

CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS NO ESTRUCTURALES EN TRES  
VARIEDADES DE ARROZ (*Oryza sativa L*), EN DIFERENTES ETAPAS DE  
DESARROLLO Y SU RELACIÓN CON EL RENDIMIENTO DE LA PLANTA

CARLOS ERAZO MELO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
SAN JUAN DE PASTO

2014

CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS NO ESTRUCTURALES EN TRES  
VARIETADES DE ARROZ (*Oryza sativa L*), EN DIFERENTES ETAPAS DE  
DESARROLLO Y SU RELACIÓN CON EL RENDIMIENTO DE LA PLANTA

CARLOS ERAZO MELO

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO AL COMITÉ CURRICULAR Y DE  
INVESTIGACIONES DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA COMO REQUISITO  
PARCIAL PARA OPTAR EL TÍTULO DE QUÍMICO

DIRECTOR:

MARIA CAMILA REBOLLEDO  
PhD. FISILOGÍA VEGETAL

CO-DIRECTORES:

JESUS CABRERA MONCAYO  
PhD. BIOQUÍMICA

MORALBA DOMINGUEZ GARCIA  
M.Sc. INORGANICA DE MATERIALES

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT)

UNIVERSIDAD DE NARIÑO

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

SAN JUAN DE PASTO

2014

## Nota de responsabilidad

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado son responsabilidad exclusiva del autor”.

Artículo 1° del acuerdo No 324 de octubre 11 de 1966, emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño

Nota de Aceptación

---

---

---

---

---

---

María Camila Rebolledo  
Directora

---

Jesús Antonio Cabrera  
Co-director

---

Moralba Domínguez García  
Co-directora

---

Claudia Guevara  
Jurado

---

Jesús Romo  
Jurado

San Juan de Pasto, Agosto de 2014

## AGRADECIMIENTOS

Mil gracias a la Ph.D. María Camila Rebolledo por el voto de confianza y la oportunidad que me dio al desarrollar esta investigación, por su valiosa enseñanza, acertada asesoría, por la confianza depositada en mí y por todas las oportunidades en pro de adquirir nuevos conocimientos

A la M.Sc. Moralba Domínguez por su amistad apoyo incondicional, sus consejos, su preocupación día a día, su valioso tiempo de asesoría y correcciones. Por transmitir todo el conocimiento sin recelo alguno y confiar siempre en mis capacidades.

Gracias a las dos por cultivar en mi ese espíritu de investigación, disciplina y perseverancia.

Al Ph.D. Jesús Cabrera Moncayo, por creer en mí, por su disposición y ayuda desinteresada durante este tiempo.

A la M.Sc. Ximena delgado quien me motivo a postularme a la convocatoria para desarrollar esta investigación.

A Angélica Jaramillo y Gerver Patiño por su ayuda en el laboratorio

A Andreita por su conocimiento y ayuda durante todo el ensayo en campo.

A todas las personas del programa de arroz del CIAT por su colaboración durante todo este tiempo.

A los docentes del programa de química de la Universidad de Nariño por todo el conocimiento académico que me brindaron.

A todas las personas que participaron e hicieron posible este logro.

## DEDICATORIA

A Dios por guiar mis pasos y estar siempre en cada momento de mi vida.

A mi mis padres por su sacrificio e infinita confianza, por sus palabras de aliento, por motivarme y darme la mano cuando las cosas parecían no tener salida. Mama gracias por tu fortaleza y entrega total. Hermanos; Leny, Jonier, Jamil y Jhon gracias por su atención y preocupación por estar ahí en continuo apoyo.

A ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

A la tía Orfa por aguantarme todo el tiempo en su casa por sus oraciones llenas de amor y buenos deseos. A mis primos Ivan y Sofía porque para la tía siempre fui un hijo y para ustedes un hermano.

A la tía Chava por cariño y afecto durante todo este tiempo.

A toda la familia porque han estado ahí siempre pendientes con preocupación o alegría en cada momento de mi vida.

Carlos Erazo Melo.

## RESUMEN

El arroz es uno de los cultivos de cereales más importantes del mundo y constituye un alimento básico para más de la mitad de la población mundial. Se necesita aumentar los rendimientos potenciales en grano de arroz proponiendo mejores variedades. Conociendo las características que permiten a las variedades obtener mejores rendimientos, se pueden proponer mediciones innovadoras que estén relacionadas con el rendimiento y que puedan ser utilizadas en mejoramiento de variedades de arroz.

Los carbohidratos no estructurales y su translocación en la planta podrían estar ligados a mejores rendimientos potenciales. Sin embargo esto no se ha validado en las variedades mejoradas en CIAT. Esta investigación busca demostrar la importancia de los carbohidratos no estructurales en el rendimiento de tres variedades cultivadas de arroz.

Se determinó la concentración de azúcares solubles mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y almidón por espectrofotometría Uv-Vis, en tres variedades de arroz; Azucena, IR64 y CT21375, durante cuatro etapas de desarrollo de la planta. Se asociaron las características de tipo metabólico con los componentes de rendimiento en arroz y con características fisiológicas. Esto permitió demostrar que las variedades con mejores rendimientos en arroz (IR64 y CT21735), también mostraron mejores índices de cosecha, mayor acumulación de carbohidratos en floración, y mayor reducción de estos carbohidratos hasta la cosecha. Las reservas de carbohidratos en tallos en floración y disminución hasta cosecha son características asociadas a altos rendimientos potenciales en las variedades utilizadas en el programa de mejoramiento.

## ABSTRACT

Rice is one of the most important cereal crops in the world and is a staple food for over half the world's population. There is a need to increase yield potential in rice, and breeding new high yielding varieties is one way to supply this need. Plant traits related to higher yields are used by breeders in order to select high yielding lines.

In this work, we target Nonstructural carbohydrates and their translocation in the plant, as traits that could be linked to yields. Since this has not been studied in improved CIAT varieties, this study is done for three rice cultivars adapted to different environments.

The concentration of soluble sugars was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) and starch by Uv-Vis spectrophotometry in Azucena, IR64 and CT21375, during four stages of plant development. Plant metabolic traits, yield components and some morphological characteristics were measured in all the varieties for four different growth stages. This study demonstrated that high yielding varieties (IR64 and CT21735) also had higher values for harvest index, greater accumulation of carbohydrates at flowering, and greater reduction of these carbohydrates until harvest. We conclude that nonstructural carbohydrates present as reserves in the stems at flowering and its reduction at harvest are associated to higher harvest index and yields for rice

## CONTENIDO

		Pág.
	INTRODUCCIÓN	19
1	OBJETIVOS	21
2	MARCO REFERENCIAL	22
2.1	Marco teórico	22
2.1.1	La importancia del cultivo de arroz en el mundo	22
2.1.2	Descripción de la planta de arroz ( <i>Oryza sativa</i> L.)	23
2.1.2.1	Clasificación botánica	23
2.1.2.2	Descripción morfológica	23
2.1.2.2.1	Parte Vegetativa	23
2.1.2.2.2	Parte Reproductiva	25
2.1.2.3	Desarrollo de la planta de arroz	27
2.1.2.4	Sistemas de siembra y variedades de arroz	28
2.1.3	Carbohidratos no estructurales	29
2.1.3.1	Producción de los carbohidratos no estructurales en las plantas	30
2.1.3.2	Relaciones fuente sumidero: determinantes de la localización de los carbohidratos	31
2.1.4	Análisis de carbohidratos en arroz y otros cereales	33
2.1.5	Componentes del rendimiento	34
2.1.6	Carbohidratos y rendimiento en el cultivo de arroz	35
2.1.8	Conceptos de validación de un método de análisis	36
2.1.8.1	Linealidad	37
2.1.8.2	Precisión	37
2.1.8.3	Repetibilidad	38
2.1.8.4	Precisión intermedia	38
2.1.8.5	Exactitud	38
2.1.8.6	Sensibilidad	38
2.1.8.6.1	Límite de detección	38
2.1.8.6.2	Límite de cuantificación	39
2.1.8.6.3	Método de Miller	39
3	METODOLOGÍA	40
3.1	Ubicación	40
3.2	Contexto metodológico	40
3.3	Manejo agronómico	41
3.4	Muestreos del material vegetal	41
3.5	Implementación del método y validación de azúcares solubles por HPLC	43
3.5.1	Implementación del método de extracción de azúcares	

	solubles	43
3.5.3	Análisis de almidón	45
3.6	Validación del método de cuantificación de azúcares solubles	47
3.6.1	linealidad	47
3.6.2	Precisión	47
3.6.3	Exactitud	47
3.6.4	Sensibilidad	48
3.7	Cálculo de variables morfológicas	48
3.8	Análisis estadístico	49
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
4.1	Implementación del método y validación de azúcares solubles por HPLC	50
4.2.	Validación de la metodología para determinar azúcares solubles por HPLC	54
4.2.1	Linealidad	54
4.2.2	Precisión	57
4.2.2.1	Repetibilidad del método	57
4.2.2.2	Repetibilidad instrumental	57
4.2.2.3	Precisión intermedia	58
4.2.3	Exactitud	59
4.2.4	Límite de detección y cuantificación	60
4.3	Comparación del rendimiento y sus componentes	61
4.4	Mediciones morfológicas	64
4.5	Concentración de azúcares solubles y almidón	70
4.6	Relación entre rendimiento y carbohidratos no estructurales	73
	CONCLUSIONES	74
	RECOMENDACIONES	76
	BIBLIOGRAFÍA	77
	NETGRAFIA	82
	ANEXOS	83

## LISTA DE ESQUEMAS

		Pág.
Esquema 1	Relación entre los órganos fuente y sumidero	32
Esquema 2	Variables: morfológicas, biomasa y determinación de carbohidratos no estructurales (CNE) evaluadas, en cuatro etapas de muestreo	42

## LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Órganos vegetativos de la planta de arroz	24
Figura 2	Partes de la panícula	26
Figura 3	Partes de la espiguilla	26
Figura 4	Características de cada fase de desarrollo de la planta de arroz	28
Figura 5	Cromatograma de azúcares solubles (rafinosa, sacarosa, glucosa y fructosa)	53
Figura 6	Panículas de arroz <i>Oryza sativa</i> L. A: IR64 (I, ramificaciones primarias) B: CT21375, (II Ramificaciones secundarias) C: Azucena (I, ramificaciones primarias).	63

## LISTA DE ECUACIONES

	Pág.
Ecuación 1 Rendimiento por hectárea (Kg/ha)	34
Ecuación 2 Porcentaje de coeficiente de variación	37
Ecuación 3 Límite de cuantificación	39

## LISTA DE TABLAS

	Pág.	
Tabla 1	Variables medidas durante el ensayo	43
Tabla 2	Métodos para determinar carbohidratos no estructurales totales en arroz y otros cereales encontrados en la literatura	44
Tabla 3	Métodos de extracción de azúcares solubles	44
Tabla 4	Niveles de concentración de cada curva de calibración	47
Tabla 5	Tiempo de retención característico para cada azúcar	53
Tabla 6	Parámetros de regresión ajustada por mínimos cuadrados	56
Tabla 7	Parámetros del análisis de varianza (ANOVA).	56
Tabla 8	Valores de T para cada curva de calibración	57
Tabla 9	Parámetros estadísticos para evaluar la repetibilidad del método	57
Tabla 10	Parámetros estadísticos para evaluar la repetibilidad instrumental	58
Tabla 11	Evaluación de la precisión intermedia	59
Tabla 12	Porcentajes de recuperación de cada azúcar	59
Tabla 13	Límite de detección y cuantificación de cada azúcar soluble	60

## LISTA DE GRAFICAS

		Pág.
Grafica 1	Concentración de azúcares solubles para cada método de extracción	51
Grafica 2	Curva de calibración de estándares de azúcares solubles	55
Grafica 3	Rendimiento estimado y componentes que lo determinan. A: rendimiento. B: índice de cosecha. C: número de tallos efectivos. D: masa 1000 granos. E: porcentaje de fertilidad. F: número de granos llenos por panícula	62
Grafica 4	A: número de tallos por planta. B: número de tallos por grado día por planta. C: longitud de la última hoja formada. D: biomasa vegetativa	65
Grafica 5	A: longitud del tallo principal. B: biomasa total: tallos, hojas panículas. C: número de tallos y numero de panículas	67
Grafica 6	A: Masa total de panículas (g/planta), B: partición de biomasa a panículas	68
Grafica 7	A: Partición de biomasa a hojas. B: partición de biomasa a tallos. C: partición de biomasa a panículas	69
Grafica 8	Concentración de carbohidratos no estructurales en tallos de arroz. A: sacarosa, B: glucosa, C: fructosa, D: Rafinosa, E: relación de hexosas sacarosa, F: almidón, G: Carbohidratos no estructurales totales	72

## LISTA DE ANEXOS

		Pág.
Anexo 1	Condiciones ambientales del ensayo en campo	83
Anexo 2	Validación del método enzimático para determinar almidón en tallos	85
Anexo 3	Comparación estadística métodos C y F de extracción	91
Anexo 4	Parámetros de validación	92

## GLOSARIO

CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical
Anova	Análisis de Varianza
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Uv-Vis	Ultravioleta visible
GRISP	Global Rice Science Partnership
IRRI	Institución internacional de arroz
DANE	Departamento Administrativo Nacional de Estadística
FEDEARROZ	Federación Nacional de Arroceros
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
SPS	Sacarosa fosfato sintasa
Triosa-P	Triosa fosfato
CV	Coeficiente de variación
S	Desviación estandar
X	Media aritmética
NQL	Laboratorio de calidad nutricional
N	Nitrogeno
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Pentaoxido de fosforo
K <sub>2</sub> O	Oxido de potasio
Zn	zinc
NaOH	Hidroxido de sodio
NADP	Nicotinamida adenosin difosfato

ATP	Adenosin trifosfato
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
D	Debye

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de arroz (*Oryza sativa L*), se considera el más importante dentro de la alimentación, ya que el 86% de la población mundial lo consume proporcionando más calorías por hectárea en comparación con otros cereales cultivados<sup>1</sup>. En Colombia, se cultivan cerca de 400.000 hectáreas de arroz produciendo cerca de 2´100.000 toneladas de arroz con cáscara al año. Los principales departamentos productores de arroz son Tolima, Meta, Casanare y Huila. De acuerdo al DANE y Fedearroz, cada colombiano consume en promedio 40 Kg de arroz blanco al año, como consecuencia en Colombia se consume cerca de 120´000.000 toneladas de arroz mensualmente. Por tanto, este cultivo es considerado el principal alimento dentro de la dieta alimenticia de los colombianos<sup>2</sup>.

La demanda proyectada en arroz supera la oferta a corto y mediano plazo; por cada mil millones de personas en el mundo se requiere producir 100 millones de toneladas de arroz con cáscara al año<sup>3</sup>. Así, una solución al problema de crisis alimentaria es desarrollar nuevas variedades de cultivo con mayor potencial de rendimiento, buscando mejores producciones sin ninguna limitación debida al ambiente<sup>4</sup>.

Adicionalmente, se presenta un estancamiento y/o descenso del rendimiento de las variedades actuales, las cuales no han podido superar a las variedades IR8 o IR64 desarrolladas en el Instituto Internacional de Arroz (IRRI), durante la revolución verde, y que presentan elevados registros de producción<sup>5</sup>. Sin embargo en CIAT se han desarrollado nuevas variedades que superan los rendimientos de IR8 como CT21735, sembradas en condiciones de siembra directa.

---

<sup>1</sup> Acevedo, M.A; Castrillo, W.A; Belmonte, U. C. Origen, Evolución y Diversidad del Arroz. En: Agronomía tropical [base de datos en línea]. No. 56 (2). 2006. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0002192X2006000200001&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0002192X2006000200001&script=sci_arttext), Consultado en 18 de enero de 2013.

<sup>2</sup> Fedearroz (Federación Nacional de Arroceros). Beneficios del Arroz. [En línea]. <<http://www.fedearroz.com.co/new/bondades.php>>. Consultado en 6 de marzo de 2013.

<sup>3</sup> GRISP (Global Rice Science Partnership). Sustainable crop productivity increase for global food security A CGIAR Research Program on Rice-Based Production Systems. 2010. [En línea]. <[http://www.grisp.net/file\\_cabinet/download/0x0000689c1?1312766027](http://www.grisp.net/file_cabinet/download/0x0000689c1?1312766027)>. Consultado en 1 de abril de 2013.

<sup>4</sup> Wang, Y; Li, J. J.. Branching in rice. 2011. Plant Biology. 14. p. 94-99.

<sup>5</sup> Jennings P; Berrio L.E. Corredor E. una estrategia de mejoramiento para incrementar el potencial de rendimiento en arroz. Foro arrocerero latinoamericano, 2002 8(2):10-13p

Dentro del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), la unidad de agrobiodiversidad y el programa de arroz han realizado múltiples estudios de investigación con el fin de aumentar la producción y calidad del arroz a nivel mundial a través del desarrollo de variedades con mayor contenido de nutrientes, rendimientos potenciales (elevados) y resistencia a factores bióticos (plagas y/o enfermedades) o abióticos (Frio, sequia). Este estudio corresponde a la primera fase de un proyecto de CIAT cuya finalidad es incrementar los rendimientos potenciales en arroz.

La fisiología vegetal es una herramienta para el mejoramiento de cultivos, la cual propone la medición de características finas de la planta que permitan explicar variaciones en rendimiento y calidad. Estas características le permiten al programa de mejoramiento desarrollar técnicas avanzadas para la selección de variedades y entender el comportamiento de sus variedades.

En efecto debido a que el rendimiento es la suma de varios componentes y factores que actúan a lo largo del ciclo de la planta en diferentes fases del cultivo, es necesario que la fisiología proponga características finas, que se relacionen con el comportamiento de la variedad, fáciles de medir, económicas y que estén relacionadas con el rendimiento de arroz.

Los carbohidratos almacenados juegan un papel importante en el metabolismo, crecimiento y desarrollo de la planta de arroz, siendo esenciales para la supervivencia cuando la fotosíntesis se reduce o se detiene<sup>6</sup>. En las diferentes etapas de desarrollo del cultivo, los carbohidratos solubles en agua como; glucosa, sacarosa y fructosa se acumulan en partes específicas de la planta, especialmente en tallos y hojas. La mayoría de estos se sintetizan en hojas y tejidos verdes, y se transportan como azúcares solubles, o se almacenan en forma de almidón o fructanos. Estos azúcares pueden potencialmente contribuir al rendimiento potencial, ya que podrían permitir llenar el grano sin importar si la fotosíntesis está limitada<sup>7</sup>. Esta investigación busca determinar la importancia de los carbohidratos no estructurales en el rendimiento de 3 variedades contrastantes de arroz, IR64, CT21735 (variedades de riego) y Azucena (variedad de seco).

---

<sup>6</sup> Kozlowski, T, T. Keller, T. Food relations of woody plants, En: Bot. Rev. 1966. p. 293-382,

<sup>7</sup> Ibid.

## OBJETIVOS

### 1.1. Objetivo general

Determinar la relación entre el contenido y el tipo de carbohidratos, las características morfológicas y el rendimiento productivo en grano de la planta, en tres variedades de arroz (*Oryza sativa. L*) durante diferentes etapas de desarrollo del cultivo.

### 1.2. Objetivos específicos

Implementar y validar la metodología de cuantificación de azúcares solubles por HPLC en tallos de arroz.

Cuantificar el contenido de glucosa, sacarosa, fructosa, rafinosa y almidón en tallos en tres variedades de arroz durante diferentes etapas de desarrollo.

Relacionar la cantidad de carbohidratos no estructurales con características morfológicas y el rendimiento para las tres variedades de arroz (CT21375, IR64, Azucena).

## 2. MARCO REFERENCIAL

### 2.1. Marco teórico

#### 2.1.1 La importancia del cultivo de arroz en el mundo.

El origen del arroz *Oryza sativa L.*, se remonta hace 10.000 años, en regiones húmedas de Asia tropical y subtropical, siendo en la actualidad un alimento de gran importancia a nivel mundial<sup>8</sup>.

El arroz a nivel mundial es el tercer cultivo de mayor producción después de la caña y el maíz<sup>9</sup>. La producción de arroz a nivel mundial, ha ido aumentando de manera paulatina en comparación con el crecimiento demográfico. Los países en desarrollo representan el 95%, siendo China e India los países responsables de más del 50% de la producción mundial. El comercio mundial de arroz en 2014 se pronostica en 38,3 millones de toneladas, un 2 % más que la estimación del comercio de 2013<sup>10</sup>.

La FAO ha pronosticado la utilización mundial de arroz en 2013/14 a 489.4 millones de toneladas (arroz elaborado), un 2,8% más que el año anterior. El incremento se basa en un aumento de 8 millones de toneladas en el consumo humano, a 410.6 millones de toneladas. Como consecuencia, se pronostica que el consumo medio de arroz per cápita será de 57,0 kilos en 2013/14, frente a 56,5 kilos en 2012/13 (FAO, 2014)<sup>11</sup>.

En Colombia, se cultivan cerca de 400.000 hectáreas de arroz produciendo cerca de 2'100.000 toneladas de arroz con cáscara al año. De acuerdo al DANE y Fedearroz, cada colombiano consume en promedio 40 Kg de arroz blanco al año, como consecuencia en Colombia se consume cerca de 120 mil toneladas de arroz mensualmente. Por tanto, este cultivo es considerado el principal alimento dentro de la dieta alimenticia de los colombianos<sup>12</sup>

---

<sup>8</sup> Acevedo. Op. Cit., p.151-170.

<sup>9</sup> FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Statistical Databases & Data-sets 2012. [En línea]. <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Consultado en 7 de Febrero de 2014.

<sup>10</sup> FAO. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). Seguimiento del Mercado del Arroz de la FAO (SMA). [En línea]. <<http://www.fao.org/economic/est/publications/publicaciones-sobre-el-arroz/seguimiento-del-mercado-del-arroz-sma/es/>>. Consultado en 30 enero, de 2014.

<sup>11</sup> *Ibid.*

<sup>12</sup> Fedearroz, Op.C

## 2.1.2. Descripción de la planta de arroz (*Oryza sativa* L)

### 2.1.2.1. Clasificación botánica

El arroz es una gramínea anual, autógama, perteneciente al género *Oryza*, división Angiospermae, clase Monocotyledoneae, orden Glumiflorae y familia Poaceae<sup>13</sup>

### 2.1.2.2. Descripción morfológica

#### 2.1.2.2.1. Parte vegetativa

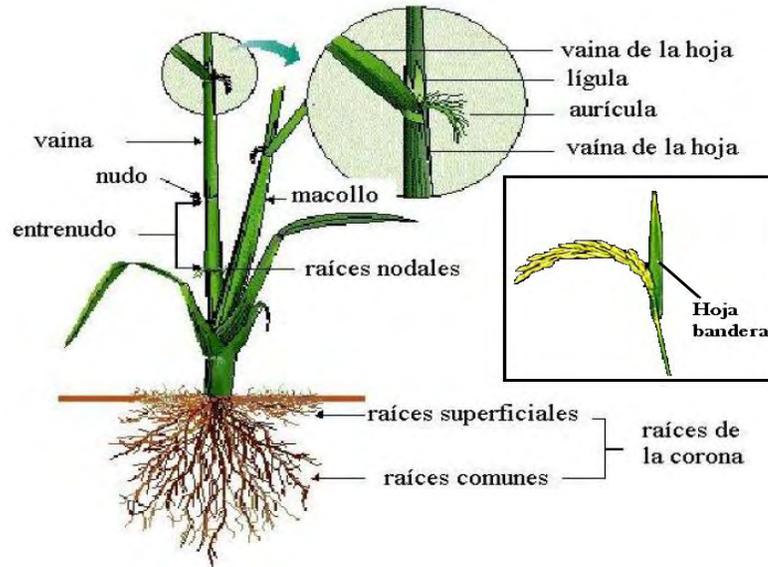
Los órganos vegetativos se componen de raíces, tallos y hojas. La planta de arroz presenta raíces fibrosas y existen dos clases:

- Raíces superficiales (seminales); las cuales crecen fuera de la radícula y son de naturaleza temporal.
- Raíces adventicias secundarias (comunes); las cuales son libremente ramificadas y producidas a partir de los nódulos inferiores del tallo joven, estas raíces reemplazan las raíces seminales.

---

<sup>13</sup> Watanabe, Y. Genomic constitution of genus *Oryza*. In: Matsuo, T; Futsuhara, Y; Kikuchi, F; Yamaguchi, H. eds. Science of the rice plant: genetics. Tokio. 1997. JP, FAPCR. p. 29-39.

Figura 1. Organos vegetativos de la planta de arroz



Fuente: Adaptado de Zamorano, D. Gonzales, N. [El cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). <[http://www.sap.uchile.cl/descargas/fisiogenetica/fisiologia\\_del\\_arroz.pdf](http://www.sap.uchile.cl/descargas/fisiogenetica/fisiologia_del_arroz.pdf)>. Consultado en 20 de marzo de 2013].

Los tallos o macollos primarios crecen a partir de los nódulos más bajos y dan lugar a tallos secundarios. Estos a su vez dan lugar a un tercer grupo llamado macollos terciarios.

Los tallos son redondos y huecos compuestos por nudos y entrenudos, hojas de lámina plana unidas al tallo por la vaina y su inflorescencia es la panícula ubicada en el ápice del tallo, protegida por una hoja terminal más ancha y corta que las anteriores, llamada hoja bandera<sup>14</sup>. De cada nudo, emerge una hoja que soporta a un ángulo en el tallo en dos filas, la hoja bandera es la más alta de donde se origina la panícula y la lígula es una estructura de forma triangular que se encuentra por encima de la aurícula como se observa en la Figura 1<sup>15</sup>.

<sup>14</sup> Arregoces, O; Rosero, M; González, J. 2005. Guía de estudio Morfología de la planta de arroz. Cali, CO, CIAT [En línea]. <[http://www.ciat.cgiar.org/riceweb/pdfs/morfologia\\_planta\\_arroz.pdf](http://www.ciat.cgiar.org/riceweb/pdfs/morfologia_planta_arroz.pdf)> Consultado en 16 enero de 2013.

<sup>15</sup> Zamorano, D. Gonzales, N. El cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) [En línea]. <[http://www.sap.uchile.cl/descargas/fisiogenetica/fisiologia\\_del\\_arroz.pdf](http://www.sap.uchile.cl/descargas/fisiogenetica/fisiologia_del_arroz.pdf)>. Consultado en 20 de marzo de 2013.

#### 2.1.2.2.2. Parte reproductiva

En la parte reproductiva se encuentran los órganos florales, tales como;

##### ➤ Panícula

La panícula es conformada por un grupo de espiguillas nacidas en el nudo superior del tallo. La base de la panícula es el nudo situado entre el entrenudo superior del tallo y el eje principal de la panícula. Asimismo, la base de la panícula se utiliza para medir la longitud de la panícula (Figura 2).

La rama primaria de la panícula se divide en otras ramas secundarias y a veces terciarias. Las ramificaciones secundarias y terciarias, son las que llevan las espiguillas. La panícula permanece erecta en el momento de la floración, sin embargo las espiguillas se caen cuando se llenan, maduran y forman los granos<sup>16</sup>. Las diferencias en longitud, forma, y número de ramas primarias, secundarias y terciarias así como el peso y el número de espiguillas por panícula están determinadas por la variedad, y su interacción con el ambiente.

##### ➤ Espiguilla

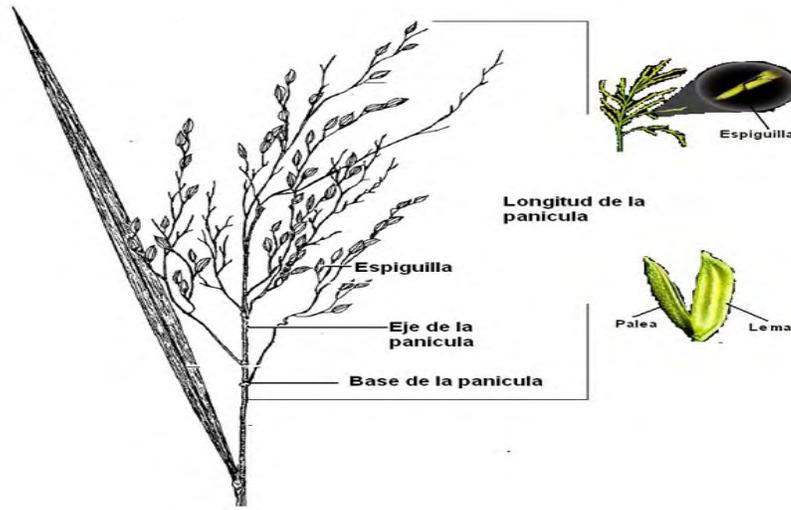
La espiguilla está formada por dos "glumas externas" (lemas estériles) muy pequeñas, y todas las demás partes florales se encuentra entre ellas o por encima de ellas. Crecen sobre el pedicelo, que las conectan con la rama de la panícula (Figura 3)<sup>17</sup>.

---

<sup>16</sup> De Datta, Surajit, K. Principles and practices of rice production.. John Wiley and Sons, Inc Canadá. 1981. P.146-152.

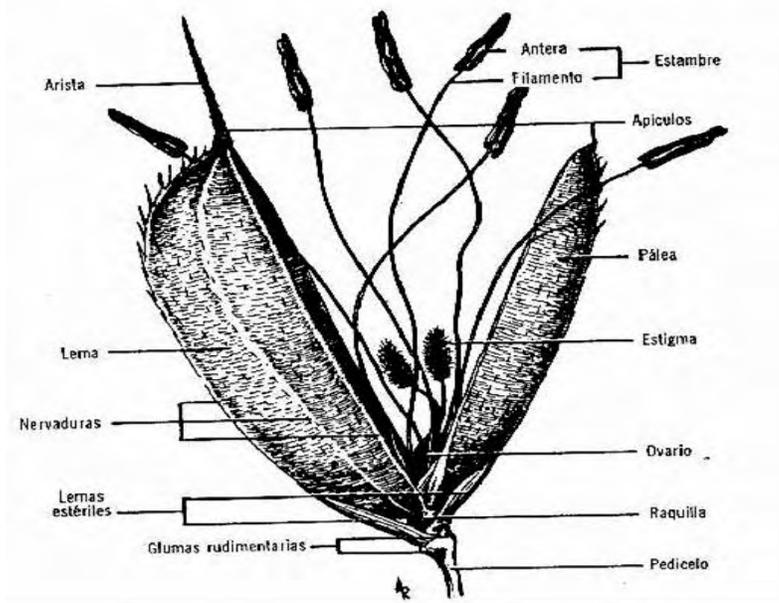
<sup>17</sup> Ibid.p152

Figura 2. Partes de la panícula



Fuente. Adaptado de Datta, Surajit, K. Principles and practices of rice production. Canada. John Wiley and Sons, Inc. 1981. p.151.

Figura 3. Partes de la espiguilla



Fuente. Adaptado de De Datta, Surajit, K. Principles and practices of rice production. Canada. John Wiley and Sons, Inc. 1981. p.152

## ➤ Grano

El grano de arroz está conformado por el ovario maduro, la lema, la palea, la raquila, las lemas estériles y las aristas. La lema y la pálea, en conjunto, constituyen la cáscara, y pueden removerse aplicando una presión giratoria<sup>18</sup>

### 2.1.2.3. Desarrollo de la planta de arroz

El ciclo de la planta de arroz se divide en tres fases (figura 4):

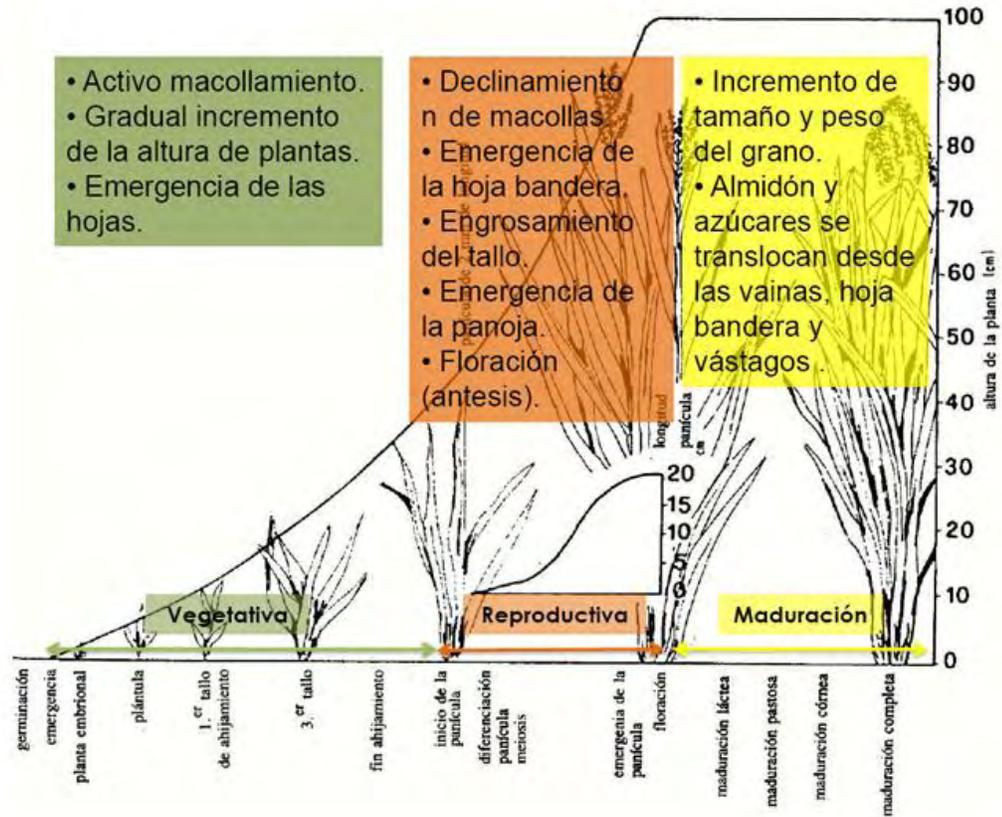
- La fase vegetativa es el periodo que transcurre desde la germinación (siembra y aparición del coleoptilo) hasta el macollamiento máximo (aparición del número máximo de tallos), el cual tiene una duración entre 45-50 días dependiendo de la variedad.
- La fase reproductiva es el periodo comprendido entre la iniciación de la panícula al interior del tallo hasta su emergencia (salida del tallo) y floración.
- La fase de maduración o llenado de grano corresponde al periodo entre la floración de las espiguillas hasta que el grano haya obtenido su madurez fisiológica (17 % de humedad relativa)<sup>19</sup>.

---

<sup>18</sup> Ibid., p.152

<sup>19</sup> Álvarez, L. Producción de arroz en los llanos occidentales de Venezuela. 1997. Barinas, UNELLEZ. p. 246

Figura 4. Características de cada fase de desarrollo de la planta de arroz



Fuente. Adaptado de De Datta, Surajit, K. Principles and practices of rice production. Canadá. John Wiley and Sons, Inc. 1981. p.161.

#### 2.1.2.4. Sistemas de siembra y variedades de arroz

Se conocen cerca de 100.000 variedades de arroz, por lo que sus características morfológicas son muy variables<sup>20</sup>. Se cultiva mayoritariamente en regiones tropicales (calientes y húmedas). El arroz inundado se cultiva en un suelo completamente anaeróbico (recubierto por agua), mientras que el arroz de secano o secano favorecido se cultiva en suelos no inundados y dependen solo de la lluvia o del riego que se le suministre.

El cultivo inundado presenta los mejores rendimientos (9-10 ton/ha) y es el más cultivado. Por otro lado, el arroz de secano presenta menores rendimientos (máximo 5 ton/ha).

<sup>20</sup> León, Op. Cit.

Dentro del género *Oryza sativa* existen veinte especies aproximadamente, sin embargo dos de ellas son las más cultivadas:

- Las variedades japónica; que producen un grano redondo y un arroz gelatinoso en el momento de la cocción, se utilizan más en los sistemas de seco.
- Las variedades índica; las cuales producen un grano alargado y seco en la cocción, se utilizan más en sistemas inundados.

### 2.1.3. Carbohidratos no estructurales en la planta de arroz

Los carbohidratos no estructurales almacenados tienen un papel importante en el metabolismo, crecimiento y desarrollo de la planta, son esenciales para la supervivencia cuando la fotosíntesis se ha reducido o se detiene<sup>21</sup>. En las diferentes etapas de desarrollo del cultivo, los carbohidratos solubles en agua como; glucosa, sacarosa y fructosa se acumulan en partes específicas de la planta, especialmente en tallos y hojas. Los carbohidratos no estructurales también juegan un papel importante como señalizadores influenciando el desarrollo de la planta. Por ejemplo las hexosas, pueden favorecer la división celular y la expansión, mientras la sacarosa favorece la diferenciación y la madurez de los órganos. La mayoría de carbohidratos se sintetizan en hojas y tejidos verdes, los cuales pueden transportarse como azúcares solubles, o almacenarse como azúcares, almidón o fructanos<sup>22</sup>.

Por lo tanto, los carbohidratos pueden dar estabilidad al cultivo y se podrían considerar como una reserva que permite evitar deficiencias energéticas en condiciones limitantes para el crecimiento de la planta. Estos azúcares pueden potencialmente contribuir al llenado de grano<sup>23</sup>, y por lo tanto aumentar los rendimientos o compensar la pérdida de carbohidratos cuando la fotosíntesis es afectada (por ejemplo en ambientes de baja luminosidad, baja cantidad de nitrógeno o simplemente factores que limiten el desarrollo de las hojas).

---

<sup>21</sup> Kozłowski y Keller, Op. Cit. p. 167-169.

<sup>22</sup> Slewinski, T, Non-structural carbohydrate partitioning in grass stems: a target to increase yield stability, stress tolerance, and biofuel production, En. Journal of experimental botany 13, 2012: 4647-4670

<sup>23</sup> Ibid. p 4659.

### 2.1.3.1 Producción de los carbohidratos no estructurales en las plantas

Los principales carbohidratos no estructurales elaborados por las plantas son:

- Azúcares solubles
  - ✓ Glucosa y fructosa: hexosas producidas en el proceso de fotosíntesis que también intervienen en su forma fosfatada en el metabolismo energético. Estos azúcares son la base de otros compuestos dentro de la planta.
  - ✓ Sacarosa: disacárido conformado por una molécula de glucosa y fructosa, es la forma de transporte de los azúcares dentro de la planta.
  
- Carbohidratos de reserva
  - ✓ Almidón: polisacárido constituido de cadenas ramificadas de glucosa, se encuentra como reserva en los amiloplastos y permite al tejido clorofiliano temporizar la síntesis de sacarosa a lo largo de la jornada.
  - ✓ Fructanos: oligosacaridos solubles en agua constituidos de fructosa derivados de la molécula de sacarosa.<sup>24</sup>

---

<sup>24</sup> Koch, K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. 2004. Current opinion in plant biology, 7. p. 235-24

### 2.1.3.2. Relaciones fuente sumidero: determinantes de la localización de los carbohidratos

En la planta se distinguen dos tipos de órganos: fuente y sumideros, según la función que cumplan en el metabolismo de los carbohidratos. Los órganos fuente corresponden a hojas, tallos, son autótrofos, al ser fotosintéticamente activos y generalmente exportan carbohidratos hacia los órganos sumidero. En particular las semillas son autótrofas pero no son fotosintéticamente activos, las reservas de nutrientes contenidas en el embrión son las que le permiten emerger. Los sumideros corresponden a órganos en crecimiento que demandan carbohidratos, son entonces heterótrofos como las hojas en expansión, raíces, panículas. Los órganos sumideros importan los carbohidratos esencialmente para su crecimiento, mantenimiento, y reserva en forma de almidón.

El carbohidrato de mayor reserva es el almidón, el cual puede transformarse en azúcares solubles<sup>25</sup>. Entre los azúcares solubles almacenados, la sacarosa es el principal carbohidrato traslocable, este se transporta vía floema a los órganos sumidero, para el crecimiento celular, metabolismo, respiración o almacenamiento y puede hidrolizarse en glucosa y fructosa dependiendo del metabolismo de la planta<sup>26</sup>.

Al observar relación fuente: sumidero a nivel celular, se puede decir que las células de crecimiento actúan como sumidero de carbohidratos, los cloroplastos pueden actuar como fuente de carbohidratos y las mitocondrias como sumideros.

Por lo tanto, los carbohidratos son transportados desde los órganos fuente hacia los sumideros generando un flujo que depende de la distancia entre los órganos, de las conexiones vasculares que los unen y de la fuerza de los sumideros como tamaño y actividad de estos.

Todo cambio que ocurra en la disponibilidad de carbohidratos genera reacciones en cadena que permiten regular la expresión de algunos genes y la actividad de algunas enzimas ligadas al metabolismo de carbohidratos de acuerdo al lugar de reserva o transporte. Así la formación de sacarosa en el cloroplasto se facilita por la acción de la enzima sacarosa fosfato sintasa. La sacarosa tiene múltiples vías ya que puede almacenarse como sacarosa o hidrolizarse a hexosas por la acción enzimática de las invertasas o también favorecer la formación de polímeros como lo es el almidón en plastidios<sup>27</sup>. (Esquema 1).

Existen evidencias sobre la acumulación de carbohidratos por la falta de aprovechamiento en la planta, trayendo como consecuencia la acumulación de

---

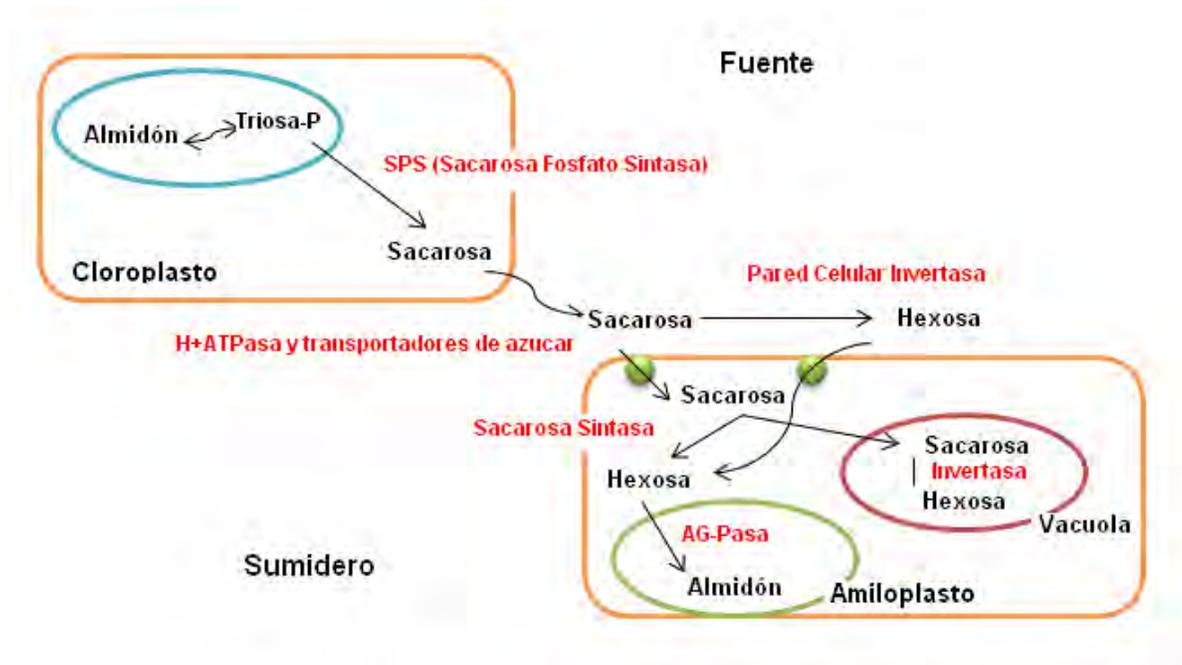
<sup>25</sup> Kozłowski, T. Carbohydrate sources and sinks in woody plants, *En Bot. Rev.* 58, 2.1992 p. 107-222

<sup>26</sup> Slewinski, Op cit.

<sup>27</sup> Winter H. et Huber, S.C. 2000. Regulation of Sucrose metabolism in higher plants: Localization and regulation of activity of key enzymes, *En Critical reviews in plant sciences*, 19. p. 31-67.

estos en forma de almidón y reducción de la actividad fotosintética. En arroz, bajo condiciones de radiación alta, humedad y temperatura específicas, se ha encontrado una reducción de la actividad fotosintética en horas del mediodía, provocando una limitación en el uso de la triosa fosfato en esta especie. Este mecanismo de retroalimentación también ha sido observado en otras especies como la palma aceitera y la soya en algunos casos<sup>28</sup>

Esquema 1. . Relación entre los órganos fuente y sumidero



Fuente. Adaptado de Toto, Priscilla. Etude biochimique du métabolisme des glucides en appui à la compréhension des mécanismes d'allocation des carbohydrates chez le riz sous contraintes hydriques: Etude des invertases acides et quantification des carbohydrates. Montpellier, 2008, 49 h. Stage de Master professionnel. Université Montpellier II.

<sup>28</sup> Villalobos, E. Fisiología de la Producción de Los Cultivos Tropicales. 1ª edición. En: Procesos fisiológicos básicos. [En línea]. No. 1 (2001). <[http://books.google.com.co/books?id=30uSclaUo94C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.co/books?id=30uSclaUo94C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)>. Consultado en 28 de marzo de 2013.

#### 2.1.4. Análisis de carbohidratos en arroz y otros cereales.

Existen múltiples métodos de extracción de azúcares solubles y almidón, realizados en arroz y otras cereales. Morita et al, (2011) evalúa la concentración de carbohidratos no estructurales totales en tallos de arroz durante llenado de grano utilizando amilasa y amiloglucosidasa, y cuantificando espectrofotométricamente<sup>29</sup>.

Sin embargo solo reporta carbohidratos totales, sin especificar el tipo de carbohidrato no estructural. Arai-Sanoh et al, (2011) determina la concentración de sacarosa, hexosas, almidón y celulosa en tallos y hojas de arroz, en etapa de maduración haciendo extracción con etanol para azúcares solubles y una hidrólisis de almidón con amilasa<sup>30</sup>.

Estos análisis fueron hechos en condiciones óptimas de crecimiento del arroz. Un estudio realizado por Sheoran, (1996) analizó la variación de la concentración de carbohidratos debido a estrés hídrico cuantificó la concentración de azúcares solubles totales en anteras de arroz bajo estrés hídrico mediante reactivo de antrona para determinar azúcares solubles y la hidrólisis de almidón con ácido perclórico<sup>31</sup>. Para evaluar la importancia de los carbohidratos en la etapa de llenado de grano, Nagata, (2002) determinó la concentración de carbohidratos no estructurales en hojas y tallos de arroz únicamente en etapa de floración con ácido para-hidroxibenzoico<sup>32</sup>. Griffith, (2000) determinó azúcares reductores en tallos y espiguillas de forrajes con tartrato de cobre y ácido arsenomolibdico<sup>33</sup>.

En trigo, Yang, (2007) determinó la cantidad carbohidratos totales en tallos, en condiciones no óptimas para el cultivo<sup>34</sup>. Bajo sequía Dreccer, (2009) cuantificó azúcares solubles totales<sup>35</sup>. Todos los autores mencionados anteriormente

---

<sup>29</sup> Morita, S. Nakano, H. Nonstructural Carbohydrate Content in the Stem at Full Heading Contributes to High Performance of Ripening in Heat-Tolerant Rice Cultivar Nikomaru. 2011. *Crop Science*. 51, 2. p. 818-828

<sup>30</sup> Arai-Sanoh, Y. et al. Genotypic Variations in Non-Structural Carbohydrate and Cell-Wall Components of the Stem in Rice, Sorghum, and Sugar Vane. 2011. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 75, 6. p. 1104-1112.

<sup>31</sup> Sheoran, Inder S. Saini, Hargurdeep S. Drought-induced male sterility in rice: Changes in carbohydrate levels and enzyme activities associated with the inhibition of starch accumulation in pollen. 1996. *Sexual Plant Reproduction*. 9, 3. p. 161-169

<sup>32</sup> Nagata, Kenji. Shimizu, Hiroyuki. Terao, Tomio. Quantitative Trait Loci for Nonstructural Carbohydrate Accumulation in Leaf Sheaths and Culms of Rice (*Oryza sativa* L.) and their Effects on Grain Filling. 2002. 52, 4. p. 275-283.

<sup>33</sup> Griffith, S. Changes in Dry Matter, Carbohydrate and Seed Yield Resulting from Lodging in Three Temperate Grass Species. 2000. *Annals of Botany*. 85, 5. p. 675-680

<sup>34</sup> Yang, De-Long. Jing, Rui-Lian. Chang, Xiao-Ping. Li, Wei. Identification of quantitative trait loci and environmental interactions for accumulation and remobilization of water-soluble carbohydrates in wheat (*Triticum aestivum* L.) stems. 2007. *Genetics*. 176, 1. p. 571-584.

<sup>35</sup> Dreccer, M. Fernanda. Van Herwaarden, Anthony F. Chapman, Scott C. Grain number and grain weight in wheat lines contrasting for stem water soluble carbohydrate concentration. 2009. *Field Crops Research*. 112, 1. p. 43-54.

demuestran que los carbohidratos no estructurales están relacionados a algún componente de rendimiento: número y peso de granos<sup>36</sup>, llenado de grano<sup>37</sup>, esterilidad de la planta<sup>38</sup>. Sin embargo no tienen en cuenta la etapa vegetativa.

#### 2.1.5. Componentes del rendimiento en arroz

Las componentes de rendimiento en arroz se evalúan a lo largo del ciclo de desarrollo de la planta y permiten determinar la producción en grano. De esta forma, durante el desarrollo del cultivo de arroz se definen: número de panículas por m<sup>2</sup>, número de espiguillas llenas (granos maduros), masa de 1000 granos.

Con estas componentes se puede calcular el rendimiento utilizando la ecuación 1.

Ecuación 1:

$$\text{Rendimiento por hectárea (Kg/ ha)} = (\text{número de panículas/m}^2) \times (\text{número de espiguillas/ panícula}) \times \text{porcentaje de espiguillas llenas} \times \text{masa de 1 000 granos (g)} \times 0,0001$$

Por ejemplo, si se cuentan con 50 panículas/m<sup>2</sup>, 100 espiguillas por panícula, 60 % de granos maduros y 15 gramos como peso de 1 000 granos, el rendimiento esperado debería ser de 4 500 Kg/ha o 4.5 t/ha.

Además cada componente del rendimiento de una variedad es determinado por una etapa particular de la vida de la planta. El número de macollas formadas durante la fase vegetativa determina el número de potencial de panículas/m<sup>2</sup>. La efectividad en la formación de panículas en cada tallo durante la fase reproductiva determinara el número efectivo de panículas/m<sup>2</sup>. El tamaño de la panícula, y el número de ramificaciones determina el número de granos por panícula, y durante la fase de maduración; el tamaño de grano más la fuerza de translocación de los carbohidratos provenientes de la fotosíntesis o de las reservas en los tejidos determinarán el porcentaje de granos llenos. Finalmente el peso de 1000 granos es determinado por la eficiencia en el llenado pero también por el tamaño de grano.

---

<sup>36</sup> Ibid p 49-53.

<sup>37</sup> Morita, Op. Cit., p. 826-827

<sup>38</sup> Sheoran, Op. Cit., p. 163-167.

Cada componente se determina o establece en diferentes etapas del crecimiento de la planta; así, el número de panículas por unidad de área se determina durante la fase vegetativa el número de espiguillas o granos por panícula durante la fase reproductiva y el porcentaje de granos llenos y el peso, durante la etapa de maduración<sup>39</sup>.

#### 2.1.6. Carbohidratos y rendimiento en el cultivo de arroz

El aporte en el rendimiento de arroz de los carbohidratos almacenados en fase vegetativa y traslocados durante el llenado de grano, puede variar entre el 20 y 40 % según la variedad y las condiciones del cultivo<sup>40</sup>. Sin embargo, en condiciones potenciales contribuyen en un 25% al rendimiento representando 70% la fotosíntesis. El 25% dado por los carbohidratos traslocados permitiría aumentar los rendimientos desde 1.9 hasta 2.1 t/ha<sup>41</sup>.

En arroz los mejores rendimientos están relacionados con el tamaño de los sumideros (panícula y granos por panícula)<sup>42</sup>. Variedades con rendimiento elevado muestran anchas células vasculares en el floema<sup>43</sup>, mayor translocación de biomasa y nitrógeno desde floración hasta cosecha<sup>44</sup>, mayor translocación de carbohidratos desde floración hasta cosecha<sup>45</sup>, mayor actividad de sacarosa y mayor acumulación de carbohidratos y almidón en hojas a floración<sup>46</sup>, mayor tasa de crecimiento durante la etapa reproductiva<sup>47</sup>, estos estudios sugieren un rol importante de los carbohidratos y de su translocación para mejorar los rendimientos.

---

<sup>39</sup> Secretaria de Agricultura y Ganadería (SAG). Dirección de Ciencia y Tecnología Agropecuaria (DICTA). Manual Técnico para el cultivo de Arroz. (*Oryza sativa* L). [En línea]. <<http://curlacavunah.files.wordpress.com/2010/04/el-cultivo-del-arroz.pdf>>. Consultado en 15 de octubre de 2013.

<sup>40</sup> Cock, James H. Yoshiida, Shouichi. Accumulation of Carbohydrate Before Flowering and its Subsequent Redistribution and Respiration in the Rice Plant. 1972. Proceeding of the Crop science Society of Japan. XXXI, 2. p. 226-234.

<sup>41</sup>. Ibid., p. 232

<sup>42</sup> Fujita, et al. NAL1 allele from a rice landrace greatly increases yield in modern indic cultivars. 2013. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 110, 51. p. 1-6.

<sup>43</sup> Ibid., p. 2-4

<sup>44</sup> Xiong, Jie. Ding, Cheng Qiang. Wei, Guang Bin. Ding, Yan Feng. Wang, Shao Hua. Characteristic of Dry-Matter Accumulation and Nitrogen-Uptake of Super-High-Yielding Early Rice in China. 2013. Agronomy Journal. 105, 4. p. 1142-1150

<sup>45</sup> Ohsumi, et al. Evaluation of yield performance in rice near-isogenic lines with increased spikelet number. 2011. Field Crops Research. 120, 1. p. 68-75.

<sup>46</sup> Ishimaru, Ken. Hirotsu, Naoki. Madoka, Yuka. Kashiwagi, Takayuki. Quantitative trait loci for sucrose, starch, and hexose accumulation before heading in rice. 2007. Plant physiology and biochemistry: PPB / Société française de physiologie végétale. 45, 10-11. p. 799-804.

<sup>47</sup> Kashiwagi, Takayuki. Ishimaru, Ken. Identification and Functional Analysis of a Locus for Improvement of Lodging Resistance in Rice<sup>1 [w]</sup>. 2004. National Institute of Agricultural Sciences. 134 february p 673-686

Por lo tanto las reservas de carbohidratos en floración están relacionadas con un incremento en el rendimiento potencial en variedades puras de arroz, este aumento parece estar relacionado con una mayor translocación y un mayor tamaño del sumidero (número de granos por panícula)<sup>48,49</sup>

El arroz difiere de otras gramíneas en la reserva de carbohidratos como sacarosa en hojas, sacarosa y almidón en tallos<sup>50</sup>. Luquet et al, (2008) y Rebolledo et al, (2012) reportaron una variación genética en la acumulación de sacarosa y almidón en órganos sumidero<sup>51, 52</sup> lo cual se confirmó en un panel de 180 variedades<sup>53</sup>. Esto sugiere que existe una diversidad genética para la acumulación de carbohidratos y por lo tanto que existe la posibilidad de mejorar las variedades actuales para que acumulen y trasloquen mas carbohidratos. En efecto, esta diversidad podría ser utilizada por los mejoradores, para crear variedades con altos rendimientos y mejor traslocación de carbohidratos.

#### 2.1.8 Conceptos de validación de un método de análisis

Reportar resultados confiables es de gran importancia para el desarrollo científico, por lo cual es necesario validar el método de cuantificación de azúcares solubles. Validar un método de análisis consiste en establecer experimentalmente datos que demuestren que el método tiene las características de desempeño adecuadas, cumpliendo con los requerimientos establecidos de error sistemático y aleatorio del método<sup>54</sup>. Existen diferentes parámetros a evaluar dentro de una validación, tales como linealidad, precisión, exactitud, sensibilidad entre otras.

---

<sup>48</sup> Fujita, Op. Cit., p. 3-4

<sup>49</sup> Katsura, Keisuke. Maeda, Shuhei. Horie, Takeshi. Shiraiwa, Tatsuhiko. Analysis of yield attributes and crop physiological traits of Liangyoupeijiu, a hybrid rice recently bred in China. 2007. Field crops research. 103, 3. p. 170-177

<sup>50</sup> Slewinski, Op. Cit., p. 4657

<sup>51</sup> Luquet, D. Clément-Vidal, A. Fabre, D. This, D. Sonderegger, N. Dingkuhn, M. Orchestration of transpiration, growth and carbohydrate dynamics in rice during a dry-down cycle. 2008. Functional Plant Biology. 35, 8. p. 689-704.

<sup>52</sup> Rebolledo, M. C. Dingkuhn, M. Péré, P. McNally, K. L. Luquet, D. Developmental Dynamics and Early Growth Vigour in Rice. I. Relationship Between Development Rate (1/Phyllochron) and Growth. 2012. Journal of Agronomy and Crop Science. 198, 5. p. 374-384.

<sup>53</sup> Rebolledo et al, 2014. En revisión

<sup>54</sup> Eurachem guide. The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. [en línea]. 1998. < <http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf>>. Consultado en 29 de abril de 2014.

### 2.1.8.1. Linealidad

Se refiere a la proporcionalidad, directa o después de la transformación matemática conveniente, entre la respuesta del método y la concentración del analito, dentro de un intervalo de concentraciones apropiadas. El intervalo de respuesta lineal o rango lineal de un método analítico es el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima del analito, para el cual el método ha sido probado<sup>55</sup>. El intervalo de respuesta lineal se puede evaluar por el coeficiente de correlación de la recta y por el análisis de varianza. La recta obtenida es una estimación de la verdadera recta y se considera estadísticamente válida, sí los valores de respuesta no se desvían significativamente del valor medio de la recta de mejor ajuste y la pendiente es significativamente diferente de cero<sup>56</sup>.

### 2.1.8.2. Precisión

Expresa el grado de dispersión entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea bajo condiciones establecidas.

El objetivo del estudio de precisión es conocer la variabilidad del método, ya que esta es debida a errores aleatorios inherentes del mismo. Debido a estos errores los análisis efectuados sobre muestras idénticas y en las mismas condiciones, no conducen a resultados idénticos. Este parámetro generalmente se expresa como el coeficiente de variación (CV) de una serie de medidas<sup>57</sup>.

La precisión se evalúa a través de la ecuación 2.

Ecuación 2. Porcentaje de coeficiente de variación  
S = Desviación estándar, X = media aritmética de los resultados

$$CV (\%) = \frac{S}{X} \times 100$$

---

<sup>55</sup> Ibid.

<sup>56</sup> Asociación Española de farmacéuticos de la industria (AEFI). Validación de métodos analíticos. Cataluña. 2001. p57-94

<sup>57</sup> Ibid.

### 2.1.8.3. Repetibilidad

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis, en las mismas condiciones operativas (analista, instrumento, reactivos, y laboratorio), en muestras idénticas en un período de tiempo corto<sup>58</sup>.

### 2.1.8.4. Precisión intermedia

Evalúa la concordancia entre resultados independientes obtenidos bajo el mismo, método, laboratorio e instrumento, en diferentes días y analistas.

### 2.1.8.5. Exactitud

Expresa la cercanía entre el valor que es aceptado como verdadero o valor de referencia y el valor experimental. El valor aceptado como verdadero puede ser obtenido de diferentes formas, una es comparando los resultados con un método que se ha establecido como referencia, en esta aproximación se asume que la incertidumbre del método de referencia es conocida.

Otra forma es a través del porcentaje de recuperación, realizando una adición de estándares de concentración conocida en la muestra y evaluando estadísticamente las diferencias significativas entre el porcentaje de recuperación obtenido y el esperado a través de una prueba de t student<sup>59 60</sup>

### 2.1.8.6. Sensibilidad

Corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo<sup>61</sup>. Los parámetros para evaluar la sensibilidad de un método son los límites de detección y cuantificación.

#### 2.1.8.6.1. Límite de detección

Es la menor concentración de analito que puede ser detectada en una muestra, pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones experimentales establecidas, y se puede diferenciar de la respuesta dada por el blanco con un nivel de confianza específico<sup>62</sup>. Para determinar el límite de detección existen varios métodos siendo el más utilizado el método de Miller.

---

<sup>58</sup> Ibid.

<sup>59</sup> Eurachem guide, Op. Cit.

<sup>60</sup> ICH Q2A. Text on validation of analytical procedures: Validation of Analytical Methods: Definitions and Terminology. 1995. [En línea]. < <http://www.pharma.gally.ch/ich/q2a038195en.pdf>>. Consultado en 29 de abril de 2014.

<sup>61</sup> Asociación Española de farmacéuticos de la industria (AEFI), Op. Cit., p. 86.

<sup>62</sup> Asociación Española de farmacéuticos de la industria (AEFI), Op. Cit., p. 87

#### 2.1.8.6.2. Límite de cuantificación

Es la mínima cantidad de analito presente en la muestra, que se puede cuantificar con una precisión y exactitud adecuada<sup>63</sup>. Matemáticamente se calcula a través de la ecuación 3.

Ecuación 3. Límite de cuantificación

$$Yc = yB \pm (k \times SB)$$

*Donde,*

$Yc$  = la señal de cuantificación.  $yB$  = promedio de los blancos.  $SB$  = la desviación estándar de los mismos;  $k=10$ , con un nivel de confianza de 99,86% que  $(yC \geq yB + KSB)$ <sup>64</sup>.

#### 2.1.8.6.3. Método de Miller

En este método el valor de  $YB$ , se toma como la ordenada en el origen de la recta de calibración, siempre y cuando se hayan analizado muestras con bajo contenido de analito y el termino  $SB$  es reemplazado por  $Sy/x$  debido a que cada punto en la representación gráfica tiene una variación distribuida normalmente en la dirección de  $y$  con una desviación estándar estimada por  $Sy/x$ <sup>65</sup>.

---

<sup>63</sup> ICH Q2A: ICH. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(r1). 2005. [En línea].

[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf). Consultado en 29 de abril de 2014.

<sup>64</sup> Asociación Española de farmacéuticos de la industria (AEFI), Op. Cit., p. 89-94

<sup>65</sup> Miller, N, J. Miller, J, C. Estadística y quimiometría para química analítica. 4 Ed. Madrid. Pearson. 2002. p. 296. ISBN 84-205-3514-1.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Ubicación

La investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), kilómetro 17 recta Cali Palmira. En el laboratorio de calidad nutricional (NQL) y el laboratorio de fisiología de arroz.

#### 3.2 Contexto metodológico

En este estudio se tuvo en cuenta una variedad Japónica adaptada a los sistemas de secano (Azucena), una variedad Indica adaptada a los sistemas de riego inundado (IR64) y una variedad mejorada con ancestros indica y japónica pero adaptada a sistemas de riego inundado (CT21735) a las cuales se les determino la concentración de carbohidratos específicos como son: sacarosa, glucosa, fructosa y almidón en tallos de arroz para establecer la importancia de estos durante las fases de desarrollo de la planta, permitiendo un mejor entendimiento a nivel fisiológico y futuras mejoras en rendimiento. Para esto fue necesario explorar las metodologías ya publicadas y utilizadas en arroz y otros cereales<sup>66 67</sup> Teniendo en cuenta la disponibilidad de quipos de cuantificación y optimizar el tiempo de extracción y análisis de azúcares solubles y almidón.

Para determinar la concentración de carbohidratos no estructurales se escogió la cromatografía líquida de alta eficiencia puesto que en CIAT en el Laboratorio de Calidad Nutricional se cuenta con un HPLC Agilent 1200. Además permite cuantificar específicamente cuatro tipos de azúcares rafinosa, sacarosa, glucosa y fructosa.

---

<sup>66</sup> Luquet, Op. Cit., p. 691.

<sup>67</sup> Dreccer, Op. Cit., p 45

### 3.3. Manejo agronómico

Se estudiaron tres variedades de arroz que representan tres orígenes o sistemas de cultivo diferentes; Azucena, IR64, CT21375. Las plántulas se trasplantaron al campo en cuando estaban en un estado fisiológico correspondiente a 4 hojas, usando un sistema de bloques completos al azar (tabla 1), para así tener en cuenta la variación existente derivada de la ubicación. Cada parcela constaba de seis surcos, cada uno con 13 plantas. La distancia entre planta y planta fue de 20 cm. Para un total de 78 plantas por parcela. La temperatura, radiación, humedad, pluviometría, y velocidad del viento en el crecimiento del cultivo, fue registrada a través de una estación meteorológica (anexo 1). El ensayo estuvo bajo condiciones óptimas de manejo agronómico. La dosis de fertilización en kilogramos por área de ensayo (125 m<sup>2</sup>) para cada elemento fue de; 2.5 de N, 0.75 de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 1.5 de K<sub>2</sub>O, 0.19 Zn cada una se distribuye entre las diferentes etapas de desarrollo del cultivo.

Inicialmente se aplicó la dosis básica 20% N, 100% de fosforo, 50% de potasio y 100% de hierro y Zinc, cuando las semillas pregerminadas fueron sembradas a las bandejas con lodo. En el primer reabono se aplicó el 50% de N, cuando las plantas tenían 4 hojas aproximadamente y ya estaban trasplantadas en campo. Esta aplicación se hizo en suelo seco e inmediatamente se estableció la lámina de agua. El segundo reabono se realizó 10 días antes del inicio de panícula y diferenciación de la misma, se aplicó 30% de N y 30% de K<sub>2</sub>O. Finalmente el tercer reabono se hizo a 50% de floración aplicando 20% de K<sub>2</sub>O.

La lámina de agua es fundamental para el control de malezas y además tiene otros efectos benéficos como la neutralidad del pH y el aumento de la disponibilidad de algunos elementos. Por lo tanto esta lámina se estableció inmediatamente después de la aplicación del primer reabono y se mantuvo hasta cerca de la cosecha.

### 3.4. Muestreos del material vegetal

Se hicieron 4 muestreos (esquema 2), cada muestreo se realizó antes de las 9 am, como es especificado en el protocolo de Luquet et al, (2008), para evitar diferencias entre plantas debido al metabolismo de los carbohidratos durante el día<sup>68</sup>.

De cada parcela, se tomaron tres plantas con características físicas similares y se colocaron en bolsas de papel cartón y en bolsas de sellado, inmediatamente se pasaron a neveras de icopor con hielo y se llevó a un cuarto frío. Los surcos de los extremos fueron descartados.

---

<sup>68</sup> Luquet, Óp. Cit., p.690

El análisis de azúcares solubles se hizo para cada muestreo (esquema 2), los cuales son representativos de cada fase: vegetativa, reproductiva y maduración y cosecha.

Esquema 2. Variables: morfológicas, biomasa y determinación de carbohidratos no estructurales (CNE) evaluadas, en cuatro etapas de muestreo.

			VARIABLES																																			
			Morfológicas																							Biomasa						Análisis de CNE						
Fase	Muestruos	Etapas de muestreo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34		
Vegetativa	1	8 HOJAS																																				
Reproductiva	2	FLORACION																																				
Maduración	3	22 DIAS DESPUES DE FLORACION																																				
	4	COSECHA																																				

Fuente. Esta investigación

En cada muestreo, se hicieron diferentes mediciones morfológicas y conteos (tabla 1). En el cuarto muestreo o cosecha se determinó la masa de mil granos, el número de granos vanos y número de granos llenos por panícula para determinar el rendimiento productivo por variedad. Las muestras se secaron en un horno a 65 °C durante 3 días para obtener su peso seco.

Los tallos se molieron por separado en capsulas de teflón con un balín de zirconio, durante 7 min, y tamizadas a través de un tamiz de 212 µm.

Tabla 1. Variables medidas durante el ensayo

Variables					
Número	simbolo	Nombre	Número	simbolo	Nombre
1	L.LL	Longitud de hoja bandera	18	DL	Hojas muertas
2	LL.W	Ancho de hoja bandera	19	P1	Panícula de tallo principal
3	T.L = H1	Longitud de tallo principal	20	P2	Número de panículas emergidas
4	NBT	Número de tallos	21	P3	Número de panículas embuchadas
5	NBL	Número de hojas verdes	22	LT4	Tallo 4
6	NDL	Número de hojas muertas	23	LP4	Panícula 4
7	L.EXP	Longitud de la hoja en expansion	24	LL 4	Longitud hoja bandera tallo 4
8	NBLMS	Número de hojas en el tallo principal	25	LLW4	Ancho de hoja bandera tallo 4
9	LP	Longitud de panícula en el tallo principal	26	P.P4	Masa panícula tallo 4
10	H2	Longitud 2 ( inicio del tallo- inicio de panícula)	27	T (g)	Masa de tallos
11	H3	Longitud 3 ( inicio de tallo- inicio de hoja bandera)	28	Hv(g)	Masa de hojas verdes
12	P2	Número de panículas fuera del tallo	29	Hm(g)	Masa de hojas muertas
13	P3	Número de panículas dentro de tallo	30	P1 (g)	Masa de panícula 1
14	GV	Grano vano	31	P2 (g)	Masa de panícula 2
15	GLL	Grano lleno	32	T4 (g)	Masa de tallo 4
16	T.	Tallos	33	P3 (g)	Masa de panícula 3
17	GL	Hojas verdes	34	CNE (mg/g)	Carbohidratos no estructurales

Fuente. Esta investigación

### 3.5. Implementación del método y validación de azúcares solubles por HPLC

#### 3.5.1. Implementación del método de extracción de azúcares solubles

A partir de una revisión de artículos científicos se identificaron diferentes métodos de extracción de carbohidratos no estructurales en cereales (tabla 2). De acuerdo a esto los métodos de extracción más utilizados de azúcares solubles en arroz y otros cereales son aquellos que utilizan agua y etanol al 80%, por la solubilidad que presentan los azúcares en estos solventes.

Los métodos más utilizados para la extracción de azúcares solubles fueron evaluados 10 ensayos de extracción utilizando diferentes solventes y modificando parámetros de tiempo y temperatura (tabla 3), con el fin de determinar la metodología más adecuada para el ensayo en términos de precisión, exactitud reproducibilidad, costo y tiempo.

Tabla 2. Métodos para determinar carbohidratos no estructurales totales en arroz y otros cereales encontrados en la literatura.

Autor	Título de la publicación	Carbohidratos a determinar	Ensayo	Técnica de Cuantificación
Morita, S	Nonstructural Carbohydrate Content in the Stem at Full Heading Contributes to High Performance of Ripening in Heat-Tolerant Rice Cultivar Nikomaru	Carbohidratos no estructurales totales	Enzimático con amilasa y amiloglicosidasa	Gravimetría
Yumiko, A	Genotypic Variations in Non-Structural Carbohydrate and Cell-Wall Components of the Stem in Rice, Sorghum, and Sugar Cane	Sacarosa, hexosas, celulosa y almidón	Extracción con Etanol 80%- hidrólisis de almidón con amilasa	HPLC
Sheoran, I	Drought-induced male sterility in rice: changes in carbohydrate levels and enzyme activities associated with the inhibition of starch accumulation in pollen	Carbohidratos no estructurales totales y almidón	HCl 2,5 N- reactivo de antrona para azúcares reductores-Hidrólisis de almidón con ácido perclórico 30%.	Uv-Visible
Nagata, K	Quantitative Trait Loci for Nonstructural Carbohydrate Accumulation in Leaf Sheaths and Culms of Rice ( <i>Oryza sativa</i> L.) and their Effects on Grain Filling	Carbohidratos no estructurales totales	Hidrólisis de polisacáridos con ácido hidroxiparabenzoico.	Uv-Visible
Yang, DL	Identification of Quantitative Trait loci and Environmental Interactions for Accumulation and Remobilization of Water-Soluble Carbohydrates in Wheat ( <i>Triticum aestivum</i> L.) Stems	Carbohidratos totales	Extracción con H <sub>2</sub> O destilada- reactivo de antrona.	Uv-Visible
Griffith, S	Changes in DM, Carbohydrate and Seed yield resulting from lodging in three temperate grass species	Azúcares solubles totales	Extracción etanol 80%- tartrato de cobre alcalino y ácido arsenomolibdico	Uv-Visible
Dreecer, M	Grain number and grain weight in wheat lines contrasting for stem water soluble carbohydrate	Azúcares solubles totales	Extracción con Etanol 80%. H <sub>2</sub> O. Reactivo de antrona	Uv-Visible

Fuente. Esta investigación

Tabla 3. Métodos de extracción de azúcares solubles.

Método	Masa(mg)	Disolvente 1	Lavado	Temperatura (°C)	Tiempo de extracción (min)
A	50	Acido sulfurico 5mM		25	30
B	50	Acido sulfurico 5mM		25	30
C	50	*Etanol 80%	Etanol 50%	80	30
D	50	Etanol 80%	Etanol 50%	80	30
E	50	Etanol 80%	Agua 18 mΩ	80	60
F	50	Etanol 80%	Etanol 80%	80	60
G	75	Agua 18 mΩ		80	60
G1	50	Agua 18 mΩ		80	60
G1	50	Agua 18 mΩ		60	60
G3	50	Agua 18 mΩ		40	60

\*Dos extracciones con etanol 80%

Fuente. Esta investigación.

Los diferentes métodos partieron de una cantidad de muestra seca (tabla 3), la cual se disolvió en ácido sulfúrico, etanol o agua según el método de extracción y se agitó durante 30 seg. En los métodos con etanol y agua la extracción se hizo en

baño térmico variando condiciones de tiempo y temperatura de acuerdo al método. En los métodos con ácido sulfúrico la extracción de azúcares se hizo a temperatura ambiente en agitación constante durante 30 min. Luego se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min y se removió el sobrenadante. Según el método al sólido obtenido después de la extracción se le hizo un lavado con etanol o agua y se centrifuga a las mismas condiciones anteriormente expuestas. En los métodos con etanol y agua los azúcares extraídos se secaron en un concentrador a vacío durante 6 horas a 45 °C.

Finalmente la muestra se diluyó en 1 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM, y se filtró a través de un filtro de membrana 0,22 µm, para ser analizada por un HPLC Agilent 1200, equipado con un detector de índice de refracción utilizando como fase móvil H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mM. Se inyectó 15 µL de la muestra, la cual fue separada a través de una columna Biorad Aminex HPX 87H, a un flujo isocrático de 0.6 mL/min, con una temperatura de 35°C. La cuantificación de azúcares solubles fue realizada a través de una curva de calibración externa (Sección 2.5.1) Esto para todos los métodos de la tabla 3.

### 3.5.3. Análisis de almidón.

El método para el análisis de almidón es una adaptación de la metodología de Anne Clément de CIRAD<sup>69</sup> (comunicación personal del autor y utilizada por Luquet et al, 2008 y Rebolledo et al, 2012). Esta metodología fue validada en el laboratorio de calidad nutricional (anexo 2).

En el procedimiento, se tomó el sólido resultante de la extracción de azúcares solubles, y se realizaron dos lavados con etanol 80% (adicción de etanol, centrifugación y remoción del sobrenadante) con el fin de eliminar el posible remanente de azúcares solubles. El sólido se secó en concentrador al vacío durante 1.5 h, y la masa total del sólido fue registrada como P1.

Posteriormente, 1 mL de NaOH 0.02 N se adicionó al sólido y se llevó a 90°C en un baño durante 1.5 h aplicando tres veces agitación y se centrifugo a 1500 rpm durante 2 min. Luego se adicionó 100 µL de amiloglucosidasa (5mg/mL) (EC: 232-877-2) preparada en buffer de citrato (0.32 M, pH 4.2). Se colocó en baño térmico a 50°C durante 1 h, aplicando dos veces agitación, y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min. Los tubos fueron pesados y su masa fue registrada como P2.

La medición requirió el uso de un buffer de trietanolamina (TEA) al 14%, con 0.25% de MgSO<sub>4</sub> a pH 7.6. De este buffer se midió 32.4 mL y se adicionaron 54.6 mL de agua 18 mΩ (beaker de reacción). Por separado, se pesó 32.4 mg de NADP y se disolvieron en 6.4 mL de agua destilada (tubo 1), el cual se adicionó al beaker de reacción. Separadamente se disolvieron 162.4 mg ATP en 6.4 mL de

---

<sup>69</sup> Anne Clément Vidal. Metodología para análisis de almidón. [correo electrónico]. Mensaje enviado a: María Camila Rebolledo. 11 de enero de 2013. [Consultado en 28 de octubre de 2013]. Comunicación personal

agua (tubo 2), y se pesó 162.4 mg de  $\text{NaHCO}_3$  (tubo 3). El tubo 2 fue adicionado al tubo 3 y el tubo 3 al beaker de reacción.

La cuantificación de almidón se realizó por espectrofotometría a través una curva de calibración de glucosa (Sigma Aldrich con 99.5%). Los estándares fueron preparados a partir de una solución madre, utilizando como diluyente una solución de  $\text{NaOH}$  0.02N y un buffer de citrato de sodio en proporción 10:1 respectivamente, utilizando como blanco el diluyente con la enzima amiloglucosidasa.

Finalmente, 91  $\mu\text{L}$  de la muestra hidrolizada o estándar fueron adicionados a 1.4 mL del medio de reacción y agitados. En un plato de 96 pozos se adicionaron 310  $\mu\text{L}$  de la solución anterior, y se midió la absorbancia a 340 nm ( $A_1$ ) en un espectrofotómetro de multiplato BIOTEK  $\mu\text{quant}$ . Luego se agregó 30  $\mu\text{L}$  de la enzima hexocinasa/glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (HK/GG6P-DH) a 3 mg/ml, EC 2.7.1.1/ 1.1.1.4.9, se agitó a 300 rpm durante 10 min, y nuevamente se midió la absorbancia a 340 nm ( $A_2$ ). Para realizar los cálculos se tomó  $A_2 - A_1$ .

### 3.6. Validación del método de cuantificación de azúcares solubles

#### 3.6.1. Linealidad

Se construyeron 4 curvas de calibración por triplicado a partir de estándares de glucosa, fructosa, sacarosa y rafinosa obtenidos de Sigma Aldrich. Se preparó una solución stock, de la cual se prepararon diferentes niveles de concentración de cada estándar (tabla 4), utilizando como diluyente ácido sulfúrico 5 mM.

Tabla 4. Niveles de concentración de cada curva de calibración en mg/mL

Estándar	nivel 1	nivel 2	nivel 3	nivel 4	nivel 5	nivel 6
Rafinosa	0,10	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
Sacarosa	0,15	1,5	3,0	4,5	6,0	7,5
Glucosa	0,15	1,5	3,0	4,5	6,0	7,5
Fructosa	0,15	1,5	3,0	4,5	6,0	7,5

Fuente. Esta investigación

#### 3.6.2. Precisión

La repetibilidad instrumental se estudió preparando y analizando una muestra de forma consecutiva 10 veces. La repetibilidad del método se evaluó preparando tres muestras, las cuales se analizaron independientemente desde la preparación de la muestra hasta el análisis de los resultados, por el mismo instrumento y analista. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el cálculo del coeficiente de variación de los resultados obtenidos. La precisión intermedia se evaluó preparando una muestra por triplicado durante tres días diferentes, con dos analista y el mismo instrumento, mediante el cálculo del coeficiente de variación de las respuestas obtenidas se estimó el valor de la precisión intermedia.

#### 3.6.3. Exactitud

Mediante el método de adición de patrón estándar, se evaluó la exactitud en todo el rango de concentraciones, haciendo 9 determinaciones sobre 3 niveles de concentración comprendidas entre los puntos bajo, medio y alto del rango de concentraciones. Los resultados se expresaron en porcentaje de recuperación con respecto a la cantidad conocida de estándar añadido sobre la muestra o como diferencia entre la media obtenida y el valor aceptado como verdadero junto a los intervalos de confianza.

Experimentalmente, 4 muestras de tallos de arroz fueron extraídas y su volumen se dividió en cuatro alícuotas de 230  $\mu\text{L}$ , a tres de ellas se les adicionó una solución estándar de concentración conocida y junto con la cuarta se llevaron a un volumen final de 330  $\mu\text{L}$  con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5Mm, con el fin de determinar la cantidad de estándar añadido.

#### 3.6.4. Sensibilidad

Para determinar el límite de detección y cuantificación se creó una curva para cada azúcar con un punto máximo de concentración equivalente al punto mínimo de la curva de calibración del método de extracción y un rango de concentraciones menor a dicho punto.

### 3.7. Calculo de variables morfológicas

Para correlacionar características metabólicas, morfológicas y parámetros fisiológicos se calcularon otras variables utilizando las mediciones realizadas en plantas durante el ensayo.

La dimensión de las hojas se obtiene multiplicando el largo por el ancho y un factor de que permite tener en cuenta la forma de la hoja equivalente a 0.725.

La biomasa vegetativa corresponde a la suma de biomasa de hojas y tallos. La biomasa total corresponde a la suma de biomasa de hojas, tallos y panículas.

El índice de cosecha divide el peso de granos sobre el peso total de la planta, así indica el porcentaje de biomasa total que contribuye al rendimiento en el grano final.

Los componentes de rendimiento se calculan de la siguiente forma:

-Tallos efectivos: número de panículas / número de tallos

-Número de granos por panículas: Número de granos totales/ Número de panículas

-Masa de 1000 granos: (Masa de granos llenos/ número de granos llenos)\*100

-Fertilidad de la planta: número de granos llenos/ número de granos vanos.

Los grados días es una medida que relaciona la temperatura máxima y mínima por día.

El conteo diario de grados día = [(Temperatura Max. °F + Temperatura Min. °F) / 2] - 50°F.

Los grados día para cada día se suman para obtener el total de grados día durante cierto periodo de tiempo.

### 3.8. Análisis estadístico

El análisis de comparación de métodos se hizo utilizando el programa estadístico R (versión 3.0.2).

Los cálculos de la validación de la metodología de cuantificación de azúcares solubles se hicieron utilizando el programa Excel 2007, usando ANOVA, test de Cochran a un nivel de confianza del 95%, y cálculo del coeficiente de variación de las diferentes curvas de calibración.

El análisis de mediciones fisiológicas y metabólicas se llevó a cabo empleando el programa estadístico R (3.0.2). Usando la función ANOVA para análisis de varianza a un nivel de confianza del 95%, y la función de Pearson para los estudios de correlación entre variables. La comparación entre variedades se realizó a través del test de Tuckey con un nivel de confianza del 99%. Los gráficos de barras se hicieron utilizando el programa Sigma Plot (10).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSION

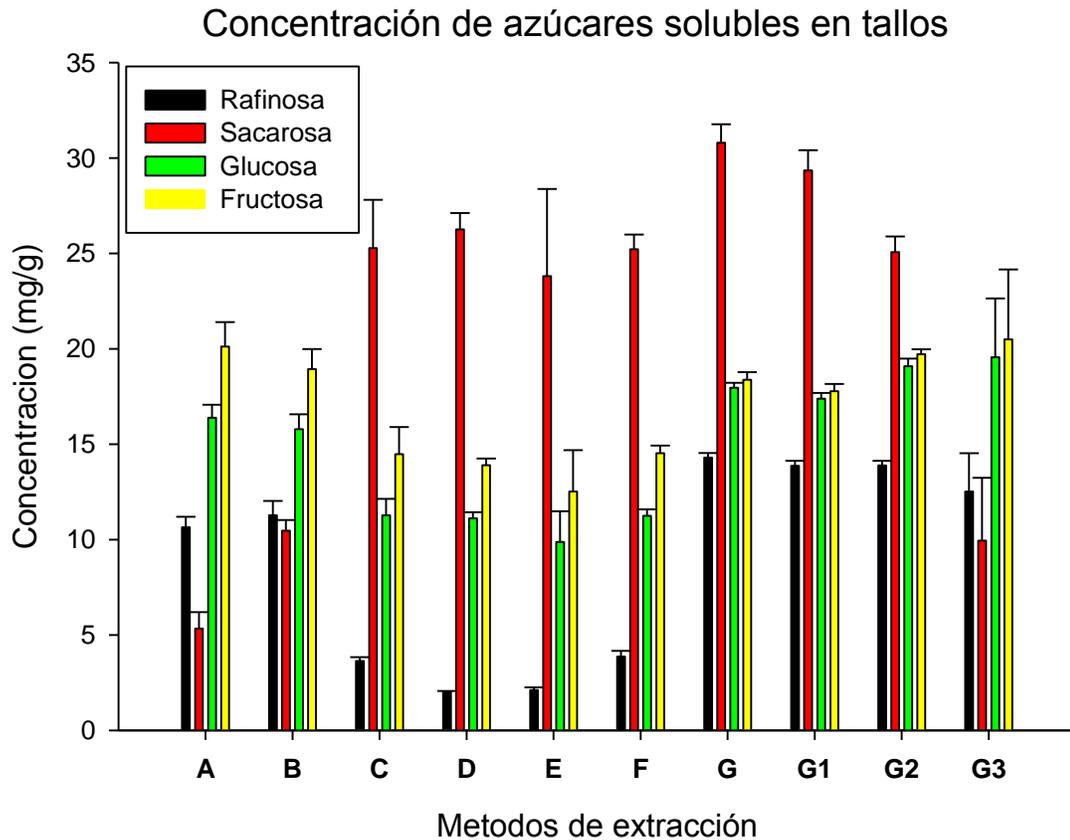
### 4.1. Implementación del método de extracción de azúcares solubles

Al evaluar los diferentes métodos de extracción (Grafica 1), se observa que el uso de agua (G, G1, G2, G3) como disolvente extrae una mayor cantidad de azúcares, esto se debe a que ellos poseen una polaridad alta al igual que el agua, favoreciendo las interacciones intermoleculares entre ellos y generando que los azúcares sean totalmente solubles en agua. A su vez esta solubilidad se ve favorecida por la temperatura, como se observa en el caso de la sacarosa y levemente en rafinosa, donde la solubilidad incrementa en el orden de  $G > G1 > G2 > G3$  debido al aumento de energía cinética provocada por el incremento en la temperatura. Sin embargo, en glucosa y fructosa no hay una variación significativa al incrementar la temperatura. Esto es debido a que la solubilidad de los monosacáridos es mayor en comparación a los di o trisacáridos debido al menor impedimento estérico presentado por estas moléculas, en consecuencia los monosacáridos presentes en la muestra se solubilizaran totalmente e independientemente de la temperatura. Aunque los métodos con agua logran extraer mayor concentración de azúcares el tiempo de extracción y secado es mayor en comparación a los métodos con etanol.

Los azúcares son más solubles en agua que en etanol debido a la mayor polaridad del agua, la cual es representada por un mayor momento dipolar (1.85D) en comparación con el etanol (1.69D). Por tanto, el agua facilita las interacciones intermoleculares de puentes de hidrogeno. Aunque las extracciones con agua presentan cantidades de azúcares mayores en comparación con los métodos que utilizan etanol, también se observa una mayor variación de la concentración dentro de las réplicas de un mismo método haciendo que este sea poco reproducible.

En los métodos A y B se utilizó ácido sulfúrico 5mM (fase móvil) como disolvente de extracción, observándose que las concentración de rafinosa, glucosa y fructosa son similares a las obtenidas en los métodos donde se utiliza agua como disolvente. Sin embargo, la concentración de sacarosa es menor debido a que los azúcares en soluciones acidas y bajo agitación constante promueven la hidrolisis de la sacarosa, disminuyendo la concentración real de este disacárido y alterando la glucosa y fructosa (grafica 1). En consecuencia, este método no permite determinar la concentración real los azúcares en la reserva del tallo porque están afectados por una reacción durante el proceso de extracción.

Grafica 1. Concentración de azúcares solubles para cada método de extracción



Fuente. Esta investigación

Comparando los métodos C, D, E, y F donde se usa etanol al 80% como disolvente, se observa que no hay diferencias significativas entre las concentraciones reportadas por cada método. Sin embargo, el método E posee mayor variación entre repeticiones. Los métodos C y F consistían en no realizar lavados y variar el tiempo de extracción de 30 a 60 min respectivamente. Estadísticamente no se observó una diferencia significativa en los azúcares extraídos (anexo 3), pero el método C presenta mayor variación en los resultados.

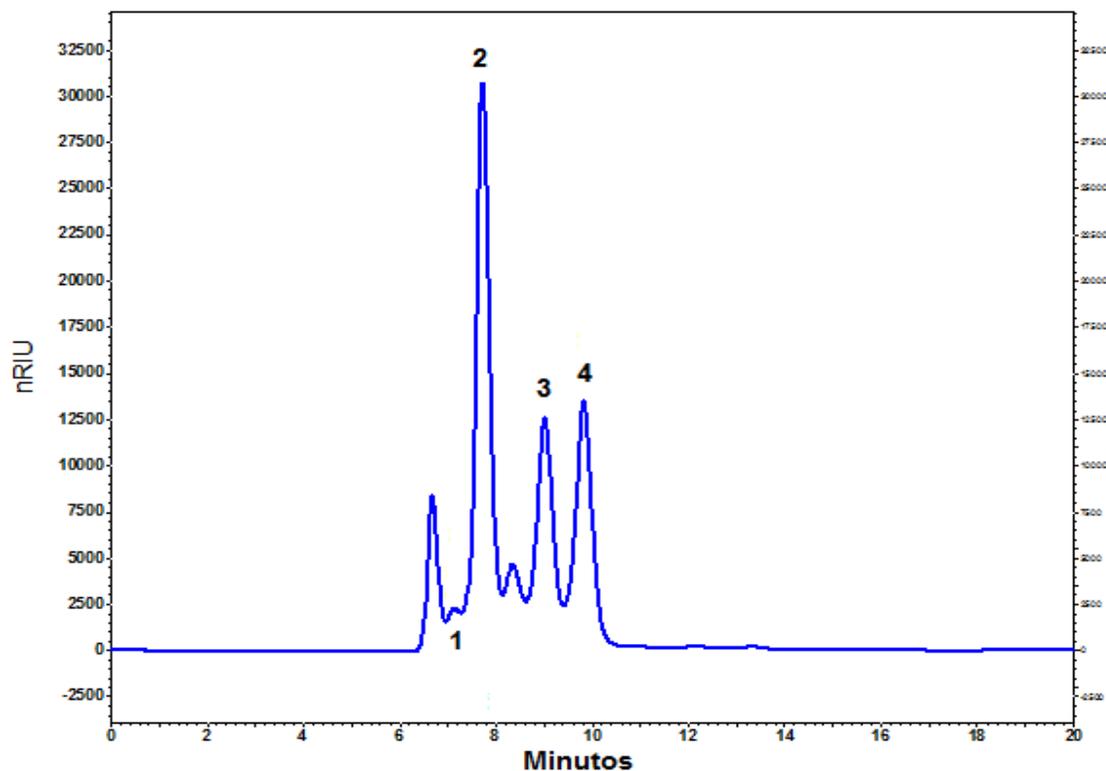
Finalmente, el método D donde se realiza una extracción con etanol 80% durante 30 min y un lavado con etanol 50% logró extraer cantidades similares de azúcares con una desviación estándar menor en comparación con los otros métodos donde se utilizó etanol (grafica 1). Por tanto, este método fue seleccionado para llevar a cabo las extracciones de azúcares solubles, además este método permite disminuir el tiempo de análisis y los costos, los cuales son factores de gran importancia al momento de trabajar con una gran cantidad de muestras.

El método escogido consistió en tomar 50 mg de muestra seca, los cuales se disolvieron en 1.0 mL de etanol al 80%. Se aplicó vortex durante 30 segundos y se llevó a baño térmico a 80 °C durante 30 min, luego se centrifugó a 10000 rpm por 10 min, y se recogió el sobrenadante. Al precipitado se le adicionó 0.75 mL de etanol al 50 %, se aplicó vortex y se centrifugó nuevamente, posteriormente se recogió el sobrenadante y se reunió con el anterior, los cuales se secaron en concentrador al vacío durante 5 horas a 45 °C.

Finalmente la muestra se diluye en 1 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM, y se filtró a través de un filtro de membrana 0,22 µm, para ser analizada por un HPLC Agilent 1200, equipado con un detector de índice de refracción utilizando como fase móvil H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mM. Se inyectó 15 µL de la muestra, la cual fue separada a través de una columna Biorad Aminex HPX 87H, a un flujo isocrático de 0.6 mL/min, con una temperatura de 35°C. La cuantificación de azúcares solubles fue realizada a través de una curva de calibración externa (Sección 2.5.1).

La separación de azúcares solubles por HPLC se lleva a cabo a través de una columna de intercambio iónico que realiza la separación según el peso molecular. Así, las moléculas de mayor tamaño poco interaccionan con la fase estacionaria, por lo cual son las primeras en ser eluidas. En consecuencia, el orden de elución corresponde a rafinosa (trisacárido), sacarosa (disacárido), glucosa y fructosa (monosacáridos de 6 y 5 carbonos respectivamente) como se observa en la Figura 5 y tabla 5.

Figura 5. Cromatograma de azúcares solubles (rafinosa, sacarosa, glucosa y fructosa).



Fuente. Esta investigación

Tabla 5. Tiempo de retención característico para cada azúcar

Número	Estándar	Tiempo de Retención (min)
1	Rafinosa	7,2
2	Sacarosa	7,6
3	Glucosa	8,9
4	Fructosa	9,7

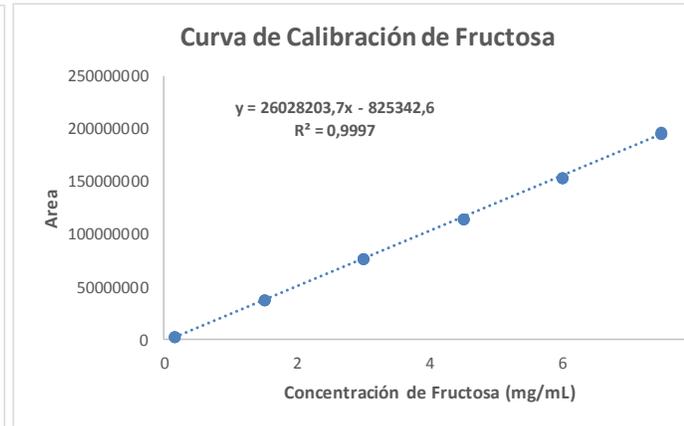
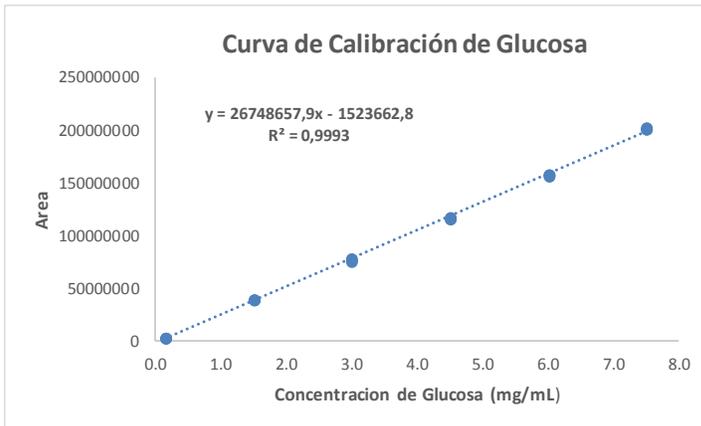
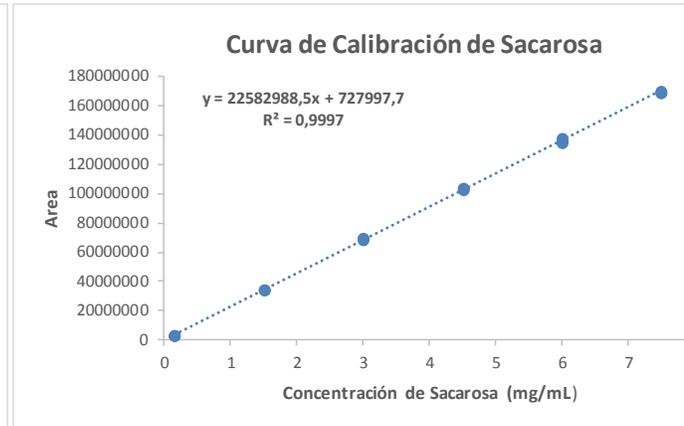
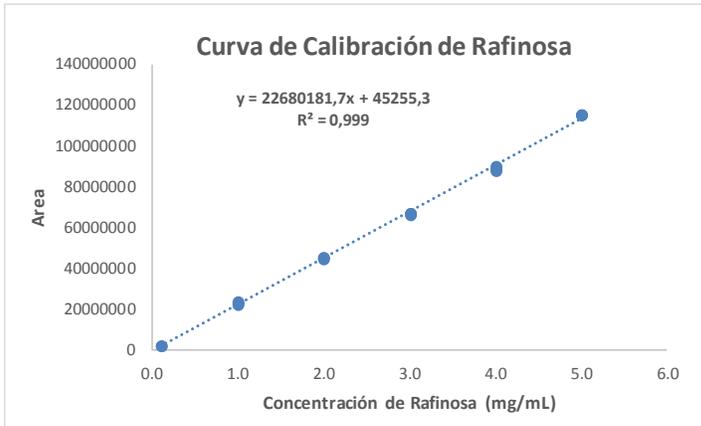
Fuente. Esta investigación.

## 4.2 Validación de la metodología para determinar azúcares solubles por HPLC

### 4.2.1 Linealidad

La linealidad fue evaluada a través de curvas de calibración para cada azúcar (gráfica 2), las cuales relacionan el área bajo la curva en función de la concentración. Cada curva de regresión fue ajustada por mínimos cuadrados, obteniendo el valor de la pendiente e intercepto (tabla 6). El coeficiente de correlación ( $r$ ) superior a 0.999 y coeficiente de determinación ( $r^2$ ) superior a 0.998 para cada estándar, como establece el criterio de aceptación, indica que el coeficiente de correlación de la regresión lineal debe encontrarse entre 0.98 y 1.00, y el coeficiente de correlación al cuadrado debe ser mayor de 0.995 (anexo 4A).

Grafica 2. Curva de calibración de estándares de azúcares solubles



Fuente. Esta investigación

Tabla 6. Parámetros de regresión ajustada por mínimos cuadrados

Estándar	Pendiente	Intercepto	r	r <sup>2</sup>
Rafinosa	22680181,7	45255,3037	0,9994	0,9987
Sacarosa	22582988,5	727997,743	0,9999	0,9997
Glucosa	26748657,9	-1523662,83	0,9996	0,9992
Fructosa	26028203,7	-825342,656	0,9999	0,9997

Fuente. Esta investigación

Al aplicar el análisis de varianza a los datos de cada curva y utilizando como hipótesis nula ( $H_0$ ): “el cuadrado medio de la regresión ( $SC_{reg}$ ) es igual que el cuadrado medio residual ( $SC_{res}$ ), ( $H_0: SC_{reg}=SC_{res}$ ,  $H_a: SC_{reg} > SC_{res}$ ) Se obtuvo un valor de  $F_{calculado}$  para cada curva y se comparó con el  $F_{crítico}$  ( $P = 0.05$ ), resultando en el rechazo de la hipótesis nula, ya que  $SC_{reg} > SC_{res}$  (tabla 7), a un nivel de probabilidad del 5 %, lo que significa que existe una correlación muy significativa entre X e Y.

Tabla 7. Parámetros del análisis de varianza (ANOVA).

Estándar	F1 <sub>calculado</sub>	F2 <sub>calculado</sub>	F1 <sub>teórico</sub>	F2 <sub>teórico</sub>
Rafinosa	244822,315	0,0007436	4,75	3,26
Sacarosa	561059,238	0,0012239		
Glucosa	750853,427	0,0014157		
Fructosa	720491,936	0,001387		

Fuente. Esta investigación

La regresión para cada curva de calibración fue estadísticamente representativa, debido a que los valores de F1 fueron mayores que los valores de  $F1_{teórico}$ , y la linealidad fue óptima ya que F2 fue menor que  $F2_{teórico}$ .

Por medio del test de proporcionalidad se verificó que la recta pasa por el origen debido a que la variable independiente es significativamente diferente de cero adoptando como hipótesis nula: “no existe diferencia significativa entre el

intercepto y cero”, obteniéndose que para cada estándar el Texp fue menor que el Tteórico (tabla 8).

Tabla 8. Valores de T para cada curva de calibración

Estándar	Texp	Tteórico (gl=16, P=0.05)
Rafinosa	0,08	2,12
Sacarosa	1,74	
Glucosa	1,85	
Fructosa	1,63	

Fuente. Esta investigación

#### 4.2.2 Precisión

##### 4.2.2.1. Repetibilidad del método

El coeficiente de variación (CV) de seis muestras de tallos para determinar la repetibilidad del método fue menor al 4 %. La tabla 9 muestra el promedio de la concentración de cada azúcar y el coeficiente de variación (anexo 4B). Por consiguiente la repetibilidad del método es adecuada, encontrándose en un intervalo de aceptación de 90-110 %<sup>70</sup>.

Tabla 9. Parámetros estadísticos para evaluar la repetibilidad del método

Azúcar	Promedio (mg/g)	CV (%)
Rafinosa	6,27	2,33
Sacarosa	67,22	3,78
Glucosa	31,37	2,58
Fructosa	31,37	2,58

Fuente. Esta investigación

##### 4.2.2.2. Repetibilidad instrumental

La misma muestra de tallos se analizó seis veces para determinar la variación en la concentración.

<sup>70</sup> Asociación Española de farmacéuticos de la industria (AEFI), Op. Cit., p.70-71

El promedio y el coeficiente de variación de cada azúcar se muestran en la tabla 10 (anexo 4C), el cual es inferior al 1%. Por tanto, se encuentra en el rango de aceptación el cual establece que el CV debe ser inferior al 2 %. Además, el valor del coeficiente de variación para la repetibilidad instrumental es inferior al valor que se acepta para el coeficiente de variación del método<sup>71</sup>.

Tabla 10. Parámetros estadísticos para evaluar la repetibilidad instrumental.

Azúcar	Promedio (mg/g)	CV (%)
Rafinosa	6,06	0,75
Sacarosa	66,04	0,13
Glucosa	28,04	0,55
Fructosa	31,223	0,78

Fuente. Esta investigación

#### 4.2.2.3. Precisión intermedia

La precisión intermedia del método fue evaluada determinando la concentración de azúcares solubles de una misma muestra en diferentes días, por analistas diferentes. El cálculo del coeficiente de variación global para cada azúcar en tallos es inferior al 4% como se observa en la tabla 11 (anexo 4D). Por tanto, se cumple con el requisito establecido, ya que solo se aceptan valores de coeficiente de variación inferiores al doble de la repetibilidad del método<sup>72</sup> (AEFI 2001).

---

<sup>71</sup> *Ibid.*, p.70.

<sup>72</sup> *Ibid.*, p. 74

Tabla 11. Evaluación de la precisión intermedia

Detalle		rafinosa				sacarosa				glucosa				fructosa						
Día	Analista	Promedio	CV (%)	CV (%)	CV (%)	Promedio	CV (%)	CV (%)	CV (%)	Promedio	CV (%)	CV (%)	CV (%)	Promedio	CV (%)	CV (%)	CV (%)			
Día 1	A	5.98	3.79	2.74	3.34	67.31	2.75	2.44	2.61	27.91	2.14	1.79	2.07	30.99	2.22	1.92	2.09			
	B	5.85	0.33			65.87	1.93			27.65	1.68			30.68	1.89					
Día 2	A	6.37	0.52	3.39		1.06	68.83	0.78		2.61	0.73	28.42		0.36	2.07	0.45		31.55	0.39	2.09
	B	6.00	0.93				67.70	0.34				28.33		1.07				31.54	0.58	
Día 3	A	6.17	2.40	2.62		2.97	65.61	4.34		2.61	2.83	28.03		4.15	2.07	2.77		31.20	3.97	2.09
	B	5.96	1.48				66.32	1.59				28.34		1.40				31.49	1.72	

Fuente. Esta investigación

#### 4.2.3. Exactitud.

La prueba de exactitud para cada azúcar es correcta ya que cumple con el criterio de aceptación el cual establece que  $t_{exp} < t_{tablas}$ . Por lo tanto no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100 (tabla 12) (anexo 4E).

Tabla 12. Parámetros de evaluación para la prueba de exactitud

	Rafinosa	Sacarosa	Glucosa	Fructosa
% Recuperación	101.46	97.92	104.57	101.05
DE	2.45	3.34	4.36	1.10
%CV	2.42	3.42	4.17	1.09
$t_{exp}$	1.04	1.05	1.90	1.67
$t_{tablas}(\alpha=0.005, gl=2)$	4.30			

Fuente. Esta investigación

#### 4.2.4. Límite de detección y cuantificación

La cantidad mínima de analito detectada por cada azúcar con un  $k=3$ , y la cantidad mínima de cada azúcar que se puede cuantificar con exactitud aceptable con un  $k=10$  se muestra en la tabla 13 (Anexo 4F).

Tabla 13. Límite de detección y cuantificación de cada azúcar soluble

<b>Azúcar</b>	<b>Límite de detección</b>		<b>Límite de cuantificación</b>	
	mg/mL	mg/mg	mg/mL	mg/g
Rafinosa	0,003	0,07	0,005	0,10
Sacarosa	0,018	0,35	0,019	0,38
Glucosa	0,003	0,07	0,005	0,10
Fructosa	0,001	0,01	0,002	0,03

Fuente. Esta investigación.

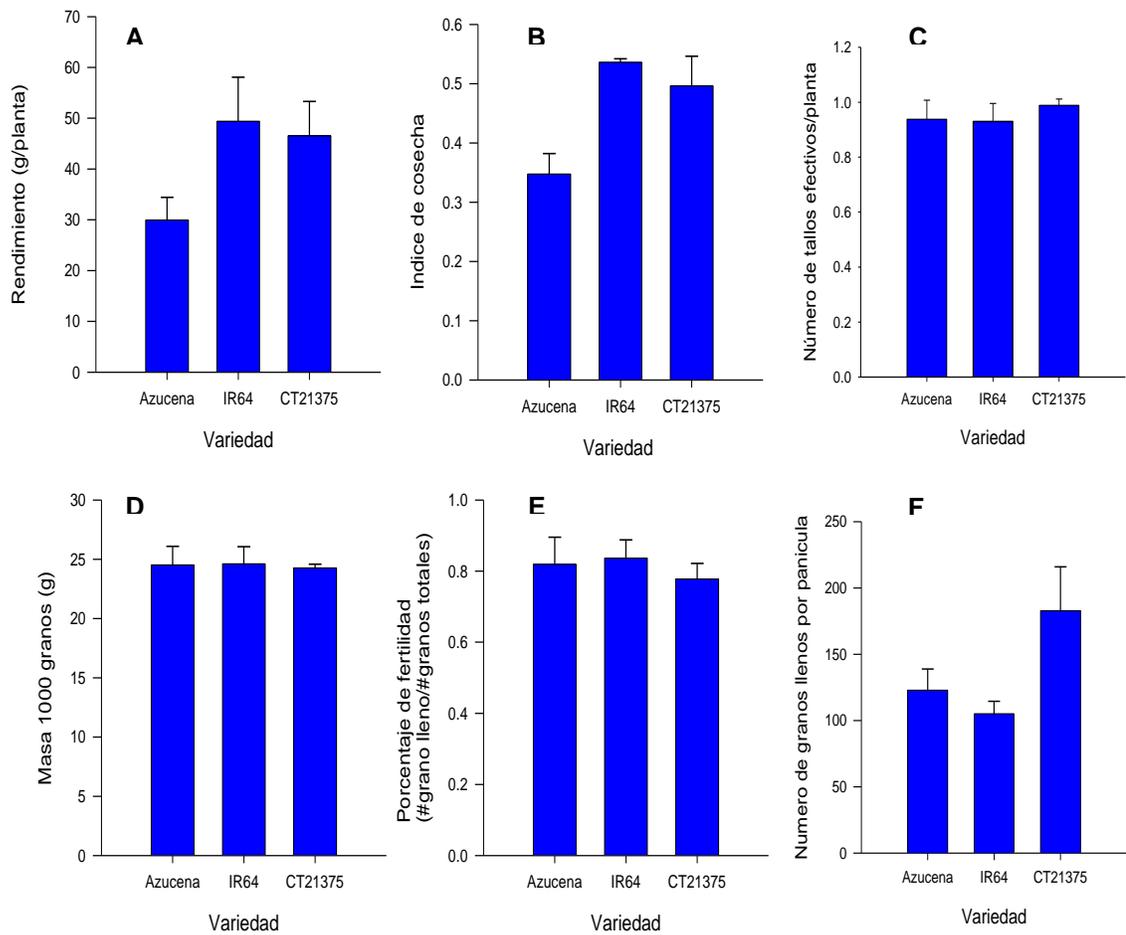
### 4.3. Comparación del rendimiento y sus componentes

Al evaluar el rendimiento en grano, las variedades IR64 y CT21375 presentan un mayor rendimiento expresado en masa de grano lleno por planta (grafica 3A), y mayor índice de cosecha (masa grano lleno/biomasa total) (grafica 3B), en comparación con Azucena. Por el contrario, no hay diferencia significativa ( $P < 0.001$ ) entre las variedades para las otras componentes de rendimiento como número de tallos efectivos, masa de 1000 granos y fertilidad entre las tres variedades de estudio (grafica 3; C, D, E). En número de granos por panícula CT21375 presento valores mayores, sin embargo no obtiene mayores rendimientos que IR64 ya que tiene menos panículas (grafica 5C). De este modo las variedades IR64 y CT21375 presentan características morfológicas diferentes. CT21375 tiene órganos reproductivos y vegetativos más grandes que IR64 pero esta última tiene un mayor número de órganos. Por lo tanto, existen combinaciones de diferentes características morfológicas que están relacionadas con un buen rendimiento en grano de arroz en estas dos variedades.

Existen diferencias en la arquitectura de la panícula para cada variedad. IR64 muestra panículas más cortas en comparación con las otras variedades analizadas (25 cm de longitud) (figura 6A) por su parte CT21375 tiene panículas más grandes y ramificadas (29 cm de longitud) (figura 6B). Azucena aunque tiene panículas de similar longitud a CT21375, y no presenta ramificaciones secundarias y terciarias (figura 6C). Una arquitectura de panícula con mayor número de ramificaciones y con mayor longitud permite a la planta tener mayor número de granos por panícula.

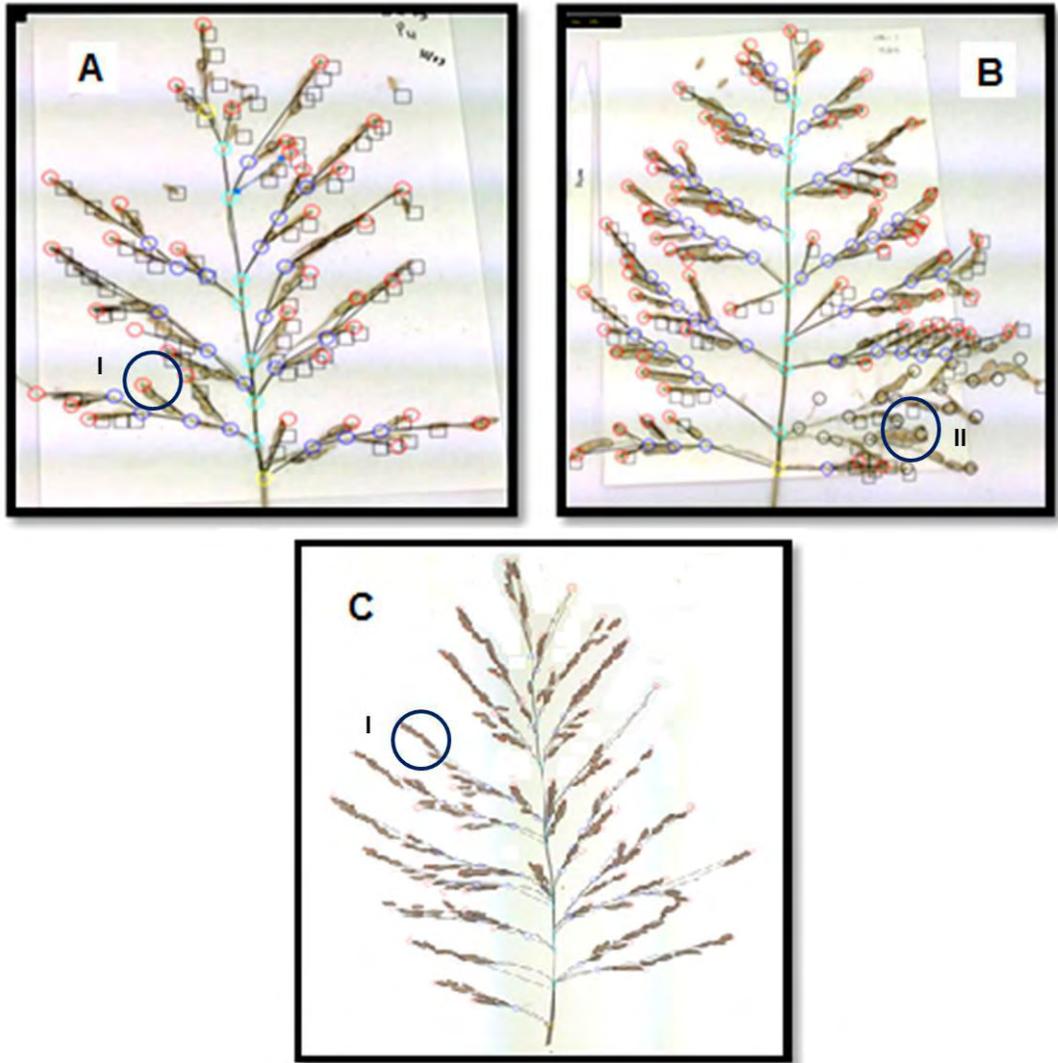
Por lo tanto CT21375 y IR64 tienen en total mayor número de granos por planta y mayor masa de granos por planta, explicando los mejores rendimientos observados para estas dos variedades. (Grafica 3F).

Grafica 3. Rendimiento estimado y componentes que lo determinan. A: rendimiento. B: índice de cosecha. C: número de tallos efectivos. D: masa 1000 granos. E: porcentaje de fertilidad. F: número de granos llenos por panícula.



Fuente. Esta investigación.

Figura 6. Panículas de arroz *Oryza Sativa* L. A: IR64 (I, ramificaciones primarias)  
B: CT21375, (II, Ramificaciones secundarias) C: Azucena (I, ramificaciones primarias)



Fuente. Esta investigación.

#### 4.4. Mediciones morfológicas

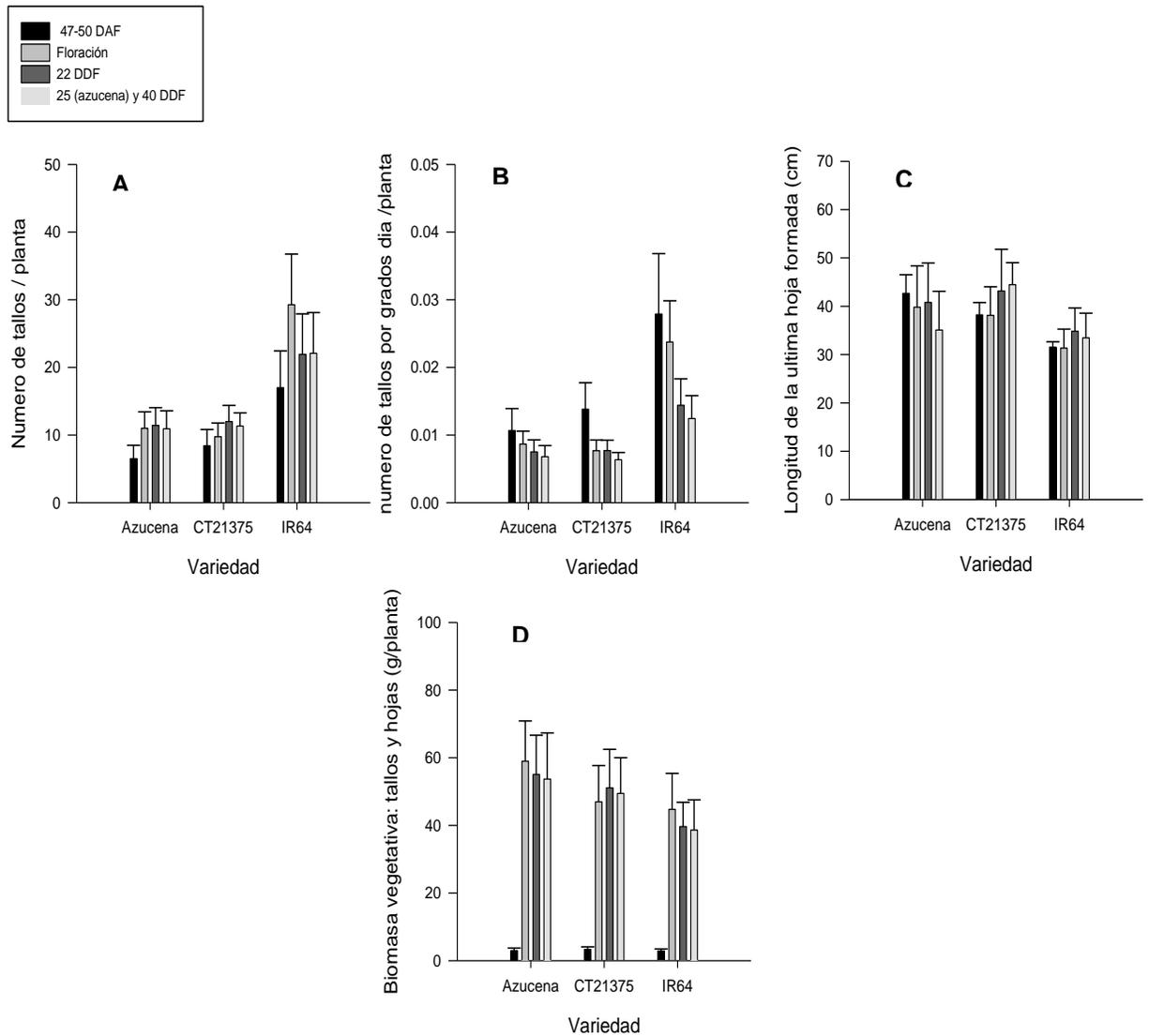
Se evaluaron las variedades en los muestreos; 47-50 días antes de floración (DAF), floración, 22 días después de floración (DDF) y 25 DDF para el caso de azucena o 40 DDF para IR64 y CT21375.

Diferencia entre variedades a 47-50 días después de floración (DAF).

A 47-50 días antes de floración, la variedad IR64 tiene significativamente mayor número de tallos, relacionada a una mayor tasa de emisión de tallos (tallos por grados días), (grafica 4A y grafica 4B), pero posee hojas más pequeñas en comparación con CT21375 y Azucena (grafica 4C). Sin embargo, la biomasa en esta fase para las tres variedades no es significativamente diferente (grafica 4D).

Se validó lo mencionado anteriormente a través de la publicación de Rebolledo et al 2012, donde se demuestra que IR64 y Azucena tienen una misma biomasa total en fase vegetativa. Sin embargo, IR64 la obtiene debido a un gran número de tallos y Azucena a través de órganos más grandes, en este caso hojas. CT21375, en este caso acumularía más biomasa gracias a órganos más grandes, una estrategia similar a la de azucena pero con más tallos que azucena (grafica 4B).

Grafica 4. A: número de tallos por planta. B: número de tallos por grado día por planta. C: longitud de la última hoja formada. D: biomasa vegetativa.



Fuente. Esta investigación

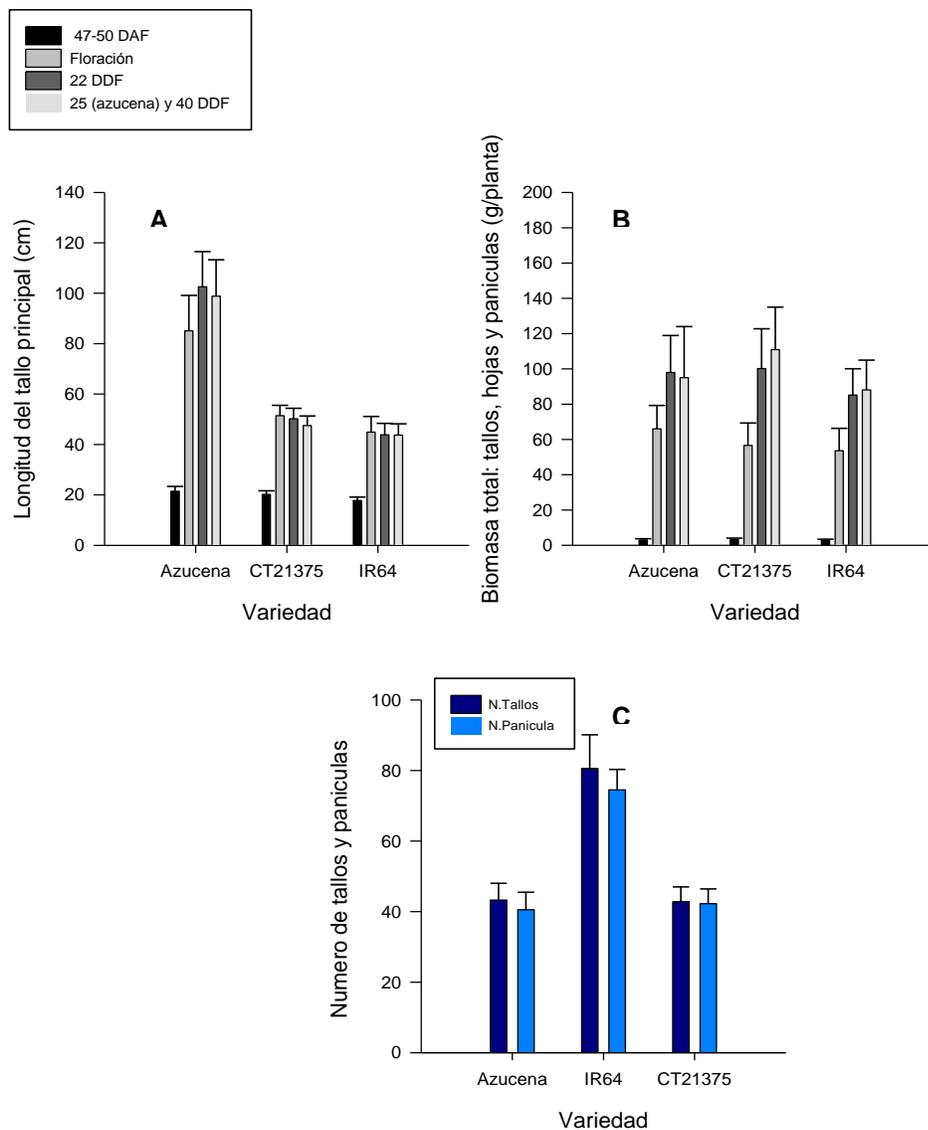
B. Diferencia entre variedades en floración.

En esta etapa no existe una diferencia significativa en biomasa total para las tres variedades (grafica 5B). Sin embargo, la biomasa de cada órgano es diferente entre las variedades, Azucena tiene una mayor biomasa vegetativa (grafica 4D), favorecida por una mayor longitud de tallos y de hojas (grafica 4A y grafica 4C).

IR64 aunque no posee tallos grandes, tiene un mayor número de tallos y panículas (grafica 5C). Finalmente, CT21375 se encuentra en un punto intermedio entre las dos variedades contrastadas, puesto que tiene hojas grandes similares a Azucena, un mayor número de tallos en comparación con Azucena pero menor que IR64 y la longitud de tallo es similar a IR64. Por lo tanto, esta variedad presenta características morfológicas de IR64 y Azucena.

En conclusión, a pesar de no existir diferencia entre variedades para la biomasa total, las características morfológicas que la componen (longitud de tallo, masa de tallo y número de tallo o panículas) si son diferentes entre las variedades. De este modo, resulta interesante como éstas características están asociadas a la acumulación de carbohidratos en floración, ya que puede explicar porque la biomasa se repartió de una forma diferente en cada tipo de órgano para cada variedad.

Grafica 5. A: longitud del tallo principal. B: biomasa total: tallos, hojas panículas. C: número de tallos y numero de panículas

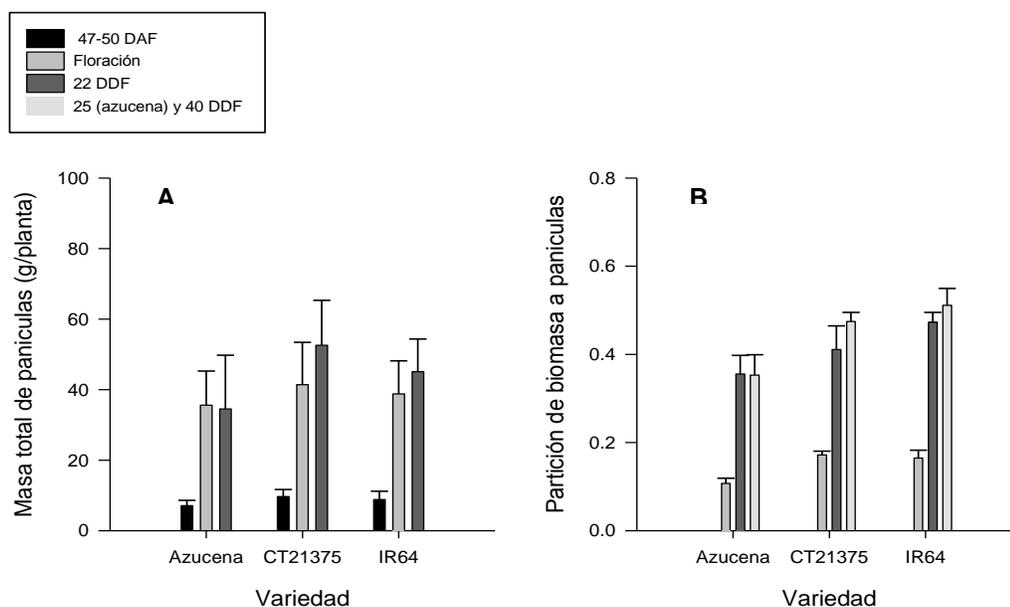


Fuente. Esta investigación

A. Diferencia entre variedades 22 días después de floración (DDF)

Las diferencias encontradas entre las variedades siguen siendo igual en esta etapa a las observadas a 47-50 días antes de floración y en floración. Aunque CT21375 tiene un menor número de panículas en comparación con IR64, las panículas de CT21375 son más grandes y más ramificadas. Por lo tanto, CT21375 tiene mayor masa de panículas por planta (grafica 6A) favorecida al igual que IR64 por la distribución de la masa total hacia panículas (grafica 6B).

Grafica 6. A: Masa total de panículas (g/planta), B: partición de biomasa a panículas.



Fuente. Esta investigación

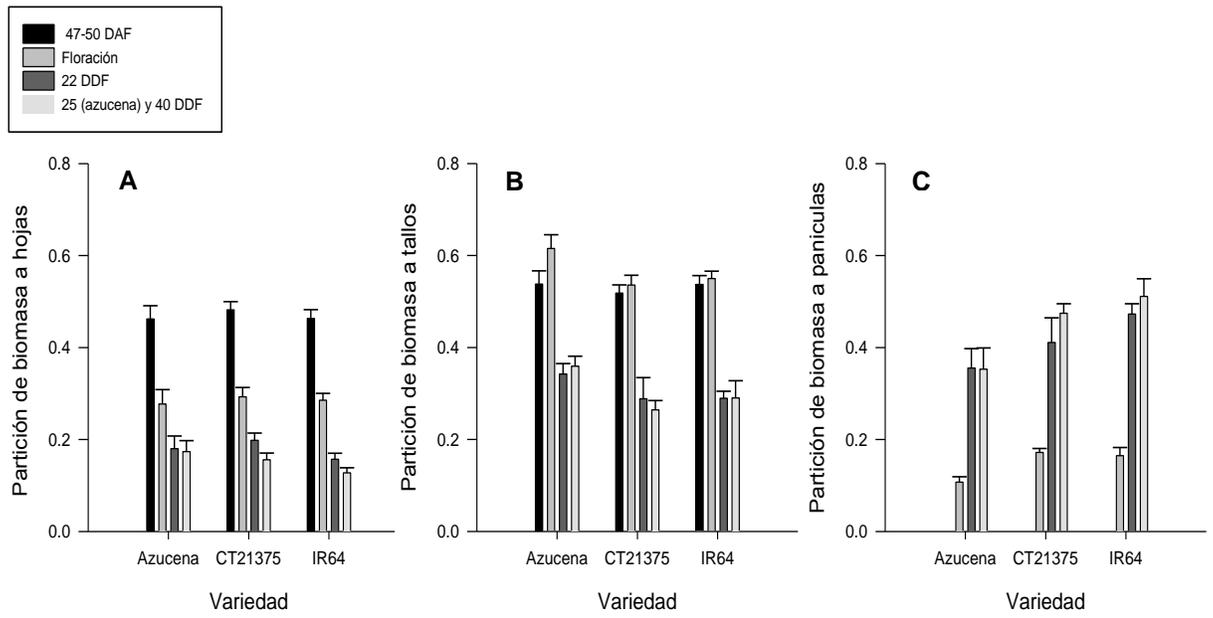
#### A. Diferencia entre variedades en la traslocación a diferentes órganos

La partición o distribución de la biomasa hacia hojas es mayor a 47-50 DAF para todas las variedades, no se observa una diferencia significativa entre ellas (grafica 7A). En esta misma fase (47-50DAF) la distribución de la biomasa hacia tallos no es significativamente diferente entre las variedades (grafica 7B). Esto demuestra que la partición de biomasa hacia hojas y tallos para las tres variedades en fase vegetativa no es significativamente diferente. Se puede entonces suponer que los asimilados producidos vía la fotosíntesis son repartidos de la misma forma en las 3 variedades.

Sin embargo, a partir de floración y los siguientes muestreos las tres variedades presentan una importante disminución de partición de biomasa hacia hojas. Por el contrario, existe un incremento de la partición de biomasa hacia panículas en todas las variedades justo después de floración (grafica 7C), lo cual es concordante ya que en la etapa vegetativa la planta desarrolla su máximo macollamiento y emergencia de hojas mientras que en la fase reproductiva y de maduración se favorece la emergencia de panículas y el llenado de grano. Analizando la partición de biomasa a panículas para cada variedad, se encuentra que IR64 y CT21375 muestran mayor partición desde floración hasta 40 DDF (grafica 7C), siendo esta otra característica de las variedades con mayor rendimiento. Analizando los carbohidratos no estructurales se quiere ver si la partición de biomasa a los diferentes órganos descrita anteriormente está

relacionada a una concentración de carbohidratos en tallos en las diferentes fases de desarrollo.

Grafica 7. A: Partición de biomasa a hojas. B: partición de biomasa a tallos. C: partición de biomasa a panículas.



Fuente. Esta investigación.

#### 4.5. Concentración de azúcares solubles y almidón

##### A. Diferencias a 47-50 DAF

La concentración de glucosa, fructosa, almidón y en tallos a 50 DAF es mayor para IR64, en comparación con CT21375 Y Azucena (grafica 8: B, D, F), por el contrario la concentración de rafinosa es mayor para Azucena y CT21375 (grafica 8D). Por lo tanto, IR64 tiene mayor acumulación carbohidratos no estructurales totales en esta etapa (grafica 8G), gracias a una mayor concentración de glucosa, fructosa y almidón antes de floración.

La concentración de almidón en tallos antes de floración no supera los 20 mg/g siendo IR64 la variedad que presenta mayor cantidad de este en tallos (grafica 8F). Por lo tanto, a 50 DAF el metabolismo de las tres variedades favorece la formación de azúcares solubles y no la formación carbohidratos más estructurados como almidón.

##### B. Diferencias en floración

CT21735 tiene mayor concentración de glucosa, fructosa que Azucena y IR64, además la relación hexosa/sacarosa es mayor, lo anterior indica que CT21735 tiene mayor capacidad para acumular azúcares solubles en tallos en floración (grafica 8: A, B, D, F). IR64 y CT21735 tienen mayores concentraciones de almidón en tallo en floración (grafica 8F). Por lo tanto, en floración las variedades con mejor rendimiento tienen mayor concentración de hexosas, almidón y carbohidratos no estructurales totales. CT21735 (con órganos grandes) tiene tendencia a acumular hexosas en tallo, mientras que IR64 (con órganos pequeños pero en gran número) tiene tendencia a acumular únicamente almidón.

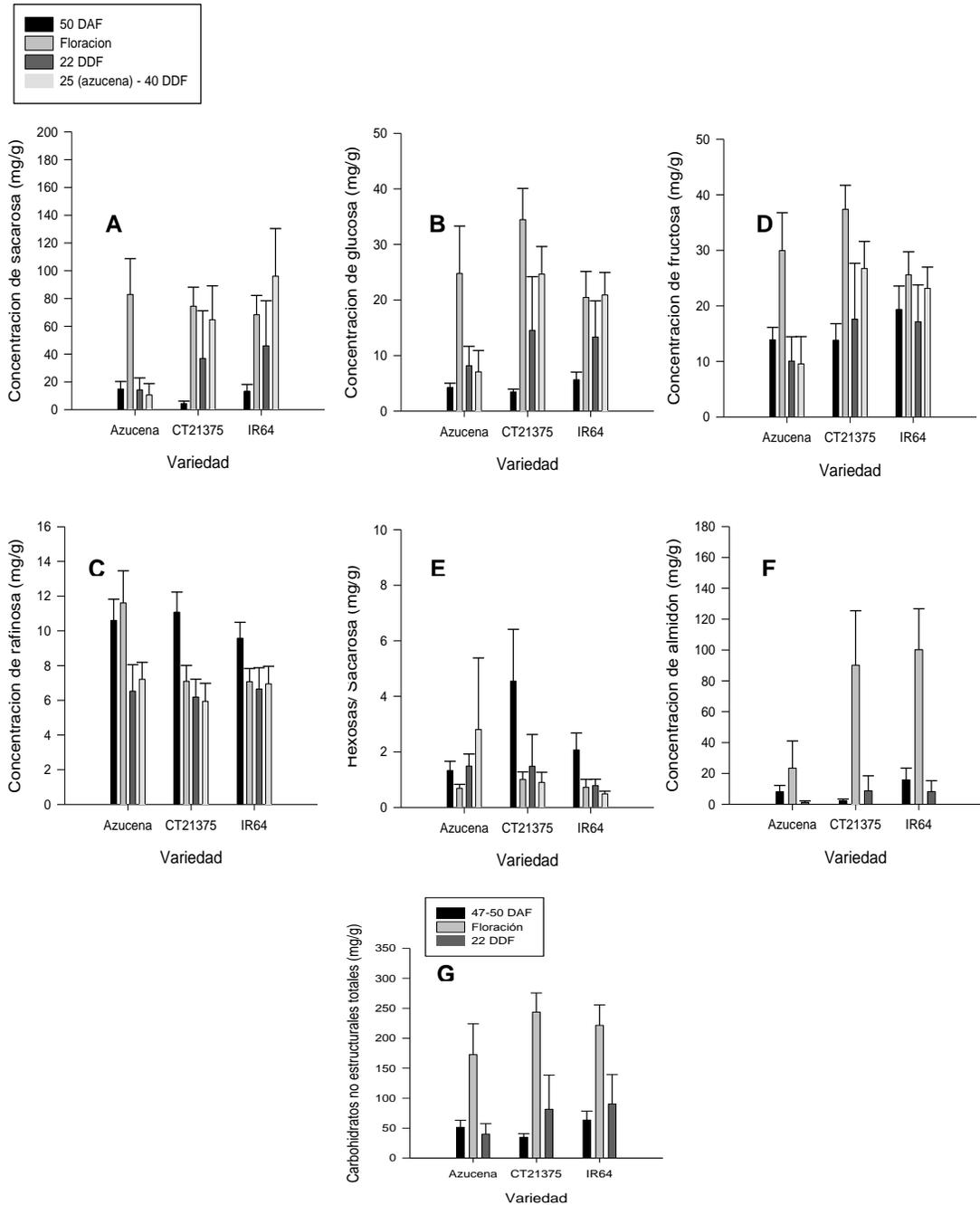
##### Diferencias a 22 DDF

Las variedades IR64 y CT21375 presentan mayor acumulación de almidón en floración y una mayor reducción de almidón a 22 DDF (grafica 8F) por el contrario estas variedades no presentan una variación significativa en la concentración de sacarosa entre floración y 22 DDF (grafica 8A). En cambio existe una leve disminución de hexosas a 22 DDF (grafica 8: B, D).

#### A. Diferencias en cosecha

La concentración de sacarosa solo incrementa significativamente en los tallos de IR64. Por otra parte, la concentración de hexosas (glucosa y fructosa) incrementa significativamente en IR64 y CT21735. En azucena, la concentración de hexosas y de sacarosa no cambia desde 22 DDF hasta cosecha. La relación de hexosas entre sacarosa muestra valores superiores en cosecha para azucena e inferiores para CT21375 e IR64. Por lo tanto, un aumento de azúcares solubles y una disminución del índice hexosas/sacarosa estarían relacionados con el mejor rendimiento observado en IR64 y CT21375.

Grafica 8. Concentración de carbohidratos no estructurales en tallos de arroz. A: sacarosa, B: glucosa, C: fructosa, D: rafinosa. E: hexosas/sacarosa, F: almidón, G: Carbohidratos no estructurales totales



Fuente. Esta investigación.

#### 4.6 Relación entre rendimiento y carbohidratos no estructurales

Las diferencias morfológicas en cuanto a la acumulación de biomasa, observadas en fase vegetativa (50DAF), estarían relacionadas con las diferencias en el contenido carbohidratos no estructurales, ya que las variedades donde se privilegió un tamaño grande de órganos, también se privilegió la acumulación de sacarosa en tallos.

En fase de floración las variedades con mejor rendimiento tienen mayor número de tallos y de panículas (IR64) o tallos más grandes y panículas más grandes y ramificadas (CT21735). Esto demuestra que la fuerza de los sumideros en estas dos variedades en floración es más grande que la fuerza de azucena (presentó pocos tallos, pocas panículas, y panículas menos ramificadas). Una mayor fuerza de los sumideros estaría asociada a una mayor acumulación de azúcares solubles en tallos en floración (CT21735) y una mayor acumulación de almidón (IR64 y CT21735). Esta hipótesis se puede confirmar con estudios donde se ha demostrado que las reservas de carbohidratos en floración están relacionadas con un incremento en el rendimiento potencial en variedades puras de arroz e híbridos, este aumento parece estar relacionado con una mayor translocación y un mayor tamaño del sumidero (número de granos por panícula)<sup>73 74</sup>.

A 22 DDF, la fuerza de los sumideros en las variedades con mejores rendimientos (IR64 y CT21735) fue mayor. Esto está asociado con una reducción del contenido de almidón en el tallo y de azúcares solubles. Además, se observó que en el periodo comprendido entre floración y 22DDF, la partición de biomasa de tallos hacia panículas era mayor para IR64 y CT31735. Por lo tanto, la mayor fuerza de los sumideros está asociada a una mayor translocación de biomasa, almidón y azúcares solubles, permitiendo un aumento en el peso de panícula (por lo tanto una ganancia en el peso de grano).

En cosecha, la partición de biomasa hacia panículas continúa siendo alta para IR64 y CT21735. Estas variedades tienen en esta fase una baja cantidad de almidón en tallos y un aumento de azúcares solubles. De ésta manera, durante esta fase sigue existiendo una translocación de biomasa de tallos hacia panículas, pero las concentraciones de almidón y azúcares solubles en tallos tienden a aumentar o seguir constantes.

---

<sup>73</sup> Fujita, Op. Cit., p. 3-4

<sup>74</sup> Katsura, Op. Cit., p. 4-7

## CONCLUSIONES

Al evaluar diferentes métodos de extracción se seleccionó el método de extracción con etanol 80%, calentando durante 30 min y realizando un lavado con etanol 50%, debido a que presenta menor varianza, mayor reproducibilidad y un mayor impacto costo beneficio.

Los parámetros de validación evaluados para la metodología de extracción de azúcares solubles, en tallos y hojas de arroz, confirman que la metodología escogida fue precisa, exacta, robusta y reproducible.

La concentración de glucosa, fructosa, almidón y en tallos a 50 DAF es mayor para IR64, en comparación con CT21375 Y Azucena, sin embargo la concentración de rafinosa es mayor para Azucena y CT21375. En consecuencia IR64 tiene mayor acumulación carbohidratos no estructurales totales en esta etapa gracias a una mayor concentración de glucosa, fructosa y almidón antes de floración.

La concentración de almidón en tallos antes de floración no supera los 20 mg/g siendo IR64 la variedad que presenta mayor cantidad de este en tallos. Por lo tanto, a 50 DAF el metabolismo de las tres variedades favorece la formación de azúcares solubles y no la formación carbohidratos más complejos como el almidón.

La variedad CT21735 presenta mayor concentración de glucosa, fructosa que Azucena e IR64, además la relación hexosa/sacarosa es mayor, lo anterior indica que CT21735 tiene mayor capacidad para acumular azúcares solubles en tallos en floración.

Las variedades IR64 y CT21735 con mejor rendimiento tienen mayor concentración de hexosas, almidón y carbohidratos no estructurales totales.

La variedad Azucena presentó menor acumulación de almidón en comparación con las variedades IR64 y CT21375 en la etapa de floración y menor rendimiento al tiempo de cosecha.

Las variedades con mejores rendimientos, también mostraron altas fuerzas de sumidero. Esta mayor fuerza de sumidero está asociada a mayor concentración de sacarosa en fase vegetativa y floración (en el caso de CT21375) y una mayor concentración de almidón en floración (en el caso de IR64 y CT21375).

Características como la reducción de almidón en cosecha, leve disminución de hexosas, concentración de sacarosa sin variación y la partición de biomasa hacia panículas, permite inferir que estos carbohidratos son utilizados para aumentar la biomasa de granos durante el llenado de grano hasta la cosecha.

La cuantificación de azúcares solubles y almidón permitió relacionar características metabólicas y fisiológicas para explicar los mejores rendimientos observados en dos variedades IR64 y CT21375 en condiciones potenciales de cultivo

## RECOMENDACIONES

Es necesario extender el análisis de carbohidratos no estructurales a otros órganos de la planta como hojas y panículas con el fin de determinar la dinámica de azúcares solubles durante estos muestreos y como está relacionada con la variación de carbohidratos en el tallo, esto permitiría conocer la interacción metabólica entre los diferentes órganos fuente y/o sumidero dentro de la planta.

Las mediciones de fotosíntesis se deberían hacer durante todo el ensayo ya que permiten evaluar la efectividad del sistema fotosintético en la planta y como contribuye esto a las reservas en los tallos.

Realizar un análisis de carbohidratos con marcación isotópica tipo carbono en hojas y tallos de arroz para las tres variedades evaluadas para monitorear específicamente el origen de estos carbohidratos y su distribución durante el ciclo de desarrollo de planta.

La medición de azúcares solubles y almidón en tallos de arroz tiene gran relevancia al momento de explicar variaciones en rendimiento. Sin embargo, los métodos de extracción son lentos e implican un alto costo, siendo esto una limitante para el programa de mejoramiento. Por tanto, se debería desarrollar otros métodos confiables de rápida medición como por ejemplo la realización de una curva de calibración de azúcares solubles y almidón por espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR), utilizando los valores de concentración obtenidos mediante cromatografía líquida de alta eficiencia.

## BIBLIOGRAFÍA

Acevedo, M.A; Castrillo, W.A; Belmonte, U. C. Origen, Evolución y Diversidad del Arroz. En: *Agronomía tropical* [base de datos en línea]. No. 56 (2). 2006.

Anne Clément Vidal. Metodología para análisis de almidón [correo electrónico]. Mensaje enviado a: Maria Camila Rebolledo. 11 de enero de 2013. [Consultado en 28 de octubre de 2013]. Comunicación personal.

Arai-Sanoh, Y. et al. Genotypic Variations in Non-Structural Carbohydrate and Cell-Wall Components of the Stem in Rice, Sorghum, and Sugar Vane. 2011. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 75, 6. p. 1104-1112.

Asociación Española de farmacéuticos de la industria (AEFI). Validación de métodos analíticos. Cataluña. 2001. p57-94

Alvarez, L. Producción de arroz en los llanos occidentales de Venezuela. Barinas, Unevellez. 1997. p246.

Arregoces, O; Rosero, M; González, J. 2005. Guía de estudio Morfología de la planta de arroz. Cali, CO, CIAT

Chang, T. Bardenas, E, The morphology and varietal characteristics of the rice plant. En : *Technical Bulletin* [en línea]. No.4. 1965.

Cock, James H. Yosiida, Shouichi. Accumulation of Carbohydrate Before Flowering and its Subsequent Redistribution and Respiration in the Rice Plant. 1972. *Proceeding of the Crop science Society of japan*. XXXXI, 2. p. 226-234.

Cock, J; Yoshida, S. 1973. Changing sink and source relations in rice (*Oryza sativa* L.). Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia, and International Rice Research Institute, Los Baños, Laguna, Philippines. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 19(3). P229-234.

De Datta, Surajit, K. Principles and practices of rice production. Canada. John Wiley and Sons, Inc. 1981. P146-152.

Dreccer, M, F. Van Herwaarden, Anthony F. Chapman, Scott C. Grain number and grain weight in wheat lines contrasting for stem water soluble carbohydrate concentration. 2009. Field Crops Research. 112, 1. p. 43-54.

Eurachem guide. The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 1998.

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Statistical Databases & Data-sets 2012.

FAO. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). Seguimiento del Mercado del Arroz de la FAO (SMA).

Fedearroz (Federación Nacional de Arroceros). Beneficios del Arroz.

Fujita, et al. NAL1 allele from a rice landrace greatly increases yield in modern indica cultivars. 2013. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 110, 51. p. 20431-20436.

Villalobos, E. Fisiología de la Producción de Los Cultivos Tropicales. 1ª edición. En: Procesos fisiológicos básicos. No. 1 (2001)

Watanabe, Y. 1997. Genomic constitution of genus *Oryza*. In: Matsuo, T; Futsuhara, Y; Kikuchi, F; Yamaguchi, H. eds. Science of the rice plant: genetics. Tokio, JP, FAPCR. p29-39.

Wang, Y. Li, J, J. Branching in rice. 2011. Plant Biology. 14. p. 94-99.

Winter H. et Huber, S.C. Regulation of Sucrose metabolism in higher plants : Localization and regulation of activity of key enzymes. 2000. Critical reviews in plant sciences. 19. p.31-67.

Xiong, Jie. Ding, Cheng Qiang. Wei, Guang Bin. Ding, Yan Feng. Wang, Shao Hua. Characteristic of Dry-Matter Accumulation and Nitrogen-Uptake of Super-High-Yielding Early Rice in China. 2013. Agronomy Journal. 105, 4. p. 1142-1150.

Koch, K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. 2004. *Current opinion in plant biology*. 7. p.235-246

Kozlowski, T. Carbohydrate sources and sinks in woody plants. 1992. *Bot. Rev.* 58, 2. p. 107-222.

Kozlowski, T. Keller, T. Food relations of woody plants. 1966. *Bot. Rev* 33. p. 293-382

León, J. *Botánica de los cultivos tropicales*. 2000. San José, CR, IICA. 522p.

Luquet, D. Clément-Vidal, A. Fabre, D. This, D. Sonderegger, N. Dingkuhn, M. Orchestration of transpiration, growth and carbohydrate dynamics in rice during a dry-down cycle. 2008. *Functional Plant Biology*. 35, 8. p. 689-704.

Miller, N, J. Miller, J, C. *Estadística y quimiometría para química analítica*. 4 Ed. Madrid. pearson. 2002. p. 296. ISBN 84-205-3514-1.

Morita, S. Nakano, H. Nonstructural Carbohydrate Content in the Stem at Full Heading Contributes to High Performance of Ripening in Heat-Tolerant Rice Cultivar Nikomaru. 2011. *Crop Science*. 51, 2. p. 818-828.

Nagata, Kenji. Shimizu, Hiroyuki. Terao, Tomio. Quantitative Trait Loci for Nonstructural Carbohydrate Accumulation in Leaf Sheaths and Culms of Rice (*Oryza sativa* L.) and their Effects on Grain Filling. 2002. *Breeding Science*. 52, 4. p. 275-283.

Ohsumi, et al. Evaluation of yield performance in rice near-isogenic lines with increased spikelet number. 2011. *Field Crops Research*. 120, 1. p. 68-75

Rebolledo, M. C. Dingkuhn, M. Péré, P. McNally, K. L. Luquet, D. Developmental Dynamics and Early Growth Vigour in Rice. I. Relationship Between Development

Rate (1/Phyllochron) and Growth. 2012. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 198, 5. p. 374-384.

Rebolledo et al, 2014. En Preparación.

Secretaria de Agricultura y Ganadería (SAG), Dirección de Ciencia y Tecnología Agropecuaria (DICTA). *Manual Técnico para el cultivo de Arroz. (*Oryza sativa* L)*.

Sheoran, Inder S. Saini, Hargurdeep S. Drought-induced male sterility in rice: Changes in carbohydrate levels and enzyme activities associated with the

inhibition of starch accumulation in pollen. 1996. *Sexual Plant Reproduction*. 9, 3. p. 161-169.

Slewinski, T. Non-structural carbohydrate partitioning in grass stems: a target to increase yield stability, stress tolerance, and biofuel production. 2012. *Journal of experimental botany*. 63,13. p. 4647-4670.

Toto, Priscilla. 2008. Etude biochimique du métabolisme des glucides en appui à la compréhension des mécanismes d'allocation des carbohydrates chez le riz sous contraintes hydriques: Etude des invertases acides et quantification des carbohydrates.. Montpellier, 49 h. Stage de Master professionnel. Université Montpellier II.

Villalobos, E. Fisiología de la Producción de Los Cultivos Tropicales. 1ª edición. En: *Procesos fisiológicos básicos*. [En línea]. No. 1 (2001)

Watanabe, Y. 1997. Genomic constitution of genus *Oryza*. In: Matsuo, T; Futsuhara, Y; Kikuchi, F; Yamaguchi, H. eds. *Science of the rice plant: genetics*. Tokio, JP, FAPCR. P29-39.

Wang, Y. Li, J, J. Branching in rice. 2011. *Plant Biology*. 14. p. 94-99.

Winter H. et Huber, S.C. Regulation of Sucrose metabolism in higher plants : Localization and regulation of activity of key enzymes. 2000. *Critical reviews in plant sciences*. 19. p.31-67.

Xiong, Jie. Ding, Cheng Qiang. Wei, Guang Bin. Ding, Yan Feng. Wang, Shao Hua. Characteristic of Dry-Matter Accumulation and Nitrogen-Uptake of Super-High-Yielding Early Rice in China. 2013. *Agronomy Journal*. 105, 4. p. 1142-1150.

Yang, De-Long. Jing, Rui-Lian. Chang, Xiao-Ping. Li, Wei. Identification of quantitative trait loci and environmental interactions for accumulation and remobilization of water-soluble carbohydrates in wheat (*Triticum aestivum* L.) stems. 2007. *Genetics*. 176, 1. p. 571-584.

Winter H. et Huber, S.C. Regulation of Sucrose metabolism in higher plants : Localization and regulation of activity of key enzymes. 2000. Critical reviews in plant sciences. 19. p.31-67.

Xiong, Jie. Ding, Cheng Qiang. Wei, Guang Bin. Ding, Yan Feng. Wang, Shao Hua. Characteristic of Dry-Matter Accumulation and Nitrogen-Uptake of Super-High-Yielding Early Rice in China. 2013. Agronomy Journal. 105, 4. p. 1142-1150.

Yang, De-Long. Jing, Rui-Lian. Chang, Xiao-Ping. Li, Wei. Identification of quantitative trait loci and environmental interactions for accumulation and remobilization of water-soluble carbohydrates in wheat (*Triticum aestivum* L.) stems. 2007. Genetics. 176, 1. p. 571-584.

Zamorano, D. Gonzales, N. El cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.).

## NETFRAFIA

[http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0002192X2006000200001&script=sci\\_ar  
ttext](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0002192X2006000200001&script=sci_ar<br/>ttext)

[http://www.ciat.cgiar.org/riceweb/pdfs/morfologia\\_planta\\_arroz.pdf](http://www.ciat.cgiar.org/riceweb/pdfs/morfologia_planta_arroz.pdf)>

[http://books.google.com.co/books/about/Morphology\\_and\\_Varietal\\_Characteristics.  
html?id=xoR0r5Nam9QC&redir\\_esc=y](http://books.google.com.co/books/about/Morphology_and_Varietal_Characteristics.<br/>html?id=xoR0r5Nam9QC&redir_esc=y)

<http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf>.

<http://curlacavunah.files.wordpress.com/2010/04/el-cultivo-del-arroz.pdf>>.

<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>.

[http://www.fao.org/economic/est/publications/publicaciones-sobre-el-  
arroz/seguimiento-del-mercado-del-arroz-sma/es/](http://www.fao.org/economic/est/publications/publicaciones-sobre-el-<br/>arroz/seguimiento-del-mercado-del-arroz-sma/es/)>.

<http://www.fedearroz.com.co/new/bondades.php>.

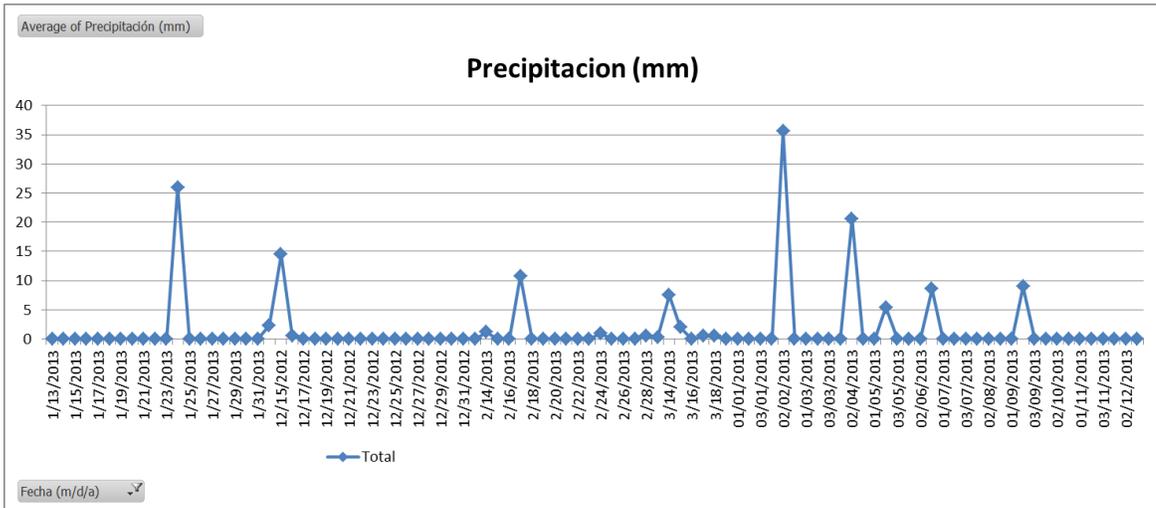
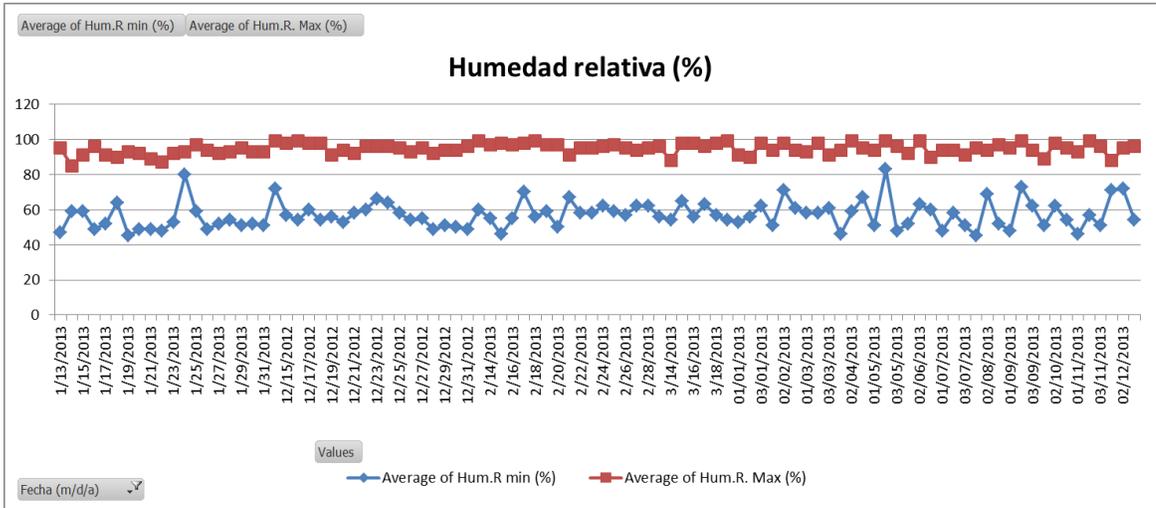
[http://books.google.com.co/books?id=30uSclaUo94C&printsec=frontcover&hl=es&  
source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.co/books?id=30uSclaUo94C&printsec=frontcover&hl=es&<br/>source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false).

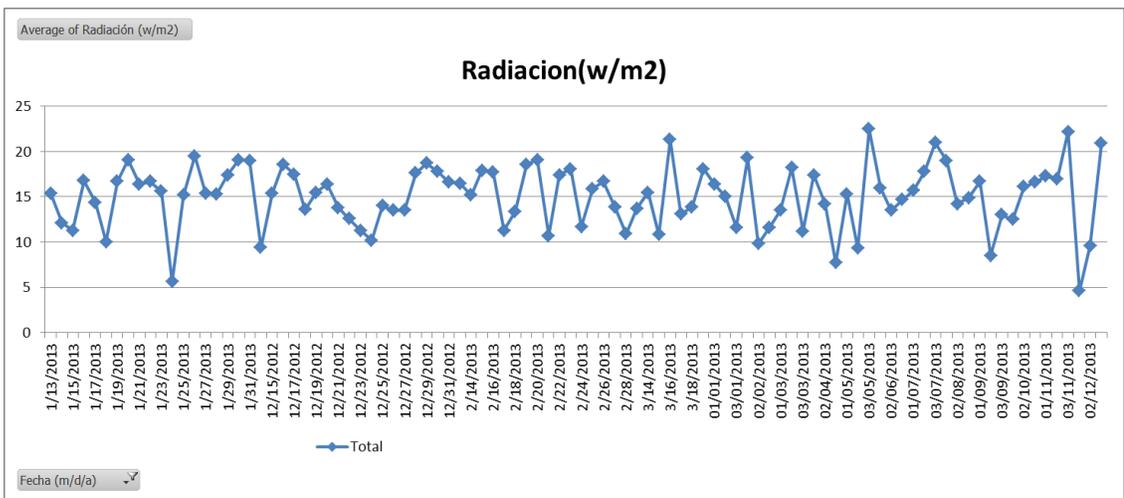
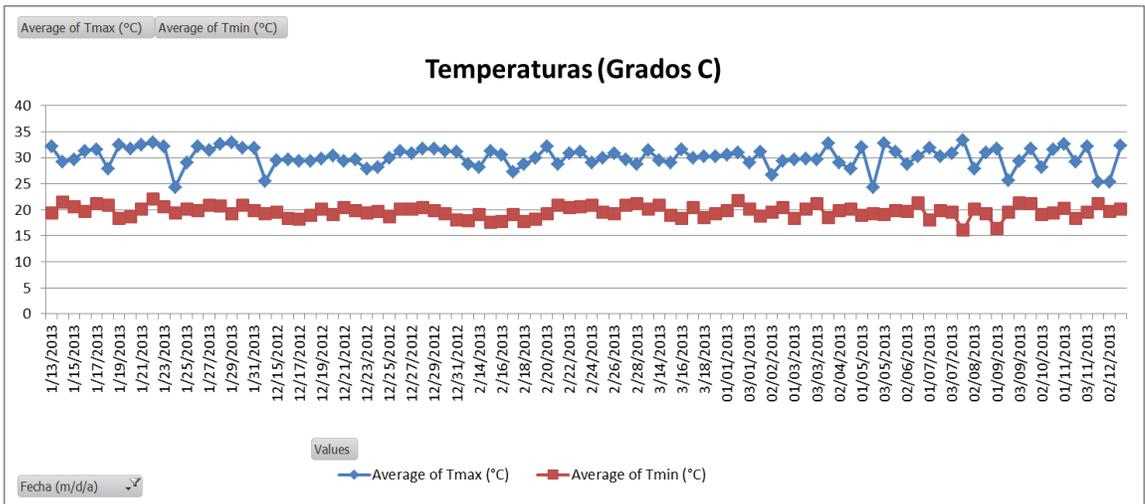
[http://books.google.com.co/books?id=30uSclaUo94C&printsec=frontcover&hl=es&  
source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.co/books?id=30uSclaUo94C&printsec=frontcover&hl=es&<br/>source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false).

[http://www.sap.uchile.cl/descargas/fisiogenetica/fisiologia\\_del\\_arroz.pdf](http://www.sap.uchile.cl/descargas/fisiogenetica/fisiologia_del_arroz.pdf)

# ANEXOS

## Anexo 1. Condiciones ambientales del ensayo en campo

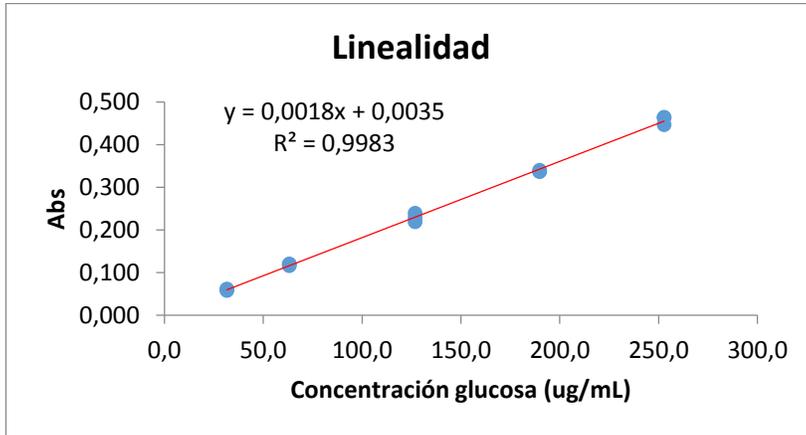




Anexo 2. Validación del método enzimático para determinar almidón en tallos de arroz.

Parámetros de la validación

LINEALIDAD



Nivel	$X_i$	$y_{prom}$	Std Dev	CV (%)	$\hat{y}_i$	$(Y_{prom} - \hat{y}_i)^2$
1	31.63	6.000E-02	1.732E-03	2.887E+00	5.998E-02	5.612E-10
2	63.26	1.187E-01	2.309E-03	1.946E+00	1.164E-01	4.914E-06
3	126.92	2.290E-01	1.000E-02	4.367E+00	2.301E-01	1.247E-06
4	189.88	3.380E-01	1.732E-03	5.124E-01	3.425E-01	2.047E-05
5	252.84	4.583E-01	9.815E-03	2.141E+00	4.549E-01	1.157E-05

Analisis de Varianza ANOVA

$$SCT = SCRES + SCREG$$

$$SCRES = SCEXP + SCFA$$

	Suma de cuadrados (SC)	gl	Varianza (V)	Valores de F	
Regresión	3.13E-01	1.00	3.13E-01	F1	7688.75
Residual	5.30E-04	n-2=13	4.0764E-05	F1 teórico (0.05,1,10)	4.965
Falta de ajuste	3.820E-05	k-2=3	1.273E-05	F2	0.0004
Error Exp.	3.13E-01	$\sum ni-k=10$	3.13E-02	F2 teórico(0.05,3,10)	3.708
Total	3.1395E-01	$\sum ni-1=14$	2.2425E-02		

Criterio de Aceptación para la Regresión Lineal

La regresión es estadísticamente representativa ( $F1 > Ft$ )

El desvío no es representativo, la linealidad es óptima ( $F2 < Ft$ )

F Regresión > F tabla	Cumple
F Linealidad < F tabla	Cumple

Test de verificación de la pendiente (b) o de linealidad

Parámetro Estadístico		Valor Obtenido	FORMULAS
b		0.00179	Pendiente
Sb		0.0000204	$\sqrt{S^2}b$
t exp		87.6855	$ b  / Sb$
t teórico $\alpha=0.05$	n-2 gl=13	2.16	
Limite de confianza Superior		0.00183	$b + t \text{ teórico} * Sb$
Limite de confianza Inferior		0.00174	$b - t \text{ teórico} * Sb$
CRITERIO: T exp > T tab		Cumple	

Test de verificación de la variable independiente o de proporcionalidad

Parámetro Estadístico		Valor Obtenido	FORMULAS
a		0.00350	intercepto
Sa		0.0114	$\sqrt{S^2}a$
t exp		0.307	$ a  / Sa$
t teórico, n=	n-2 gl=13	2.16	tabulado (ver tabla)
Limite de confianza Superior		0.0282	$a + t \text{ teórico} * Sa$

Limite de confianza Inferior	-0.0212	a - t teorico * Sa
CRITERIO: T exp < T tab	Cumple	

Test de hipótesis para r:

Parametro Estadístico		Valor Obtenido	Formulas
r		0.9992	Coefficiente de correlacion
r <sup>2</sup>		0.9983	Coefficiente de determinacion
t exp		97.2784	$ r  \sqrt{(n-2)} / \sqrt{(1-r^2)}$
t teorico $\alpha=0.05$	n-2 gl=13	2.16	tabulado (ver tabla) grados de libertad = n-2
CRITERIO: T exp > T tab		Cumple	

Test Cochran

glucosa (mg/mL)	f(y/x)	Promedio	CV	Desv. Std.	Varianza (S <sup>2</sup> )
31,6	0,001834	0,00190	2,9	0,00005	3,00E-09
31,6	0,001929				
31,6	0,001929				
63	0,001834	0,00188	1,95	0,00004	1,33E-09
63	0,001897				
63	0,001897				
127	0,001804	0,00180	4,37	0,00008	6,21E-09
127	0,001725				
127	0,001883				
190	0,001791	0,00178	0,51	0,00001	8,32E-11
190	0,001775				
190	0,001775				
253	0,001835	0,00181	2,14	0,00004	1,51E-09
253	0,001835				
253	0,001768				

$$G_{exp} = S^2 \max / ( S^2_1 + S^2_2 + S^2_3 + S^2_4 + S^2_5 + S^2_6 + S^2_7 )$$

Parametro Estadístico	Valor Obtenido
S <sup>2</sup> max	6.21E-09
$\sum S^2_i$	1.21E-08
G exp	0.5118
G tablas, ( $\alpha=0.05, K=5, n=3$ )	0.6800
CRITERIO: G exp < G tab	Cumple

Por lo tanto las varianzas de las concentraciones son homogéneas, es decir que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

#### PRECISIÓN

% CV max. aceptado =  $\%CV_{\text{método}} / 2^{0.5}$   
 Criterio: % CV instrumento < % CV método

No. Replica	Abs
1	0.507
2	0.504
3	0.503
4	0.501
5	0.498
6	0.499
7	0.499
8	0.500
9	0.500
10	0.500
Abs Media	0.501
Desv Estd.	0.003
CV (%)	0.552
%CV max.	3.359
%CV <sub>i</sub> ≤ 5	Cumple

Repetibilidad del método

Muestra	Abs
1	0.423
2	0.363
3	0.446
4	0.462
5	0.462
6	0.444
promedio	0.433
Desviacion Estandar	0.037
%CV	8.618
%CV max.	4.75
%CV≤4.75	Cumple

%CV max aceptado  
Interv. De aceptación= 5%

Precisión intermedia

Analista	Dia 1	Dia 2	Dia 3
1	0.423	0.425	0.402
	0.446	0.447	0.409
	0.462	0.428	0.407
Promedio	0.44	0.43	0.41
DS	0.02	0.01	0.00
CV%	4.46	2.74	0.92
2	0.396	0.389	0.368
	0.415	0.414	0.467
	0.397	0.416	0.421
Promedio	0.403	0.406	0.419
DS	0.011	0.015	0.050
CV%	2.729	3.751	11.832
Promedio Total	0.42		
DS Total	0.03		
CV% Total	6.06		

CV% < 2 * 4.75	cumple
----------------	--------

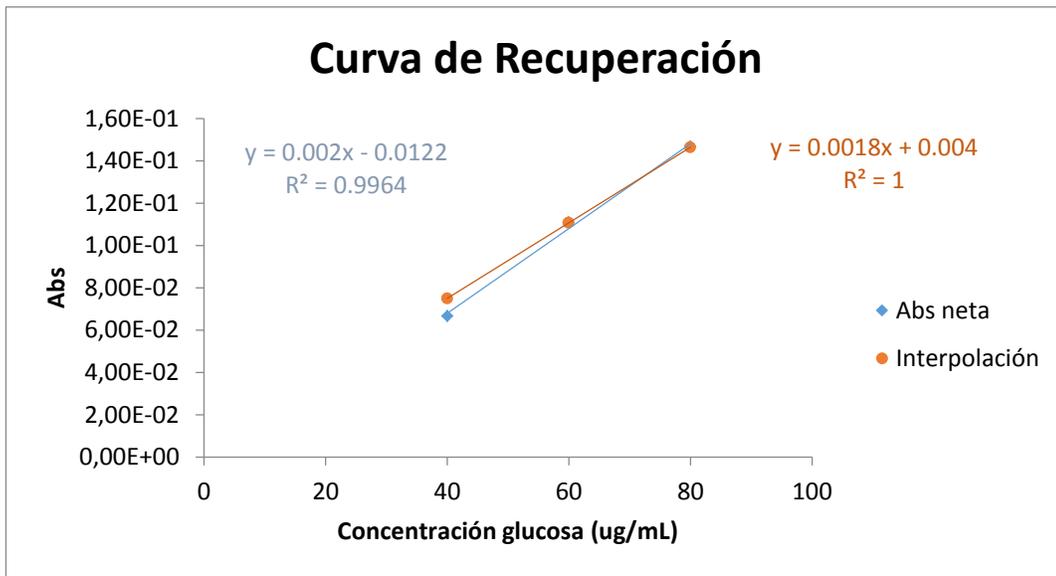
Exactitud

Muestra	Absorbancia Teórica			
	x	x+ Std(40 ug/mL)	x+ Std(60 ug/mL)	x+ Std( 80 ug/mL)
Respuesta	0.020	0.101	0.136	0.154
	0.029	0.099	0.138	0.175
	0.025	0.075	0.133	0.187
Media	0.025	0.092	0.136	0.172
DE	0.00	0.01	0.00	0.02
%CV	18.04	15.69	1.63	9.73

Comparación de las curvas obtenidas con la curva de calibración

Curva de calibración	
Intercepto	0.003502629
Pendiente	0.001785423

Concentración	Abs Exp - Abs Blanco	Interpolación con curva de calibrado	Recuperación (%)
40	6.66E-02	7.49E-02	88.84
60	1.11E-01	1.11E-01	100.14
80	1.47E-01	1.46E-01	100.23
		Media=	96.40
		DE=	6.55
		%CV=	6.79



Criterio:  $t_{exp} < t_{teórico}$  no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100.

$t_{exp} =$	0.918
$t_{teórico}(\alpha=0.005, gl=2)$	4.303
Criterio:	Cumple

Anexo 3. Comparación estadística métodos C y F de extracción.

Método	Rafinosa (mg/g)	Sacarosa (mg/g)	Glucosa (mg/g)	Fructosa (mg/g)
C	3,8	28,0	12,2	16,0
	3,7	24,7	11,2	14,2
	3,4	23,1	10,4	13,2
<b>Promedio</b>	3,6	25,3	11,3	14,5
<b>S</b>	0,2	2,5	0,9	1,4
<b>%CV</b>	5,6	10,0	7,6	9,8
F	4,2	25,2	11,5	14,8
	3,6	26,0	11,4	14,7
	3,9	24,5	10,9	14,1
<b>Promedio</b>	3,9	25,2	11,2	14,5
<b>S</b>	0,3	0,8	0,3	0,4
<b>%CV</b>	7,6	3,0	3,0	2,8

Anexo 4. Parámetros de validación

A. LINEALIDAD

Rafinosa

Nivel de conc.	$X_i$	$y_{prom}$	Desv. Estandar	CV (%)	$\hat{y}_i$	$(Y_{prom}-\hat{y}_i)^2$
1	0,1	2469861	106552,5066	4,314109444	2313273,471	24519654092
2	1	23472261,33	799265,4259	3,405148803	22725436,98	5,57747E+11
3	2	45546918,33	334759,4046	0,734977067	45405618,66	19965597876
4	3	67004295	373478,7641	0,55739526	68085800,34	1,16965E+12
5	4	89006277	1099003,617	1,234748441	90765982,01	3,09656E+12
6	5	115294858,3	182219,2505	0,158046294	113446163,7	3,41767E+12

**Análisis de la varianza: ANOVA**

Relación entre suma de cuadrados:

$$SC_T = SC_{RES} + SC_{REG}$$

$$SC_{RES} = SC_{EXP} + SC_{FA}$$

Relación entre suma de cuadrados y variancias:

$$V = SC/g_l$$

	Suma de cuadrados (SC)	Grados de libertad (gl)	varianza (V)	
Regresion ( $SC_{REG}$ )	6,19408E+16	1	6,19408E+16	F1
Residual ( $V_{RES}$ )	3,79505E+12	n-2=15	2,53003E+11	
Falta de ajuste ( $SC_{FA}$ )	1025913552	k-2=4	256478388	F2
Error Exp. ( $SC_{EXP}$ )	3,79402E+12	$\sum ni-k=11$	3,44911E+11	
Total ( $SC_T$ )	6,19446E+16	$\sum ni-1=16$	3,87154E+15	

F1 tabla	4,75
F2 tabla	3,26

criterio de aceptación para la regresión lineal			
La regresión es estadísticamente representativa cuando ( F1>Ft)			
El desvío no es representativo, la linealidad es óptima si y solo si (F2<Ft)			
	F Regresión > F tabla	CUMPLE	
	F Linealidad < F tabla	CUMPLE	

Test de verificación de la pendiente (b) o de linealidad

Parámetro Estadístico		Valor Obtenido	Formulas
b		22680181,678	pendiente
Sb		208028,011	$\sqrt{S^2b}$
t exp		109,0246528	$ b  / Sb$
t teorico $\alpha=0.05$	n-2 gl=16	2,12	tabulado (ver tabla)
Límite de confianza Superior		23121201,06	$b+ t \text{ teorico} * Sb$
Límite de confianza Inferior		22239162,29	$b -t \text{ teorico} * Sb$
CRITERIO: T exp> T tab		CUMPLE	

%desv. Stand

Test de verificación de la variable independiente (a) o de proporcionalidad

parámetro estadístico		valor obtenido	Formulas
a		45255,30	intercepto
Sa		648135,2582	$\sqrt{S^2a}$
t exp		0,069823857	$ a  / Sa$
t teorico, n=	16	2,12	tabulado (ver tabla)
Límite de confianza Superior		1419302,051	$a+ t \text{ teorico} * Sa$
Límite de confianza Inferior		-1328791,444	$a -t \text{ teorico} * Sa$
CRITERIO: T exp< T tab		CUMPLE	

Test de hipótesis para r

parámetro estadístico		valor obtenido	Formulas
r		0,9994	Coefficiente de correlación
r <sup>2</sup>		0,998739641	Coefficiente de determinación
t exp		112,6001772	$ r  \sqrt{(n-2)} / \sqrt{(1-r^2)}$
t teorico $\alpha=0.05$	n-2 gl=16	2,12	tabulado (ver tabla) grados de libertad = n-2
CRITERIO: T exp> T tab		CUMPLE	

Test de Cochran

X (Concentración (mg/mL))	f(y/x)	Promedio	Desv. Estandar	Varianza (S <sup>2</sup> )	%CV
0,15	23945170	24698610	1065525,066	1,13534E+12	4,314109444
0,15	25452050				
1,5	24376427	23472261,33	799265,4259	6,38825E+11	3,405148803
1,5	22859902				
1,5	23180455				
3	22942136,5	22773459,17	167379,7023	28015964742	0,734977067
3	22770833				
3	22607408				
4,5	22397421	22334765	124492,9214	15498487474	0,55739526
4,5	22191391,67				
4,5	22415482,33				
6	22552194,5	22251569,25	274750,9044	75488059446	1,234748441
6	22013470,5				
6	22189042,75				
7,5	23101053,4	23058971,67	36443,8501	1328154210	0,158046294
7,5	23037930,8				
7,5	23037930,8				

$$G_{exp} = S^2_{max} / ( S^2_1 + S^2_2 + S^2_3 + S^2_4 + S^2_5 + S^2_6 + S^2_7 )$$

Parámetro Estadístico	Valor Obtenido
S <sup>2</sup> max	1,13534E+12
∑S <sup>2</sup> <sub>i</sub>	1,8945E+12
G exp	0,599284209
G tablas, (α=0,05, K=6, n=3)	0,6161
CRITERIO: G exp < G tab	CUMPLE

Las varianzas de las concentraciones son homogéneas, el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

## Sacarosa

Nivel de conc.	Xi	yprom	STDEV	CV (%)	yi	(Yprom-yi) <sup>2</sup>
1	0,15	3430113,667	45354,32814	1,322239802	4115446,025	4,6968E+11
2	1,5	34219219,33	261060,2497	0,762905334	34602480,56	1,46889E+11
3	3	69321788,67	286072,3626	0,412673083	68476963,38	7,1373E+11
4	4,5	103591215,3	458939,4779	0,44302934	102351446,2	1,53703E+12
5	6	136103088,3	1113359,243	0,818026436	136225929	15089832396
6	7,5	169207251,7	801674,7788	0,473782755	170100411,8	7,97735E+11

Análisis de la varianza: ANOVA  
relación entre suma de cuadrados:

$$\begin{aligned} \text{SCT} &= \text{SCRES} + \\ &\text{SCREG} \\ \text{SCRES} &= \text{SCEXP} + \\ &\text{SCFA} \end{aligned}$$

Relación entre suma de cuadrados y variancias:  $V = \text{SC} / \text{gl}$

	Suma de cuadrados (SC)	Grados de libertad (gl)	varianza (V)	
Regresion (SC <sub>REG</sub> )	1,33078E+17	1	1,33078E+17	561059,2381 F
Residual (V <sub>RES</sub> )	3,79505E+12	n-2=16	2,3719E+11	
Falta de ajuste (SC <sub>FA</sub> )	1547618031	k-2=4	386904507,8	0,001223898 F
Error Exp. (SC <sub>EXP</sub> )	3,7935E+12	$\sum ni - k = 12$	3,16125E+11	
Total (SC <sub>T</sub> )	1,33082E+17	$\sum ni - 1 = 17$	7,82833E+15	

F1 tabla	4,75
F2 tabla	3,26

criterio de aceptación para la regresión lineal	
La regresión es estadísticamente representativa cuando ( F1 > Ft)	
El desvío no es representativo, la linealidad es óptima si y solo si (F2 < Ft)	
F Regresión > F tabla	CUMPLE
F Linealidad < F tabla	CUMPLE

Parámetro Estadístico	Valor Obtenido	Formulas
b	22582988,545	pendiente
Sb	91949,04035	$\sqrt{S^2b}$

t exp	245,6033087	b  /Sb
t teorico $\alpha=0.05$   n-2 gl=16	2,12	tabulado (ver tabla)
Límite de confianza Superior	22777920,51	b+ t teorico * Sb
Límite de confianza Inferior	22388056,58	b -t teorico * Sb
CRITERIO: T exp> T tab	CUMPLE	

Test de verificación de la pendiente (b) o de linealidad

Test de verificación de la variable independiente (a) o de proporcionalidad

parámetro estadístico	valor obtenido	Formulas
a	727997,74	intercepto
Sa	417622,2774	$\sqrt{S^2a}$
t exp	1,743196622	a  /Sa
t teorico, n=	16	2,12
Límite de confianza Superior	1613356,971	a+ t teorico * Sa
Límite de confianza Inferior	-157361,4847	a -t teorico * Sa
CRITERIO: T exp< T tab	CUMPLE	

Test de hipótesis para r

parámetro estadístico	valor obtenido	Formulas
R	0,9999	Coefficiente de correlación
r <sup>2</sup>	0,999734823	Coefficiente de determinación
t exp	245,6033087	$ r  \sqrt{(n-2) / \sqrt{(1-r^2)}}$
t teorico $\alpha=0.05$   n-2 gl=16	2,12	tabulado (ver tabla) grados de libertad = n-2
CRITERIO: T exp> T tab	CUMPLE	

Test de Cochran

X (Concentración (mg/mL))	f(y/x)	Promedio	Desv. Std.	Varianza (S <sup>2</sup> )	CV
0,15	23162873,33	22867424,44	302362,1876	91422892504	1,322239802
0,15	22558593,33				
0,15	22880806,67				
1,5	22628252,67	22812812,89	174040,1664	30289979533	0,762905334
1,5	22973963,33				
1,5	22836222,67				
3	23202044,67	23107262,89	95357,45421	9093044073	0,412673083
3	23108404				
3	23011340				
4,5	22903322,89	23020270,07	101986,5507	10401256515	0,44302934
4,5	23090734,22				
4,5	23066753,11				
6	22629539,83	22683848,06	185559,8738	34432466751	0,818026436

6	22531501,67				
6	22890502,67				
7,5	22671840,27				
7,5	22552496	22560966,89	106889,9705	11425465795	0,473782755
7,5	22458564,4				

$$G_{exp} = S^2 \max / (S^2_1 + S^2_2 + S^2_3 + S^2_4 + S^2_5 + S^2_6 + S^2_7)$$

Parámetro Estadístico	Valor Obtenido
S <sup>2</sup> max	91422892504
∑S <sup>2</sup> <sub>i</sub>	1,87065E+11
G exp	0,488722322
G tablas, (α=0,05, K=6, n=3)	0,6161
CRITERIO: G exp < G tab	CUMPLE

Si se cumple el criterio, las varianzas de las concentraciones son homogéneas, el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

### Glucosa

Nivel de conc.	Xi	yprom	STDEV	CV (%)	ŷ <sub>i</sub>	(Y <sub>prom</sub> -ŷ <sub>i</sub> ) <sup>2</sup>
1	0,15	3761796,333	57059,07548	1,516803953	2488635,86	1,62094E+12
2	1,5	39428730	224610,2216	0,569661314	38599324,04	6,87914E+11
3	3	77415255,33	1083520,294	1,399621159	78722310,9	1,70839E+12
4	4,5	116777943	511625,0057	0,438117844	118845297,8	4,27396E+12
5	6	157468050,7	1118234,783	0,710134391	158968284,6	2,2507E+12
6	7,5	201863349,3	530052,3928	0,262579807	199091271,5	7,68442E+12

Análisis de la varianza: ANOVA

Relación entre suma de cuadrados:

$$SCT = SCRES + SCREG$$

$$SCRES = SCEXP + SCFA$$

Relación entre suma de cuadrados y variancias:  $V = SC/gl$

	Suma de cuadrados (SC)	Grados de libertad (gl)	varianza (V)	
Regresion (SC <sub>REG</sub> )	1,78095E+17	1	1,78095E+17	750853,427
Residual (V <sub>RES</sub> )	3,79505E+12	n-2=16	2,3719E+11	
Falta de ajuste (SC <sub>FA</sub> )	1790145374	k-2=4	447536343,5	0,001415785
Error Exp. (SC <sub>EXP</sub> )	3,79326E+12	∑ni-k=12	3,16105E+11	
Total (SC <sub>T</sub> )	1,78099E+17	∑ni-1=17	1,04764E+16	

F1 tabla	4,75
F2 tabla	3,26

criterio de aceptación para la regresión lineal	
La regresión es estadísticamente representativa cuando ( $F1 > Ft$ )	
El desvío no es representativo, la linealidad es óptima si y solo si ( $F2 < Ft$ )	
F Regresión > F tabla	CUMPLE
F Linealidad < F tabla	CUMPLE

Test de verificación de la pendiente (b) o de linealidad

Parámetro Estadístico		Valor Obtenido	Formulas
b		26748657,908	pendiente
Sb		181813,337	$\sqrt{S^2}b$
t exp		147,1215388	$ b  / Sb$
t teórico $\alpha=0.05$	n-2 gl=16	2,12	tabulado (ver tabla)
Límite de confianza Superior		27134102,18	$b + t \text{ teórico} * Sb$
Límite de confianza Inferior		26363213,63	$b - t \text{ teórico} * Sb$
CRITERIO: T exp > T tab		CUMPLE	

Test de verificación de la variable independiente (a) o de proporcionalidad

parámetro estadístico		valor obtenido	Formulas
a		-1523662,83	intercepto
Sa		825775,8815	$\sqrt{S^2}a$
t exp		1,845128758	$ a  / Sa$
t teórico, n=	16	2,12	tabulado (ver tabla)
Límite de confianza Superior		226982,0423	$a + t \text{ teórico} * Sa$
Límite de confianza Inferior		-3274307,695	$a - t \text{ teórico} * Sa$
CRITERIO: T exp < T tab		CUMPLE	

Test de hipótesis para r

parámetro estadístico		valor obtenido	Formulas
r		0,9996	Coficiente de correlación
r <sup>2</sup>		0,999261337	Coficiente de determinación
t exp		147,1215388	$ r  \sqrt{(n-2)} / \sqrt{(1-r^2)}$
t teórico $\alpha=0.05$	n-2 gl=16	2,12	tabulado (ver tabla) grados de libertad = n-2
CRITERIO: T exp > T tab		CUMPLE	

Test de Cochran

X (Concentración (mg/mL))	f(y/x)	Promedio	Desv. Estandar	Varianza (S <sup>2</sup> )	%CV
0,15	25495746,67	25078642,22	380393,8365	1,44699E+11	1,516803953
0,15	24750853,33				
0,15	24989326,67				
1,5	26143373,33	26285820	149740,1477	22422111842	0,569661314
1,5	26441918,67				
1,5	26272168				
3	25416112,67	25805085,11	361173,4314	1,30446E+11	1,399621159
3	25869296,33				
3	26129846,33				
4,5	25861484,67	25950654	113694,4457	12926426987	0,438117844
4,5	25911793,78				
4,5	26078683,56				
6	26323257,83	26244675,11	186372,4638	34734695266	0,710134391
6	26031880,83				
6	26378886,67				
7,5	26845886,67	26915113,24	70673,65238	4994765140	0,262579807
7,5	26987150,13				
7,5	26912302,93				

$$G_{exp} = S^2 \max / ( S^2_1 + S^2_2 + S^2_3 + S^2_4 + S^2_5 + S^2_6 + S^2_7 )$$

Parámetro Estadístico	Valor Obtenido
S <sup>2</sup> max	1,44699E+11
$\sum S^2_i$	3,50224E+11
G exp	0,413162969
G tablas, ( $\alpha=0,05$ , K=6, n=3)	0,6161
CRITERIO: G exp < G tab	CUMPLE

Si se cumple el criterio significa que las varianzas de las concentraciones son homogéneas, es decir que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

## Fructosa

Nivel de concentración	$X_i$	$Y_{prom}$	STDEV	CV (%)	$\hat{y}_i$	$(Y_{prom}-\hat{y}_i)^2$
1	0,15	3842763,667	44006,38984	1,145175547	3078887,893	5,8351E+11
2	1,5	38269806,67	378269,8733	0,988429016	38216962,84	2792470385
3	3	77234354,67	188129,9686	0,243583273	77259268,33	620690567
4	4,5	115054409,7	136516,1021	0,118653516	116301573,8	1,5554E+12
5	6	153958582	65149,79576	0,042316443	155343879,3	1,919E+12
6	7,5	196226840,3	269143,8839	0,137159567	194386184,8	3,388E+12

### Análisis de la varianza: ANOVA

relación entre suma de cuadrados:

$$SC_T = SC_{RES} + SC_{REG}$$

$$SC_{RES} = SC_{EXP} + SC_{FA}$$

Relación entre suma de cuadrados y variancias:

$$V = SC/g_l$$

Nombre	Suma de cuadrados (SC)	Grados de libertad (gl)	varianza (V)	
Regresión (SCREG)	1,70894E+17	1	1,70894E+17	720491,9359 F1
Residual (VRES)	3,79505E+12	n-2=16	2,3719E+11	
Falta de ajuste (SCFA)	1753760271	k-2=4	438440067,8	0,001386996 F2
Error Exp. (SCEXP)	3,79329E+12	$\sum n_i - k = 12$	3,16108E+11	
Total (SCT)	1,70898E+17	$\sum n_i - 1 = 17$	1,00528E+16	

F1 tabla	4,75
F2 tabla	3,26

Test de verificación de la pendiente (b) o de linealidad

Parámetro Estadístico		Valor Obtenido	Formulas
b		26028203,66	Pendiente
Sb		111653,3794	$\sqrt{S^2b}$
t exp		233,1161296	$ b  / Sb$
t teorico $\alpha=0.05$	n-2 gl=16	2,12	tabulado (ver tabla)
Límite de confianza Superior		26264908,83	$b+ t \text{ teorico} * Sb$
Límite de confianza Inferior		25791498,5	$b - t \text{ teorico} * Sb$
CRITERIO: T exp > T tab		CUMPLE	

Test de verificación de la variable independiente (a) o de proporcionalidad

parámetro estadístico		valor obtenido	Formulas
a		-825342,66	intercepto
Sa		507117,1858	$\sqrt{S^2a}$
t exp		1,627518607	$ a  / Sa$
t teorico, n=	16	2,12	tabulado (ver tabla)
Límite de confianza Superior		249745,778	$a+ t \text{ teorico} * Sa$
Límite de confianza Inferior		-1900431,09	$a - t \text{ teorico} * Sa$
CRITERIO: T exp < T tab		CUMPLE	

Test de hipótesis para r

parámetro estadístico		valor obtenido	Formulas
r		0,9999	Coefficiente de correlación
r <sup>2</sup>		0,999705661	Coefficiente de determinación
t exp		233,1161296	$ r  \sqrt{(n-2) / \sqrt{(1-r^2)}}$
t teorico $\alpha=0.05$	n-2 gl=16	2,12	tabulado (ver tabla) grados de libertad = n-2
CRITERIO: T exp > T tab		CUMPLE	

Test Cochran

X (Concentración (mg/mL))	f(y/x)	Promedio	Desv. Estandar	Varianza (S <sup>2</sup> )	%CV
0,15	25518166,67	25618424,44	293375,9322	86069437615	1,14517555
0,15	25388320				
0,15	25948786,67				
1,5	25240848,67	25513204,44	252179,9155	63594709796	0,98842902
1,5	25738609,33				
1,5	25560155,33				
3	25813011	25744784,89	62709,98954	3932542788	0,24358327
3	25689661,33				
3	25731682,33				
4,5	25537754	25567646,59	30336,91158	920328204,3	0,11865352
4,5	25566776,67				
4,5	25598409,11				
6	25647287,33	25659763,67	10858,29929	117902663,5	0,04231644
6	25664925,5				
6	25667078,17				
7,5	26202450,8	26163578,71	35885,85118	1287794315	0,13715957
7,5	26131712,27				
7,5	26156573,07				

$$G_{exp} = S^2 \max / ( S^2_1 + S^2_2 + S^2_3 + S^2_4 + S^2_5 + S^2_6 + S^2_7 )$$

Parametro Estadístico	Valor Obtenido
S <sup>2</sup> max	86069437615
$\sum S^2_i$	1,55923E+11
G exp	0,552000633
G tablas, ( $\alpha=0,05$ , K=6, n=3)	0,6161
CRITERIO: G exp < G tab	CUMPLE

Si se cumple el criterio, las varianzas de las concentraciones son homogéneas, el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados

B. REPETIBILIDAD DEL METODO

Rafinosa

Conc (mg/g)	Promedio	%CV
6,37	6,27	2,33
6,41		
6,34		
6,32		
6,02		
6,17		

Sacarosa

Conc (mg/g)	Promedio	%CV
69,14	67,22	3,78
69,14		
68,21		
68,37		
62,69		
65,76		

Glucosa

Conc (mg/g)	Promedio	%CV
31,61	31,38	2,58
31,41		
31,63		
32,25		
29,83		
31,53		

Fructosa

Conc (mg/g)	Promedio	%CV
31,61	31,38	2,58
31,41		
31,63		
32,25		
29,83		
31,53		

C. REPETICIÓN INSTRUMENTAL

Rafinosa

Conc (mg/g)	Promedio	%CV
6,05	6,06	0,75
6,13		
6,02		
6,08		
6,08		
6,01		

Sacarosa

Conc (mg/g)	Promedio	%CV
65,88	66,04	0,13
66,11		
66,05		
66,07		
66,12		
66,02		

Glucosa

Conc (mg/g)	Promedio	%CV
27,74	28,04	0,55
28,09		
28,06		
28,08		
28,14		
28,15		

Fructosa

Conc (mg/g)	Promedio	%CV
30,75	31,23	0,78
31,31		
31,20		
31,33		
31,36		
31,41		

D. PRECISIÓN INTERMEDIA

Rafinosa

Día	Analista	Conc (mg/g)	Promedio	%CV	%CV	%CV
día 1	A	5.72	5.98	3.79	2.74	3.34
		6.12				
		6.11				
	B	5.84	5.85	0.33		
		5.87				
		5.84				
día 2	A	6.37	6.37	0.52	3.39	3.34
		6.41				
		6.34				
	B	5.96	6.00	0.93		
		5.97				
		6.06				
día 3	A	6.32	6.17	2.40	2.62	
		6.02				
		6.17				
	B	5.90	5.96	1.48		
		6.06				
		5.92				

### Sacarosa

Día	Analista	Conc (mg/g)	Promedio	%CV	%CV	%CV
día 1	A	65,18	67,31	2,75	2,44	2,61
		68,45				
		68,31				
	B	65,07	65,87	1,93		
		67,33				
		65,19				
día 2	A	69,14	68,83	0,78	1,06	2,61
		69,14				
		68,21				
	B	67,60	67,70	0,34		
		67,96				
		67,53				
día 3	A	68,37	65,61	4,34	2,97	2,61
		62,69				
		65,76				
	B	65,13	66,32	1,59		
		67,13				
		66,70				

### Glucosa

Día	Analista	Conc (mg/g)	Promedio	%CV	%CV	%CV
día 1	A	27,23	27,91	2,14	1,79	2,07
		28,14				
		28,35				
	B	27,34	27,65	1,68		
		28,19				
		27,43				
día 2	A	28,49	28,42	0,36	0,73	2,07
		28,30				
		28,46				
	B	27,99	28,33	1,07		
		28,45				
		28,56				
día 3	A	29,04	28,03	4,15	2,83	2,07
		26,76				
		28,28				
	B	27,90	28,34	1,40		
		28,45				
		28,67				

## Fructosa

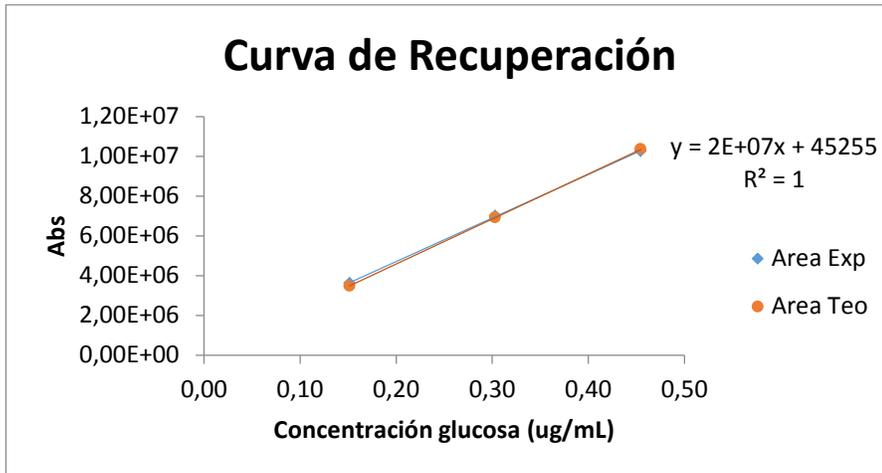
Dia	Analista	Conc (mg/g)	Promedio	%CV	%CV	%CV
1	A	30,20	30,99	2,22	1,92	2,09
		31,29				
		31,47				
	B	30,31	30,68	1,89		
		31,35				
		30,39				
2	A	31,61	31,55	0,39	0,45	2,09
		31,41				
		31,63				
	B	31,34	31,54	0,58		
		31,71				
		31,57				
3	A	32,25	31,20	3,97	2,77	2,09
		29,83				
		31,53				
	B	30,88	31,49	1,72		
		31,66				
		31,92				

## E. EXACTITUD

### Rafinosa

Muestra	Conc Std	Respuesta			Media	DE	%CV
x	0	4756235	4715924	4751925	4741361.3	22134.53	0.47
x+ Std 1	0.5	8414254	8360252	8311917	8362141.0	51194.64	0.61
x+ Std 2	1	11842201	11743192	11655763	11747052.0	93278.92	0.79
x+ Std 3	1.5	15223029	14866527	14920013	15003189.7	192255.53	1.28

Concentración	Area Experimental	Area Teorica	Recuperación (%)
0.15	3.62E+06	3.48E+06	104.00
0.30	7.01E+06	6.92E+06	101.27
0.45	1.03E+07	1.04E+07	99.11
		Media=	101.46
		DE=	2.45
		%CV=	2.42



Criterio:  $t_{exp} < t_{teórico}$  no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100.

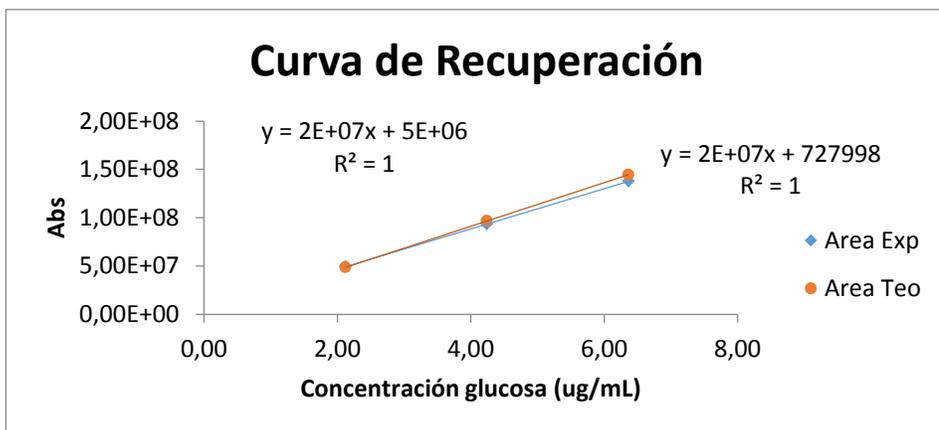
$t_{exp} =$	1.044
$t_{teórico}(\alpha=0.005, gl=2)$	4.303

Criterio:	Cumple
-----------	--------

### Sacarosa

Muestra	Conc Std	Respuesta			Media	DE	%CV
x	0	51766237	46311173	52844259	50307223.0	3502405.54	6.96
x+ Std 1	7	100605020	100057214	98664670	99775634.7	1000352.30	1.00
x+ Std 2	14	144801712	143654213	142261945	143572623.3	1271847.77	0.89
x+ Std 3	21	189444452	188172237	186807059	188141249.3	1318969.54	0.70

Concentración	Area Experimental	Area Teorica	Recuperación (%)
2.12	4.95E+07	4.86E+07	101.72
4.24	9.33E+07	9.65E+07	96.61
6.36	1.38E+08	1.44E+08	95.43
	Media=		97.92
	DE=		3.34
	%CV=		3.42



Criterio:  $t_{exp} < t_{teórico}$  no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100.

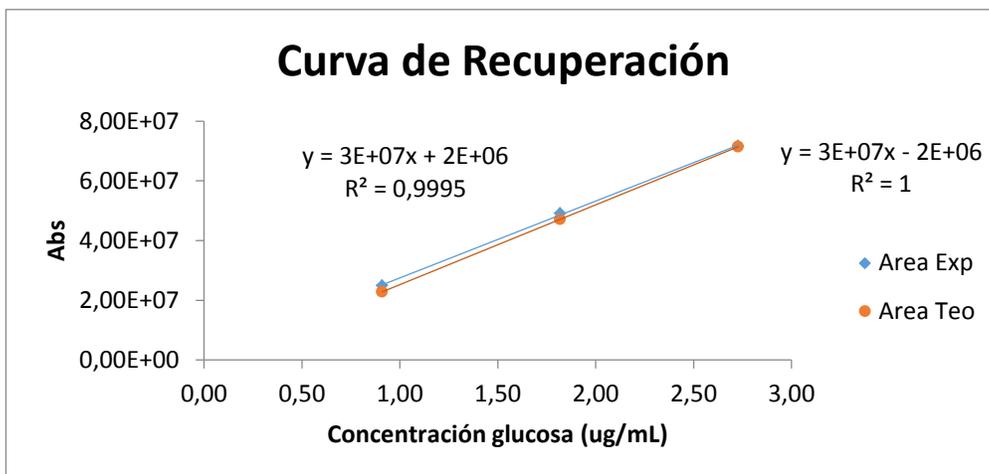
$t_{exp} =$	1.054
$t_{teórico}(\alpha=0.005, gl=2)$	4.303

Criterio:	Cumple
-----------	--------

## Glucosa

Muestra	Conc Std	Respuesta			Media	DE	%CV
x	0	25398172	25961718	26044812	25801567.3	351812.45	1.36
x+ Std 1	3	50744181	50604234	50631885	50660100.0	74117.17	0.15
x+ Std 2	6	75089224	75078444	74645182	74937616.7	253313.20	0.34
x+ Std 3	9	97900895	97513857	97013935	97476229.0	444675.62	0.46

Concentración	Area Experimental	Area Teorica	Recuperación (%)
0.91	2.49E+07	2.28E+07	109.06
1.82	4.91E+07	4.71E+07	104.30
2.73	7.17E+07	7.14E+07	100.35
		Media=	104.57
		DE=	4.36
		%CV=	4.17



Criterio:  $t_{exp} < t_{teórico}$  no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100.

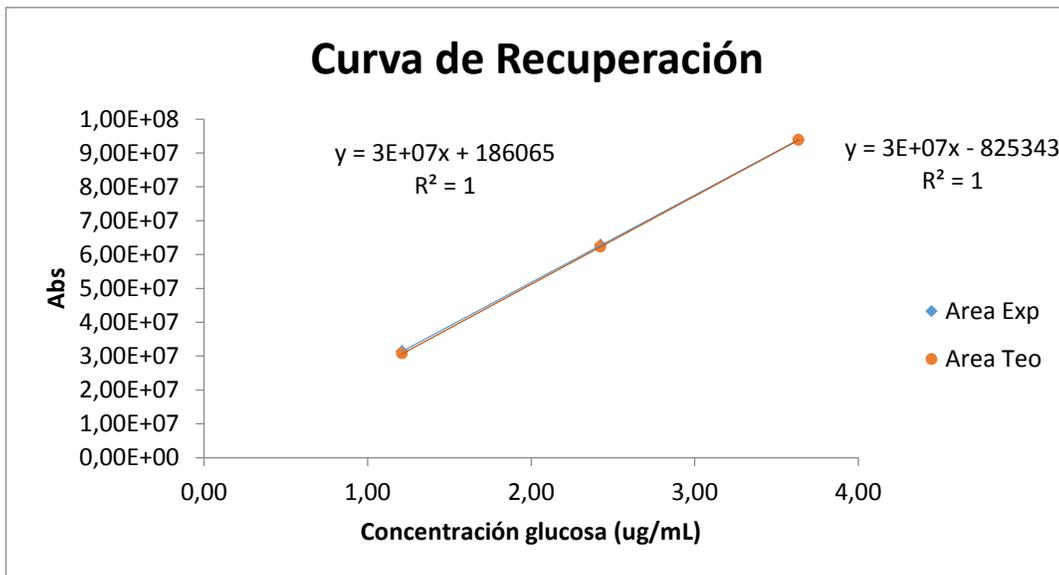
$t_{exp} =$	1.897
teórico( $\alpha=0.005, gl=2$ )	4.303

Criterio:	Cumple
-----------	--------

### Fructosa

Muestra	Conc Std	Respuesta			Media	DE	%CV
x	0	28539032	28627826	27483401	28216753.0	636651.36	2.26
x+ Std 1	4	60020100	60193703	58698665	59637489.3	817666.10	1.37
x+ Std 2	8	91873096	91021426	89999727	90964749.7	937969.62	1.03
x+ Std 3	12	122442794	122818687	121197899	122153126.7	848332.9	0.69

Concentración	Area Experimental	Area Teorica	Recuperación (%)
1.21	3.14E+07	3.07E+07	102.27
2.42	6.27E+07	6.23E+07	100.76
3.64	9.39E+07	9.38E+07	100.12
		Media=	101.05
		DE=	1.10
		%CV=	1.09



Criterio:  $t_{exp} < t_{teórico}$  no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100.

$t_{exp} =$	1.668
$t_{teórico}(\alpha=0.005, gl=2)$	4.303

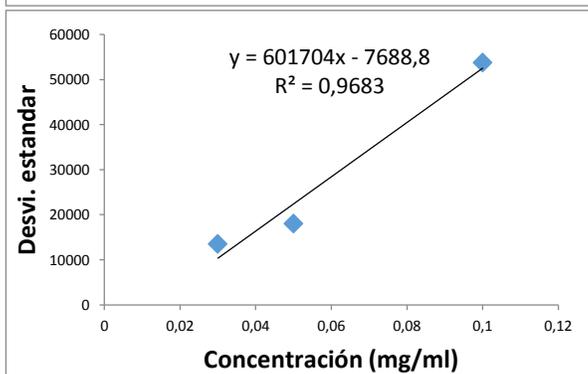
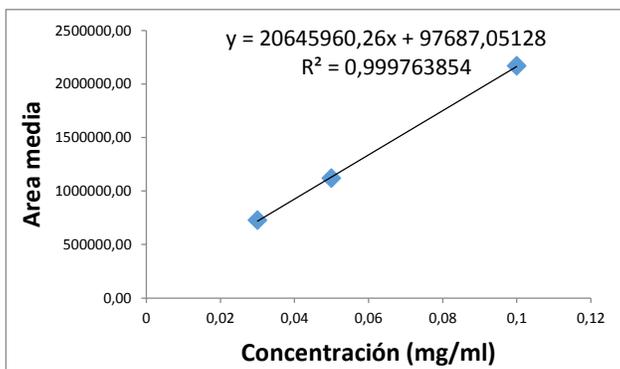
Criterio:	Cumple
-----------	--------

## F. LIMITE DE DETECCION Y CUANTIFICACION

### Rafinosa

Método basado en la extrapolación de la recta de calibrado a concentración cero.

Conc (mg/ml)	Área			Área Media	Desv. Estandar
0,03	719539	741771	717367	726225,67	13506,38506
0,05	1100096	1135960	1115428	1117161,33	17994,72026
0,1	2155245	2224232	2118364	2165947,00	53739,25901

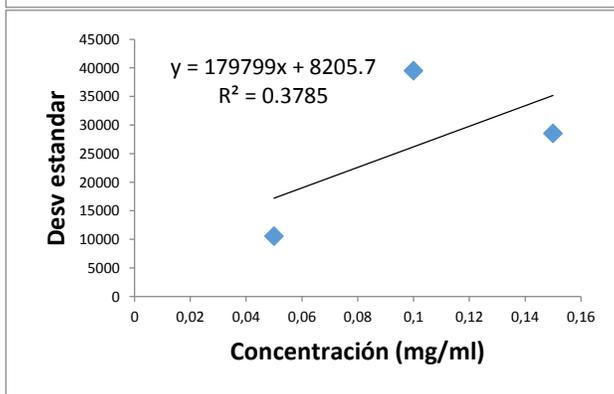
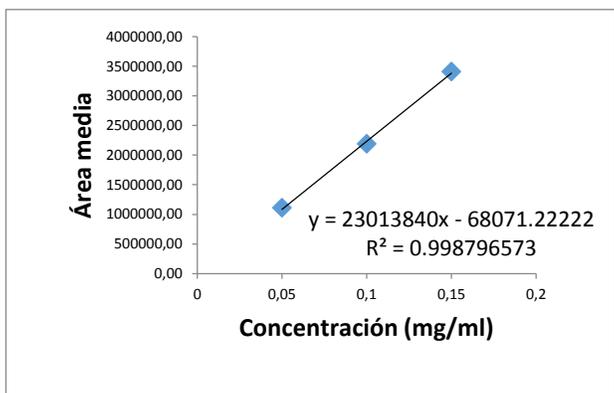


Límites	mg/ml	mg/g
LD(K=3)	0,003	0,07
LC (K=10)	0,005	0,10

## Sacarosa

Método basado en la extrapolación de la recta de calibrado a concentración cero.

Conc (mg/ml)	Área			Área Media	Desv. Estandar
0,05	1095400	1105172	1116472	1105681,33	10545,22932
0,1	2143528	2197652	2220395	2187191,67	39486,67943
0,15	3435899	3378859	3406438	3407065,33	28525,17415

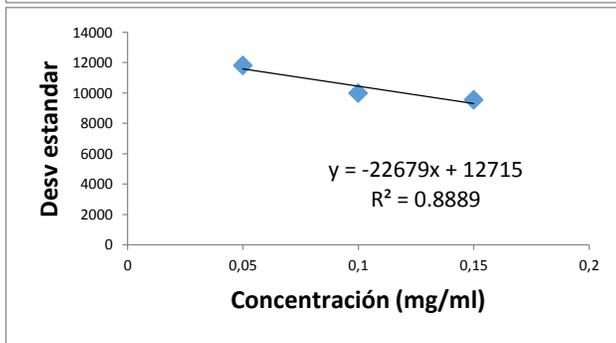
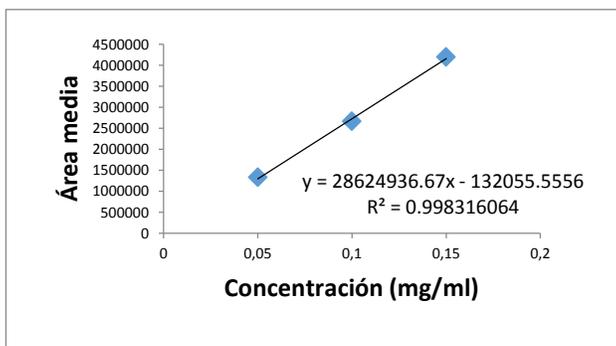


	mg/ml	mg/g
LD(K=3)	0,018	0,35
LC (K=10)	0,019	0,38

## Glucosa

Método basado en la extrapolación de la recta de calibrado a concentración cero.

Conc (mg/ml)	Area			Area Media	STDEV
0,05	1324229	1328628	1346530	1333129	11812,1929
0,1	2653347	2673169	2661172	2662562,667	9983,906366
0,15	4200425	4184631	4201812	4195622,667	9544,291191

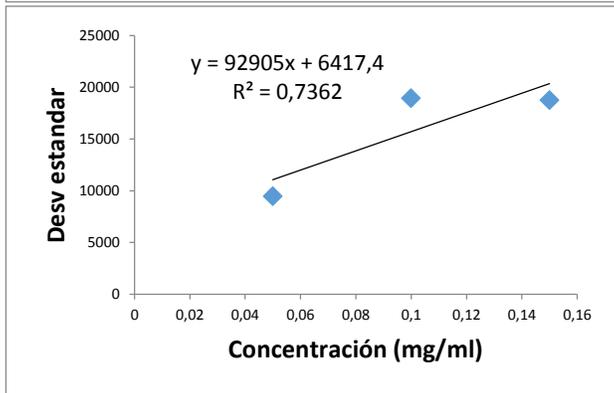
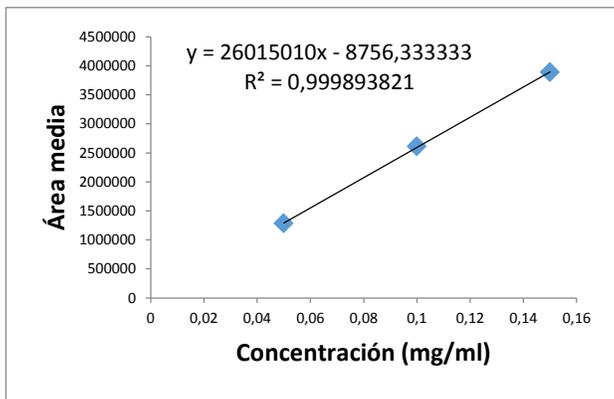


	mg/ml	mg/g
LD(K=3)	0,003	0,07
LC (K=10)	0,005	0,10

## Fructosa

Método basado en la extrapolación de la recta de calibrado a concentración cero

Conc (mg/ml)	Area			Area Media	STDEV
0,05	1273472	1291141	1288153	1284255,333	9457,39099
0,1	2586756	2622464	2615447	2608222,333	18918,56687
0,15	3868848	3882503	3905918	3885756,333	18747,91611



	mg/ml	mg/g
LD(K=3)	0.001	0.01
LC (K=10)	0.002	0.03