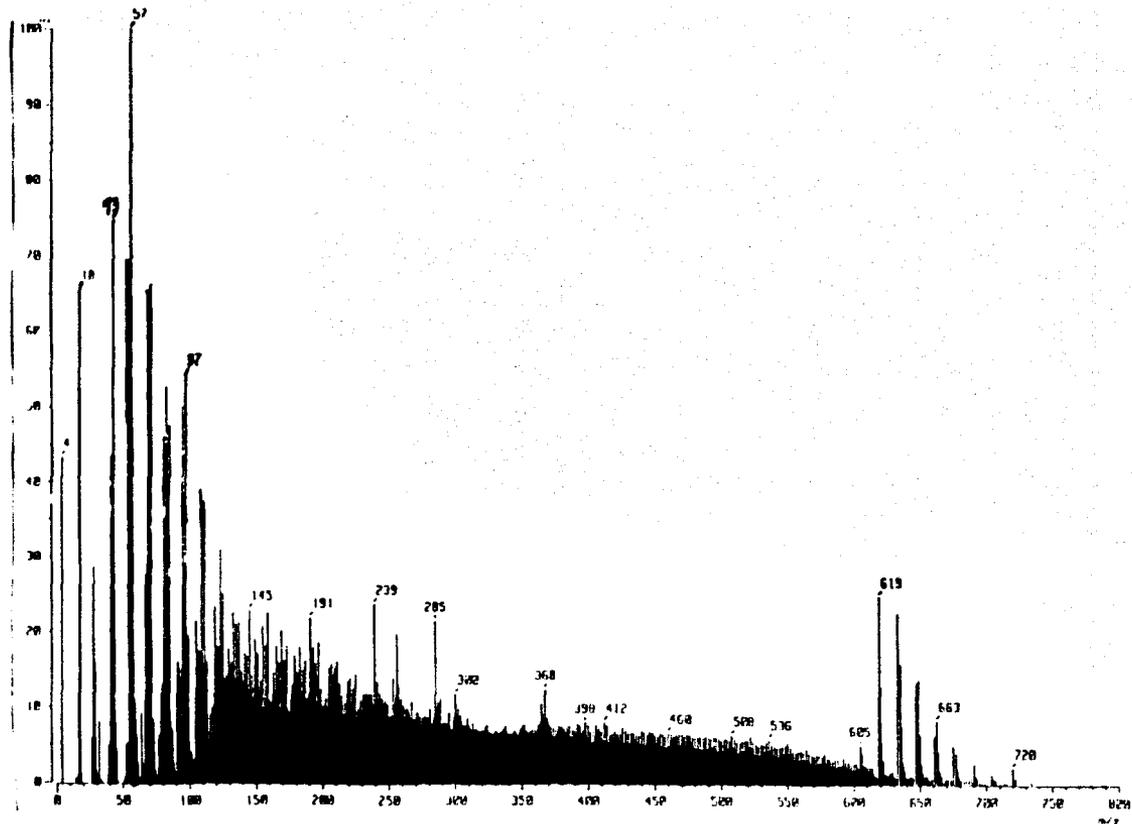
Tabla No. 17 Caracterización de picos del espectro de masas del paclobutrazol obtenido por impacto de electrones (EI – MS)

Ion	Asignación	Vía 1 m/z (%)	Vía 2 m/z (%)	Vía 3 m/z (%)	Vía 4 m/z (%)	Vía 5 m/z (%)	Vía 6 m/z (%)	Vía 7 m/z (%)
A	M <sup>+</sup>	294 (0.70)	294 (0.70)	294 (0.70)	294 (0.70)	294 (0.70)	294 (0.70)	294 (0.70)
B	[M-(CH <sub>3</sub> )-H] <sup>+</sup>	278 (1.76)	278 (1.76)	278 (1.76)	278 (1.76)	278 (1.76)	278 (1.76)	278 (1.76)
C	[M-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -C] <sup>+</sup>	236 (100)	236 (100)	236 (100)	-	-	-	-
D	[M-OH-H] <sup>+</sup>	218 (2.11)	-	-	-	-	-	-
E	[M-OH-C] <sup>+</sup>	-	207 (4.92)	207 (4.92)	-	-	-	-
F	[M-H] <sup>+</sup>	-	206 (3.52)	-	-	-	-	-
G	[M-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> N <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	-	-	-	179 (1.40)	179 (1.40)	179 (1.40)	-
H	[M-C] <sup>+</sup>	-	-	-	167(25.53)	167(25.53)	167(25.53)	-
I	[M-OH-C] <sup>+</sup>	-	-	-	149 (2.48)	-	-	-
J	[M-OH-C] <sup>+</sup>	-	-	-	-	138 (10.56)	138 (10.56)	-
K	[M-C-H] <sup>+</sup>	-	-	-	-	125 (41.54)	-	-
L	[M-C-H] <sup>+</sup>	-	-	-	-	112 (10.56)	-	-
M	[M-Cl] <sup>+</sup>	-	-	-	-	-	103 (6.38)	-
N	[M-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> Cl-CH <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	-	-	82(18.43)	-	-	-	-
N	[M-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> Cl- C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> N <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> - C] <sup>+</sup>	-	-	-	-	-	-	57 (9.92)

- \* Relación masa / carga
- \*\* % de abundancia relativa



Gráfica No. 19a. Espectro de masas del extracto de tubérculos de S. tuberosum sin tratar con Cultar 25Sc



Gráfica No. 19b. Espectro de masas del extracto de tubérculos de *S. tuberosum* tratados al 4% v/v de Cultar 25 SC.

## 7. Análisis estadístico.

- a) Análisis de varianza para el número de tubérculos por planta por tratamiento de Solanum tuberosum.

Número de tubérculos / planta / tratamiento				
%	0%	2%	4%	
Paclobutrazol (cultar 25 sc)				
Número de Tubérculos / planta	6	8	11	
	7	7	10	
	6	6	10	
	8	6	8	
	7	10	12	
	5	8	10	
	7	7	11	
	8	10	7	
	7	6	12	
	6	6	10	
	6	6	10	
	5	-	15	
	-	-	14	
	n	12	11	13
$\bar{x}$	6.5	7.27	10.77	-
$\sum x$	78	80	140	298
$\sum x^2$	518	606	1564	2688
				<b>Total</b>

Tabla de ANOVA

F.V.	g.l	SC	CM	$f_c$	$f_a$
Tratamiento	2	129.72	64.86	23.41	3.30
Error	33	91.5	2.77		
Total	35	221.22			

$$H_0 = \bar{x}_1 = \bar{x}_2 = \bar{x}_3 \text{ (El \% PBZ NO influye)}$$

$H_A =$  No todas las medias son iguales (El % PBZ SI influye)

$\alpha = 0.05$  . Se rechaza  $H_0$  si  $f_c > f_a$

Se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_A$ , siendo la conclusión del análisis que el % PBZ SI

**INFLUYE**

b) Análisis de varianza para el peso individual de tubérculos por tratamiento de Solanum tuberosum.

%	Pesos individuales de tubérculos / tratamiento									
	0%			2%			4%			
Paclotrazol (cultar 25 sc)	9.8	2.8	22.4	3.6	37.6	3.8	5.8	0.9		
	14.3	2.3	16.8	1.7	55.5	4.5	3.8	0.6		
	10.1	1.8	12.9	2.9	19.5	3.7	5.1	0.9		
	7.0	45.4	13.7	1.7	5.9	3.0	5.0	0.5		
	3.5	36.0	10.1	1.0	14.9	1.3	2.4	0.5		
	5.9	21.7	8.5	0.5	11.5	3.2	2.4	0.6		
	4.1	21.5	6.2	0.7	6.5	6.0	3.0	0.3		
	5.0	17.1	5.8	0.7	5.6	3.2	2.2	0.1		
	3.1	11.0	4.6	0.7	4.7	1.7	2.4	0.2		
	2.1	17.6	5.8	0.4	3.1	1.6	2.5	0.1		
	1.5	6.9	5.1	0.5	3.1	0.8	3.0	0.1		
	0.8	10.0	5.0	0.6	3.3	1.2	1.9	0.1		
	0.8	10.4	4.3	0.5	2.8	1.4	1.4	13.2		
	0.7	6.7	3.5	0.5	2.3	1.8	1.7	0.1		
	0.6	12.3	3.5	0.2	3.1	0.3	2.0	0.4		
	44.7	7.0	2.5	25.3	1.0	0.3	1.5	0.1		
	25.9	5.5	2.6	7.0	2.0	0.4	1.5	0.2		
	11.8	6.3	2.6	7.0	1.2	0.3	1.1	0.3		
	10.3	2.9	2.7	8.0	0.8	0.4	1.5	0.5		
	12.6	1.5	2.2	5.2	0.2	0.3	1.6	0.5		
	13.1	3.5	1.2	2.4	1.1	0.3	0.9			
	5.4	0.8	1.8	2.2	0.5	0.3	0.7			
	8.8	0.5	1.9	2.1	0.5	0.2	0.6			
	4.9	0.2	0.4	2.4	0.4	0.1	0.2			
	4.2	0.3	8.3	1.7	0.4	0.1	15.5			
	3.4	0.1	40.5	1.1	0.3	0.1	25.5			
	2.8	0.2	26.3	1.0	0.1	20.7	2.3			
	2.4	0.1	19.1	1.2	0.1	14.8	20.5			
	2.3	7.0	17.5	0.6	34.4	16.4	23.4			
	1.7	9.8	15.4	0.6	47.1	14.8	1.7			
	1.5	5.4	4.7	18.9	5.1	14.5	20.6			
	1.6	7.7	3.9	8.8	15.4	5.2	15.4			
	0.4	5.2	3.0	4.8	12.2	6.9	14.1			
	0.3	4.9	0.8	5.6	12.1	6.2	12.6			
	40.7	3.3	0.9	4.5	1.0	10.8	4.5			
	34.8	3.2	0.7	3.7	1.2	8.9	5.0			
	20.8	2.2	0.7	4.2	12.3	5.0	3.2			
	15.6	2.7	0.3	3.1	8.7	6.1	2.6			
	12.0		15.4	21.9	5.6	5.5	0.8			
	10.0		21.1	17.6	6.0	11.0	1.0			
n	78	60	140	298						
R	8.86	7.03	6.86							
Σx	664.9	576.7	413.0	2154.6						
Σx <sup>2</sup>	13720.21	14661.91	20863.74	49245.86						
				Total						

Tabla de ANOVA

F.V	gl	SC	CM	$f_c$	$f_u$
Tratamiento	2	200.98	100.49	0.88	3.04
Error	295	33466.87	113.44		
Total	297	33667.65			

$H_0 = \bar{X}_1 = \bar{X}_2 = \bar{X}_3$  (El % PBZ NO influye)

$H_a =$  No todas las medias son iguales (El % PBZ SI influye)

$\alpha = 0.05$  ; Se rechaza  $H_0$  si  $f_c > f_u$

Se acepta  $H_0$ , siendo la conclusión del análisis que el % PBZ NO INFLUYE

c) Análisis de varianza para el peso de tubérculos por planta por tratamiento de Solanum tuberosum.

Para realizar el análisis se partió de los siguientes datos

% Cultar 25 sc	Peso de tubérculos (g) / maceta	Numero de plantas / Maceta
0 %	248.5	4
	70.0	2
	194.9	3
	160.4	3
2 %	245.1	4
	149.0	3
	148.0	2
	67.8	2
4 %	256.6	4
	274.0	4
	205.0	3
	189.3	2

Se tomaron datos promedio de peso de tubérculos, para sacar los pesos de tubérculos por planta, de acuerdo al peso por maceta y al número de plantas por maceta

Pesos de tubérculos / planta / tratamiento				
%	0%	2%	4%	
Paclobutrazol (cultar 25 ec)				
	62 12	61 27	68 5	
	62 12	61 27	68 5	
	62 12	61 27	68 5	
	62 12	61 27	68 5	
	35 00	49 66	68 3	
	35 00	49 66	68 3	
	64 96	49 66	68 3	
	64 96	74 00	64 15	
	64 96	74 00	64 15	
	53 46	33 90	64 15	
	53 46	33 90	64 15	
	53 46	-	94 65	
	-	-	94 65	
n	12	11	13	36
$\bar{x}$	56 14	55 44	71 14	-
$\sum x$	673 74	604 86	924 89	2208 49
$\sum x^2$	39118 89	35664 80	67154 10	141937 79
			Total	

Tabla de ANOVA

F.V.	g l	S C	C.M	$t_c$	$f_a$
Tratamiento	2	1956 41	978 205	7 17	3 30
Error	33	4497 25	136 28		
Total	35	6453 66			

$H_0 = \bar{x}_1 = \bar{x}_2 = \bar{x}_3$  (El % PBZ NO influye)

$H_A =$  No todas las medias son iguales (El % PBZ SI influye)

$\alpha = 0.05$  ; Se rechaza  $H_0$  si  $t_c > f_a$

Se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_A$ , por lo que el % PBZ SI INFLUYE

d) Análisis por la técnica Student – Newman – Kuels para el número de tubérculos por planta de S. tuberosum.

Si se toma la decisión de rechazar  $H_0$  en el análisis del inciso (a), ahora se continuara el análisis para determinar que parejas de tratamientos difieren significativamente. Se sigue el procedimiento descrito en la sección 2.9.2

$$1) \bar{X}_1 \quad \bar{X}_2 \quad \bar{X}_3$$

$$6.5 \quad 7.27 \quad 10.77$$

$$2) S_x = \sqrt{\frac{S^2}{n_j}} \quad S^2 = \frac{Sc_{error}}{n-k} = \frac{91.5}{33}$$

$$S_x = \sqrt{\frac{2.77}{12}} \quad S^2 = 2.77$$

$$S_x = 0.48$$

	K	2	3
g.l			
Rp		2.89	3.49
DMS		1.38	1.67

COMPARACION	DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
$\bar{X}_3 - \bar{X}_1$	$10.77 - 6.5 = 4.27 > 1.67$
$\bar{X}_3 - \bar{X}_2$	$10.77 - 7.27 = 3.5 > 1.38$
$\bar{X}_2 - \bar{X}_1$	$7.27 - 6.5 = 0.77 < 1.38$

Aquellas parejas de medias con diferencia mayor que el valor de DMS, se dice que difieren significativamente

- $\bar{X}_3$  y  $\bar{X}_1$ , Difieren significativamente
- $\bar{X}_3$  y  $\bar{X}_2$ , Difieren significativamente
- $\bar{X}_2$  y  $\bar{X}_1$ , No difieren significativamente

Por lo tanto hay diferencia significativa entre los tratamientos 0% PBZ y 2% PBZ con respecto a 4% PBZ y no hay diferencia significativa entre 0% PBZ y 2% PBZ.

e) Análisis por la técnica SNK para el peso de tubérculos por planta por tratamiento de Solanum tuberosum.

$$1) \bar{X}_1 \qquad \bar{X}_2 \qquad \bar{X}_3$$

$$56.14 \qquad 55.44 \qquad 71.14$$

$$3) S_x = \sqrt{\frac{S^2}{n_j}} \qquad S^2 = \frac{Sc_{error}}{n-k} = \frac{4497.25}{33}$$

$$S_x = \sqrt{\frac{136.28}{12}} \qquad S^2 = 136.28$$

$$S_x = 3.36$$

g.l.	K	2	3
Rp		2.89	3.49
DMS		9.71	11.72

COMPARACION	DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
$\bar{X}_2 - \bar{X}_1$	15 > 11.72
$\bar{X}_3 - \bar{X}_2$	15.7 > 9.71
$\bar{X}_3 - \bar{X}_1$	-0.7 < 9.71

Hay diferencia significativa entre los tratamientos 0% PBZ y 2% PBZ con respecto a 4% PBZ y no hay diferencia significativa entre 0% PBZ y 2% PBZ.

## 8. Análisis y discusión de resultados.

En lo concerniente al rendimiento de tubérculos de plantas tratadas se observó aumento en peso fresco de tubérculos a la cosecha como lo indican los resultados mostrados en la gráfica No 2 Para precisar a que se debe ese aumento en el rendimiento de tubérculos se tomaron los resultados del análisis de varianza (AV) Los AV aplicados a los parámetros mencionados en la sección 7 (análisis estadístico) dan evidencias de que el rendimiento en peso fresco del tubérculo se debe a un aumento del número de tubérculos por planta y no por aumento del tamaño y/o peso individual de los tubérculos ya que no hay diferencia significativa en cuanto a peso individual de los mismos encontrándose por el contrario diferencia estadística en el número de tubérculos por planta y en el peso de tubérculos por planta

El reducido tamaño de los tubérculos cosechados se debe principalmente a las condiciones de cultivo ya que se sabe que un volumen limitado de terreno compactación de suelo etc provoca un inadecuado desarrollo de tubérculos además de que se trabajó sin utilizar ningún tipo de fertilizantes

La disminución de la altura de tallo de las plantas tratadas con respecto a los testigos fue evidente y algo esperado ya que uno de los efectos principales de las GAs es controlar la longitud de los tallos de plantas superiores entonces al inhibir su biosíntesis (mediante la inhibición de monooxigenasas dependientes del citocromo P450 responsables de las oxidaciones del ent-kaureno el cual es el precursor en la ruta biosintética de las GAs como ya se ha mencionado anteriormente) estos disminuyen de longitud proponiendo según bibliografía que las GAs dirigen la síntesis de carbohidratos a tallo entonces al inhibirlas es factible proponer que esta biosíntesis se dirige hacia raíces (en este caso a los tubérculos) por tal razón se provoca un aumento en la tuberización (el mecanismo bioquímico de este hecho es desconocido) Otro aspecto importante es que el efecto del paclobutrazol es significativo estadísticamente en cuanto a rendimiento de tubérculos al ser aplicado foliarmente al 4% (no se aplicó al 3% por lo que no se puede saber si

también haya habido una diferencia significativa estadísticamente al ser aplicado a esta concentración)

Los resultados del análisis bromatológico muestran que no hay una diferencia considerable en cuanto a contenido de humedad y materia seca (datos que coinciden con el AV para peso individual de tubérculos) tampoco hay diferencia en cuanto a los contenidos de cenizas totales de ambas especies ya que el paclobutrazol no está implicado en la asimilación de compuestos inorgánicos por las raíces (aunque en ocasiones se encuentran algunas diferencias en cuanto a cantidad de iones inorgánicos en frutales tratados con paclobutrazol por períodos de varios años pero en este caso no hay influencia por ser condiciones totalmente distintas en cuanto a especie ciclo vegetativo modo de administración condiciones de cultivo etc.). En cuanto a la cantidad de almidón si hay una tendencia a aumentar (en aproximadamente 1% del peso fresco) pero no se puede decir que es considerable este efecto puede ser debido a que el paclobutrazol estimula la síntesis de carbohidratos en raíces (por los argumentos ya expuestos en párrafos anteriores) y de este modo dirige la biosíntesis hacia estas en lugar de al tallo no pudiéndose especificar que tipo de carbohidratos son los que aumentan en raíces ya que solo se cuantificó almidón y fibra cruda y no oligosacáridos y monosacáridos. Un efecto similar se observó con la cantidad de proteína hubo un aumento de aproximadamente 1% en peso en fresco (resultado también esperado ya que en experimentos *in vitro* reportados se ha comprobado que el paclobutrazol inhibe la acumulación de patatina en tubérculos (mecanismo no estudiado). En lo que respecta a lípidos totales y fibra cruda no se observó ningún cambio considerable (con este hecho se puede deducir que la modificación en la distribución y/o biosíntesis de carbohidratos se da a nivel de almidón o azúcares libres posiblemente).

De los resultados de la purificación y extracción de paclobutrazol en el agroquímico utilizado (Cultar 25 SC) de acuerdo al análisis e interpretación de los espectros de masas obtenidos a partir de la elusión del extracto por cromatografía de gases de los dos picos obtenidos en el cromatograma (gráfica No 17) el primero de ellos corresponde a una mezcla de acetona y otro solvente que se consideran contaminantes en el extracto los cuales no interfieren en la identificación del compuesto de interés ya que los tiempos de retención entre estos y el

paclobutrazol: son muy grandes y hay por tanto una buena resolución de los picos. El segundo pico corresponde al paclobutrazol puro de acuerdo al análisis del espectro de masas obtenido (gráfica No. 18), así que este espectro fue confiable para la identificación posterior de paclobutrazol en los extractos de los tubérculos.

En cuanto al análisis de los extractos de los tubérculos sometidos en su totalidad (previa concentración del extracto) directamente al espectrómetro de masas para obtener por impacto de electrones un espectro total de todos los compuestos contenidos en él con el fin de detectar el espectro de masas del paclobutrazol, no se observó la presencia de este en los extractos, aunque la concentración de compuestos presentes en los extractos fue muy baja, por lo que sería necesario repetir este procedimiento con una mayor cantidad de muestra (ya que en otros resultados reportados de la cuantificación de paclobutrazol residual en otras especies vegetales es del orden de  $\mu\text{g/g}$  de peso fresco) para asegurar que no hay efecto residual, pero si es conveniente mencionar que aunque se detectara en una mayor cantidad de muestra, lo más probable es que estuviera por debajo de sus niveles tóxicos, debido a la alta sensibilidad del equipo de masas que no detectó nada del compuesto con la cantidad de muestra utilizada. Cabe comentar otra observación en cuanto al patrón de espectros de masas obtenidos de las dos muestras sometidas al análisis, era lógico esperar que los dos espectros de la totalidad de los extractos fuera el mismo, pero no fue así, son similares, esto se puede deber a la variabilidad que existe en cuanto a la concentración de compuestos presentes en los tubérculos. Por último es conveniente precisar que la identificación de paclobutrazol en los tubérculos se limitó a detectar al compuesto de forma libre y no se realizó la identificación de posibles metabolitos del mismo, así como también solo se realizó su búsqueda en raíces y no en otras partes de la planta.

En lo que respecta a determinar el número de aplicaciones necesarias para obtener los mayores efectos benéficos en cuanto a rendimiento y calidad alimenticia, es necesario realizar otro experimento en el cual se tomarían como variables mayores dosis de paclobutrazol a administrar y realizar una comparación aplicándolo un número distinto de veces durante el ciclo vegetativo de la planta para determinar el número de aplicaciones óptimas tomando en cuenta siempre el aspecto toxicológico.

## 9. Conclusiones.

El paclobutrazol aplicado por vía foliar al 4% v/v (Cultar 25 SC) incrementa el rendimiento de tubérculos a la cosecha de forma estadísticamente significativa

El incremento en el rendimiento de los tubérculos a la cosecha se debe a un aumento en el número de tubérculos por planta y no por aumento de tamaño o peso de los tubérculos de forma unitaria

La composición bromatológica de los tubérculos tratados con paclobutrazol no difiere considerablemente con respecto a los tubérculos testigo aunque sí se observa una tendencia a aumentar la cantidad de almidón y proteína total

El paclobutrazol no está presente en su forma libre (estructura química no conjugada) en tubérculos de Solanum tuberosum tratados al 4% v/v siendo recomendable realizar la identificación de este en otras partes de la planta y en forma conjugada (metabolitos)

Es recomendable repetir el experimento con el fin de llegar a determinar la concentración a la cual el paclobutrazol provoca los mayores efectos beneficios en cuanto a los parámetros ya mencionados, e incrementar la concentración aplicada para determinar hasta que concentración sería factible aplicarlo (tomando en cuenta niveles tóxicos)

## 10. BIBLIOGRAFÍA.

- 1.- Alvarado, Montaldo. Cultivo y Mejoramiento de la Papa Ed Instituto Interamericano para la agricultura San José, Costa Rica, 1984 Págs 23-29, 39-41, 44; 81-83, 97-108, 583-587
- 2.- Álvarez, Aguilar Paulino Comportamiento de variedades mejoradas de papa (*Solanum tuberosum* L.) en el rancho Almaraz Tesis. Ingeniero Agrícola F.E.S.-C. UNAM 1986 Pags 1-9
- 3.- Axtmayer H Joseph Manual de Bromatología Ed Oficina Sanitaria Panamericana Washintong D C 1942 Págs 285-291
- 4 - Azcon-Bieto J Fisiología y Bioquímica vegetal Ed Interamericana Mc-Graw Hill Madrid, España 1993 Pags 301-316
- 5 - Bandara P M S Tanino, K K Paclobutrazol enhances minituber production in Nortland potatoes Journal of plant growth regulation, 14(3), 151-155, 1995
- 6 - Bandara M S Tanino K K And Waterer, D R Effect of Pot size and Timing of plant Growth Regulator Treatments on Growth and tuber yield in Greenhouse – Grown Nortland and Russet Burbank Potatoes Journal of Plant Growth Regulation, 17 75-79 1998
- 7 - Bastin R Tratado de Fisiología Vegetal Ed Continental Barcelona España, 970 Pags 424-430
- 8.- Bautista Gonzales Heriberto Eduardo Efecto del Carbo – vit respecto al rendimiento en papa (*Solanum tuberosum* L) variedad alpha en el valle de Toluca Tesis Facultad de Ciencias Agrícolas, U A E M 1996 Pags 3-7 10-15
- 9.- Bei Knap W R The Molecular Biology of the potato 2<sup>o</sup> ed Ed CAB Internacional Guildfor, Inglaterra 1994 Pags 45-52, 161-172
- 10.- Bidwell, R G S Fisiología Vegetal 1<sup>o</sup> Ed (en Español) Ed A G T editor Mexico, D F 1993 Págs. 245-246 421-427, 608-612, 624, 625

- 11.- Bradsnaw, J.E. Potato Genetics Ed. C.A.B. International. Cambridge. 1994 Pags 10-13
- 12.- Cronquist, Arthur. Introducción a la botánica 2ª. Edición. Ed. Continental, Mexico. D.F. 1981 Pág. 683
- 13.- Dai- Yunqing Liu -Su, et al. Determination of PP333 (Paclobutrazol) in apples by high performance liquid chromatography. Sepu, 13(6), 453-457, 1995
- 14.- Devlin, M Robert Plant Physiology 4ª edición Ed Wadsworth Publishing Company Belmont, California. E U A 1983 Págs. 389-395
- 15.- Edward A. Stahly and Buchanan A. David. Extraction, Purification, and Quantitation of paclobutrazol from fruit Tree Tissues. Hortsciencie 21(3), 534-535, 1986
- 16.- Flores Benitez Fernando. Probabilidad y estadística Departamento de Matemáticas E.S.I.Q.I.E.-I.P.N
- 17.- Flores, Menendez Jorge Alberto. Bromatología Animal, 3ª ed Ed Limusa, Méx D.F., 1983, Págs. 38-43
- 18.- FAO Paclobutrazol. FAO Plant Production and protection paper 93/2, 1998 Pags 39-51
- 19.- //genete.pue.udlap.mx/~pwesche/3\_19.html, Febrero, 2000
- 20.- Gneron, Don. Developmental Regulation of plant Gene Expression Ed Thompson Litho Ltd., Great Britain, 1991 Pags 74-89
- 21.- Henry, J Richard. Química clínica Tomo I 2ª ed Ed Jims Barcelona, España 1980 Págs 406-408
- 22.- Hewlett- Packard. Memorias: Curso de cromatografía de Gas. Mexico, 2000
- 23.- Hopkins, G William. Introduction to plant Physiology 2ª ed Ed John Wiley and Sons, Inc. U.S.A., 1995 Pags 287-325, 335362.

- 24.- INEGI El Sector Alimentario en México México, D. F., 1997
- 25.- INEGI gob mx/estadistica/español/economia/ganadana/gan\_01.html
- 26.- Johnson, A R Biochemistry and Methodology of Lipids Ed Wiley-interscience U.S.A., 1971.
- 27.- Juscafresa, Baudilio. Patata: Su cultivo Ed AEDOS, Barcelona, España, 1982 Pags 7-13
- 28.- Kiser, W Robert Introduction to Mass spectrometry and its application Ed Pretince-Hall U.S.A. 1965 Pags 32-83, 207-238
- 29.- Lees, R Analisis de los Alimentos 2ª ed Ed Acnbia, Zaragoza, España Pag 61
- 30.- Manuales para educación agropecuana, Papas Ed Trillas Mexico, D.F., 1983 Pags 11-16.
- 31.- Maynard, A Joslyn Methods in food analysis, 2ª ed Ed Academia Press New York, U.S.A., 1970. Pags 112-114, 143-156, 552-553
- 32.- Mehouchi, J Tadeo, F. R., et al Effects of gibberellic acid and paclobutrazol on growth and carbohydrate accumulation in shoots and roots of citrus rootstock seedlings Journal of horticultural science, 71(5) 743-754 1996
- 33.- Mena, Medina Ma de la Luz La problemática de micoplasmosis (punta morada) y su control en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L) en el Valle de Huamantla, Tlaxcala Tesis Ingeniero Agrícola F E S – C. U N A M., 1985 Pags 4-22
- 34.- Moore C Thomas Biochemistry and Physiology of plant Hormones 2ª ed Ed Springer – Vertag, U.S.A 1989 Pags 104-113
- 35.- Morfin Loyden Lilian Manual de laboratorio de Bromatología Departamento de Medicina Veterinaria y Zootecnia F E S – Cautiflan, UNAM Pags 69-71, 82-83, 89-91
- 36.- Okuda H, Kihara –T, Iwagaki – I Effects of paclobutrazol application to soil at the beginning of maturation on sprouting, shoot growth, flowering and carbohydrate contents in roots and leaves of satsuma mandarin Journal horticultural science 71(3) 785-784 1996

- 37.- Orbone, D.R. Análisis de los nutrientes de los alimentos. Zaragoza, España, 1986 Pags 140-145; 168-170
- 38.- Pearson, D. Técnicas de laboratorio para el análisis de los alimentos. Ed. Acribia, Zaragoza, España, 1986 Pags 39-44, 60-62, 68-71
- 39.- Pretsch, Erno. Tables of spectral data for structure determination of organic compounds. 2ª ed. Ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1989 Pags M-5 – M255
- 40.- Primo, E. Yufera. Química Agrícola. Vol. II. Ed. Alambra, Madrid, España, 1980 Pags 587-598
- 41.- Rojas, Garcidueñas, Manuel. Fisiología vegetal aplicada. 2ª ed. Ed. Mc Graw – Hill, México, D.F., 1982 Pags 158-175
- 42.- Rosestein, Stern, Emilio. Diccionario de especialidades agroquímicas. 6ª ed. Ed. PLM, México, D.F., 1996 Pags 829-830
- 43.- Ruzic-Durdina. Effect of paclobutrazol on in vitro rooting of sour cherry cv. Sumadinka (*Prunus cerasus* L.). Journal fruit ornamental plant research 4(1), 11-20, 1996
- 44.- Salisbury, B. Frank. Plant Physiology. 4ª ed. Ed. Wadsworth Publishing Company, Belmont, California, E U A, 1992 Pags 327-376
- 45.- Skoog, A. Douglas. Análisis Instrumental. 4ª ed. Ed. Mc Graw-Hill, Madrid, España, 1998 Pags 491-536, 704-727
- 46.- Scheffler, C. William. Bioestadística. Ed. Fondo educativo interamericano, México, 1981 Pags 122-143
- 47.- Stewart, Correll, Donovan. The potato and its wild relatives. Ed. Texas research foundation, Texas, U S A, 1962 Pags 14-17, 36-47, 260-269
- 48.- Supelco –Sigma – Aldrich. Catalogo 2000. Chromatography products for analysis and purification. U S A

- 49.- Talburt F. William Potato Processing 4ª ed Ed Avibook New York, U.S.A . 1987 Pags 11-
- 50.- Technical data sheet Paclobutrazol plant growth regulator for ornamentals Ed Plant protection division. Lab ICI Julio 21, 1997 Págs 1-4
- 51.- Tha Merck Index. Merck research Laboratones New Jersey, U.S.A . 1996 Pag 7117
- 52.- Toporek Milton Bioquímica 3ª ed Ed Interamericana México, 1985 Pag 194
- 53.- Wayne W Daniel Bioestadística Base para el análisis de las ciencias de la salud 5ª ed Ed Limusa. Mexico. D.F . 1995 Págs 345-372
- 54.- Weaver. J. Robert Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura Ed Trillas Méx. D.F. . 1976 Pags 119-123.
- 55.- Wilkins. B Malcolm Advanced Plant Physiology Ed Logman Scientific and Technical New York, N.Y.. 1984 Pags. 21-47.
- 56.- Willard. H. Hobart. Métodos instrumentales de análisis Ed Iberoamericana Méx. D.F . 1988 Págs. 455-498