

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
ESCUELA DE QUÍMICA

Estudio de los componentes químicos de los desechos de corteza de
Bactris gasipaes

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN PRESENTADO A LA ESCUELA
DE QUÍMICA COMO REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA QUÍMICA

Bach. Anthony Monge Ortega


CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO
SAN JOSÉ, COSTA RICA

2016

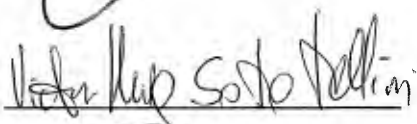
Este Proyecto de Graduación ha sido aceptado en su forma presente por la Escuela de Química en la Universidad de Costa Rica, como requisito para optar al grado de:

LICENCIATURA EN QUIMICA

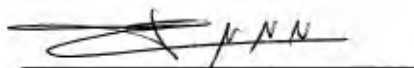
Aprobado por:




Director Escuela de Química
Ph.D. Christian Campos Fernández




Miembro Tribunal Evaluador
Ph.D. Víctor Hugo Soto Tellini



Director del Trabajo Final de Graduación
Ph.D. Renato Murillo Masís



Asesora del Trabajo Final de Graduación
Ph.D. Mirtha Navarro Hoyos



Asesora del Trabajo Final de Graduación
MSc. Rebeca Arguedas Rodríguez

Reconocimientos

A todas aquellas personas que colaboraron en hacer posible esta investigación, que aportaron tiempo, conocimientos, recursos. Un agradecimiento especial a quienes con paciencia y perseverancia me dirigieron hasta la culminación de este trabajo final de graduación.

Índice

Hoja de aprobación.....	ii
Reconocimientos.....	iii
Resumen.....	v
Antecedentes.....	1
Fertilización y nutrientes.....	3
Métodos usados para el análisis de nutrientes.....	8
Planteamiento del problema.....	11
Objetivo principal.....	12
Objetivos específicos.....	12
Metodología.....	15
Resultados.....	23
Discusión.....	42
Conclusiones.....	50
Bibliografía.....	53

Resumen

Durante el proceso de obtención industrial de los corazones de palmito se obtienen grandes cantidades de corteza que se eliminan como desecho. Se ha observado que al aplicar estos desechos frescos directamente (o un extracto acuoso) como abono en dicho cultivo, se obtiene un crecimiento más eficiente.

Además, se ha implementado mezclar esta corteza con excrementos de ganado (en conjunto denominado *bokashi*), esta mezcla se fermenta a los pocos días y al aplicarla como fertilizante, el efecto sobre el crecimiento es menor al observado cuando se usa solo la corteza.

No obstante, luego de almacenado, bajo condiciones secas y de haber perdido el olor a fermento, el bokashi se aplicó y su efecto sobre el crecimiento de la planta fue similar al de la corteza fresca.

El efecto que produce la corteza sobre el crecimiento de la planta puede deberse a varias razones:

1. La corteza produce hormonas de crecimiento vegetal o ciertos péptidos que inducen el crecimiento de la planta, y se descomponen al dejarlos a temperatura ambiente;
2. La corteza produce gran cantidad de nutrientes que son reabsorbidos por la planta, los cuales se pierden si no se aplica inmediatamente.
3. Los productos de fermentación de la biomasa inhiben el crecimiento de la planta.

De acuerdo a la literatura consultada, no se han reportado metabolitos secundarios para la corteza de la *Bactris gasipaes* ni tampoco de plantas de la familia Arecaceae.

En este estudio se caracterizaron los desechos de corteza y bokashi, para determinar las diferencias y la posible razón de por qué el producto fermentado pierde la actividad de inducción del crecimiento de la planta. Para esto se obtuvieron extractos de ambos y se analizaran mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas, como la resonancia magnética nuclear. Además se hará un perfil de los nutrientes presentes en el extracto fresco y el fermentado.

Antecedentes

Bactris gasipaes (Arecaceae) es una cespitosa de tallos múltiples con tamaños que oscilan entre los 6-20 metros de altura. Sus tallos son cilíndricos, rectos, sin ramificaciones y poseen entrenudos cubiertos con espinas que se alternan con porciones sin ellas. [1]

Se desarrolla muy bien en el sistema agrario de las zonas tropicales donde los suelos son ácidos y pobres en nutrientes. [2]

Los frutos son drupas con forma ovoide, que alcanzan hasta los 7 cm de longitud, su epicarpio es duro y delgado con una coloración que varía entre rojo y amarillo, por otra parte el mesocarpio tiene una consistencia harinosa. La planta (Figura 1) los produce en racimos que pueden alcanzar entre 200-400 frutos. [3]

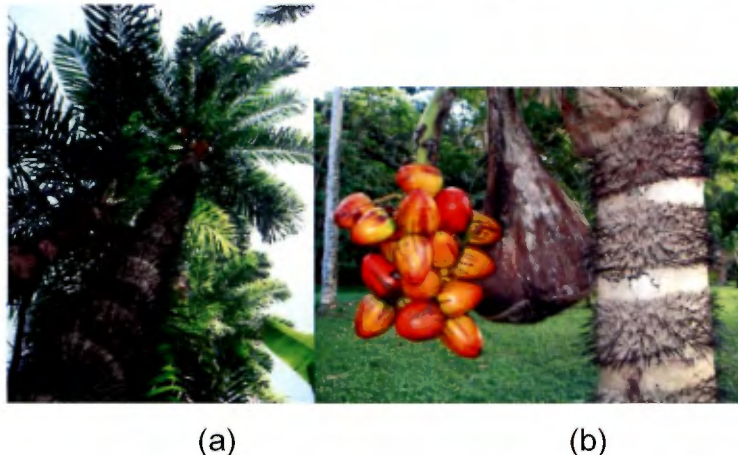


Figura 1. (a) *Bactris gasipaes*, (b) Frutos y tallo

Bactris gasipaes es la palma más domesticada en la zona del neotrópico; existen tanto poblaciones salvajes como domesticadas, abarcando un área extensa de América: desde el sur de Honduras hasta la zona media de Brasil. [4] Es conocida en Costa Rica como pejibaye pero tiene distintos nombres según la región, por ejemplo en Colombia se le denomina chontaduro, en Brasil pupuhna y pijigao en Venezuela, para nombrar algunos de ellos. [1]

El estudio realizado por Hernández *et al* evidencia la existencia de 3 diferentes grupos de poblaciones domesticadas y salvajes, cuya distribución y evolución están estrechamente relacionadas por la geología e historia climática de la cuenca amazónica, la elevación de los Andes y el surgimiento de Centroamérica. Además,

la diversidad genética que se reportó hace suponer que el proceso de domesticación de esta palma se llevó de manera independiente en esas 3 regiones (la parte occidental de los Andes extendiéndose inclusive hasta Centroamérica, la Amazonia superior y la región este de la Amazonia). [4]

El grado de domesticación se puede observar a través del fruto en características como el tamaño, color, contenido de almidón y forma. [5] Además, mediante este proceso de domesticación se han logrado obtener variedades en las cuales la cantidad de espinas en el tallo, comparadas contra las poblaciones salvajes, es mucho menor. Este hecho facilita el proceso de producción y recolección del palmito, sin embargo no se relaciona con una mayor producción. Esta característica sigue siendo dependiente del genotipo y condiciones ambientales en que se desarrolla la planta. [6]

Dos partes de esta planta tienen utilidad comercial actualmente: el meristemo apical (denominado palmito) y los frutos. En el caso del palmito (o corazones de palmito) la agroindustria ha crecido de manera acelerada al pasar del tiempo en la zona tropical de América, a tal punto que Costa Rica para el año 1997 contaba con 10 000 hectáreas (ha) de producción, seguida de Brasil con 6 000 ha y en menor grado otros países de la zona. [6]

Según la literatura consultada no existen muchos estudios sobre metabolitos secundarios en los diferentes órganos de *B. gasipaes* e inclusive de la familia Arecaceae; Bereau, D. *et al* reporta en el caso de las semillas el perfil de ácidos grasos, mostrando la presencia de ácido láurico (60,6%), mirístico (18,9%), oleico (12,9%) y palmítico (6,00 %) en el extracto obtenido. Además realizaron un perfil de esteroides que indicó la mayor presencia de sitosterol (0,15%) y en menor grado la presencia de campesterol, estigmasterol y fucosterol. También encontraron alcoholes triterpénicos en el endocarpio del fruto, en este caso específicamente cicloartenol (65,3%) y 24-Metilencicloartanol (34,7%). El alfa tocotrienol es predominante en el aceite de la semilla. [7] Monge, R. y Campos, H. indican la presencia de delta y gamma tocoferol en el fruto. [8]

Rojas, C. *et al* reporta el contenido de carotenoides presentes en el fruto fresco de *B. gasipaes*, en este estudio encontraron la presencia de 13-*cis* beta caroteno,

trans alfa caroteno, *trans* beta caroteno, 9-*cis* beta caroteno, *trans* delta caroteno, *trans* gamma caroteno, *cis* gamma caroteno 2 y 9-*cis* licopeno. [9] Todos estos compuestos mencionados no representan metabolitos secundarios particulares de la familia *Arecaceae* y se encuentran presentes en gran cantidad de familias botánicas.

Fertilización y nutrientes

Se han estudiado distintos modelos de fertilización con el propósito de mejorar el rendimiento en la producción de palmito y a pesar de que este es mejor en suelos ricos en nutrientes, con buen drenaje y un contenido elevado de materia orgánica, las plantas se han adaptado muy bien a condiciones menos favorables. Diferentes experimentos han mostrado que el aporte de nitrógeno tiene un efecto positivo tanto en la producción de palmito como la de frutos (para el cual existe una relación lineal). [10]

En el caso de otros elementos como con el fósforo, los resultados han sido distintos; con su aporte no se ha evidenciado una mejora en el crecimiento, sin embargo, se ha propiciado un aumento ligero en la cantidad tallos secundarios que produce la planta, que a través de una poda selectiva o tratamientos hormonales podrían llevar a un mayor rendimiento a largo plazo. Además, en etapas tempranas del desarrollo de la planta el fósforo si ocasiona una mejoría en la supervivencia de las mismas. [11]

Chaimsonh *et al* encontraron que existen diferencias importantes en la raíz de *B. gasipaes* cuando se somete a fertilización de tipo orgánica, químico-orgánica, y solamente química. Los resultados mostraron un mejor desarrollo con la aplicación de fertilizante orgánico, y sugieren que la presencia de nitrógeno y potasio estimulan en mayor medida ese desarrollo. También se menciona que otros componentes, aparte de los minerales, como el ácido húmico y sustancias relacionadas (que promueven el crecimiento de las raíces en otras especies como el maíz) podrían tener el mismo efecto en el pejibaye. Finalmente proponen que

un sistema de raíces sano y desarrollado podría traducirse a largo plazo en una mayor producción. [12]

El manejo integral de las plantaciones de palmito ha llevado a utilizar los residuos del mismo como fuente de nutrientes; Boniche *et al* reporta la cantidad inicial de nutrientes (los residuos comprenden tallos, pecíolos, hojas y raquis) en el siguiente orden $K > N > P > Ca > Mg$. Los autores mencionan que la relación C/N afecta la velocidad de liberación de los nutrientes y entre más alto sea dicho valor, la velocidad disminuirá; de hecho observaron que se lleva una descomposición más rápida en residuos de hojas y raquis, que en tallos y pecíolos. En cuanto a la liberación de los nutrientes de la planta completa como un todo, el orden fue $K > Mg > P > N > Ca$; y estos nutrientes liberados pueden comprender un aporte del 64-85% del necesario para el desarrollo óptimo de las plantas, sin embargo es necesario tomar en cuenta que existirán distintos procesos que disminuirán su disponibilidad y por lo tanto será necesario el aporte de fertilizantes químicos. [13]

Cuando se habla de nutrientes en plantas todos aquellos cuyos requerimientos sean mayores a 500 mg/kg se denominan macronutrientes, dentro de este grupo se encuentran el nitrógeno (N), Fósforo (P), Potasio (K), Calcio (Ca), Magnesio (Mg) y Azufre (S). Es de suma importancia un manejo adecuado en el momento de aplicar fertilizantes para obtener un mayor rendimiento y a la vez salvaguardar el medio ambiente. [14]

El nitrógeno es uno de los más importantes debido a la alta demanda en las plantas, puede ser absorbido en forma de nitratos, amonio o urea; sin embargo en las condiciones normales del suelo está predominantemente en forma de nitratos. Su disponibilidad natural en suelos depende en gran medida de microorganismos especializados que se encargan de la fijación de nitrógeno en compuestos orgánicos, que posteriormente son mineralizados en formas disponibles para las plantas. [14]

Una práctica muy común hoy en día, consiste en la reutilización de los mismos desechos del cultivo mezclados con otros productos para la fertilización, sin embargo hay que tener un control estricto, ya que el contenido de nitrógeno dependerá de su origen y lo que se le añada. Es importante mencionar que para

asegurar la disponibilidad el fertilizante utilizado debe tener una relación C:N menor a 20, por que al llegar a valores cercanos al 30 ocurre una inmovilización del nitrógeno por parte de los microorganismos. Además al aplicar el fertilizante hay que tomar en cuenta las pérdidas por procesos como el lavado, volatilización, desnitrificación o hidrólisis de la urea. [14]

La asimilación del nitrógeno está íntimamente ligada con el metabolismo normal de las plantas. A través de distintos procesos se fijan compuestos de suma importancia como los ácidos nucleicos y nucleótidos que conforman el ADN y ARN, aminoácidos que son producidos siguiendo las instrucciones del código genético, y hasta la clorofila, responsable parte del sistema de producción energética de la planta. [15]

Por su parte el fósforo posee funciones relevantes en las plantas, por ejemplo el almacenamiento y la transferencia de energía. De manera natural se presenta como residuos de algunos minerales, principalmente de dos formas: apatita (Fosfato de Calcio) o Sulfatos de Aluminio/Hierro; la forma predominante dependen del grado de irrigación al que estén sometidos los suelos, siendo menor para la apatita. Una vez disuelto se puede presentar en dos formas aniónicas dependiendo del pH del suelo, H_2PO_4^- o HPO_4^- . La concentración de fosforo normalmente ronda 0.01-1.00 mg/L. [14]

El P es un componente importante de las estructuras macromoleculares, especialmente de los ácidos nucleicos que forman parte de ARN y ADN, encargados de llevar y traducir la información genética; en ambos el fosfato une las subunidades de ribonucleósidos que conforman estas macromoléculas.

Además es parte de los fosfolípidos que conforman las membranas celulares, en una estructura tipo "puente" uniendo un diglicérido con otra molécula. Su función depende en gran medida de la dualidad que presenta, al poseer una fracción lipofílica y otra hidrofílica; modificando así las interacciones que puedan darse entre la membrana y su entorno. [15]

En cuanto a la transferencia de energía, los ésteres de fosfatos poseen un papel trascendental debido a que son intermediarios de vías metabólicas de biosíntesis y degradación. Se producen a través de procesos como la glicólisis, la respiración

aeróbica y la fotosíntesis, dando como resultado la síntesis de Adenosín trifosfato (ATP). [15]

De igual manera el potasio está presente naturalmente en los suelos, por medio de minerales de los cuales va siendo liberado, al presentarse en forma iónica en disolución su contenido en suelo está sujeto a la cantidad de agua recibida, variando de 2,5% en zonas áridas a cerca de cero en la zona tropical. Las plantas lo necesitan aún más que al nitrógeno, de tal modo que existen especies que llegan a contenerlo en sus tejidos hasta un 5%. [14]

El potasio es capaz de activar o estimular un gran número de enzimas a través de un cambio conformacional, producto del cambio que genera en el entorno de estas macromoléculas. Al suprimir el efecto de las capas de hidratación ocasiona un incremento en la velocidad de reacción e inclusive puede mejorar la afinidad del sustrato. [15]

Además se ha demostrado que es necesario para el proceso de síntesis de proteínas, sin embargo la concentración necesaria para esta actividad es mayor que la de la activación enzimática. Las vías por las que actúa no están claras, pero se cree que está involucrado en los procesos de traducción como el enlace de ARN de transferencia en los ribosomas. [15]

También está implicado en el proceso de fotosíntesis al facilitar la fijación de CO_2 . Dentro de este proceso se sabe que el K es comúnmente el par iónico de flujo H^+ inducido por la luz, necesario para establecer el gradiente de pH trans membrana en la síntesis de ATP. [15]

En el caso del Calcio proviene también de minerales y su concentración puede variar mucho dependiendo del pH del suelo, por lo general es necesario un proceso de intercambio para su correcta asimilación debido a que en disolución su concentración es baja. Esto último es una ventaja en el proceso de fertilización por que la pérdida de calcio va estar asociada directamente a la toma que hacen las plantas, puesto que es un nutriente que no está sujeto a la pérdida por volatilización y su mayor afinidad con los sitios de intercambio en los minerales del suelo disminuyen el lavado que pueda producir la lluvia. [14]

Debido a su capacidad de coordinación, el Calcio tiene funciones estructurales o actúa como un agente regulador en las macromoléculas. Una gran porción del contenido de Ca en los tejidos vegetales se localiza en la pared celular en sitios de intercambio, su importancia se debe a que inhibe una proteína que degrada componentes de la pared celular. Además estabiliza las membranas celulares al coordinar entre los fosfatos y los grupos carboxilo de los fosfolípidos. [15]

El Ca está involucrado en la osmoregulación porque actúa como segundo mensajero, esto sucede en respuesta a un cambio de concentración en el citosol que es necesario para traducir una señal. Esta actividad se debe a la baja concentración citosólica de Ca^{2+} libre y la capacidad que tiene de alterar la estructura de proteínas cuando se coordina. [15]

El comportamiento del Magnesio es similar al Calcio, presentando la misma dependencia de la concentración con respecto al pH y disponible en mayor medida por intercambio, sin embargo presenta una menor afinidad a los sitios de intercambio lo que ocasiona una menor concentración con respecto al Calcio y en cierto grado es más susceptible al lavado. [14]

El Mg es el átomo central de la molécula de clorofila que forma parte de la maquinaria de la planta para producir energía, de allí su importancia. Además está implicado en la respiración y multiplicación celular, además de otros procesos como la producción de proteínas y grasas. [15]

El Azufre está involucrado en procesos muy similares a los del nitrógeno, comienza con la descomposición hacia formas reducidas (Sulfitos) que posteriormente son oxidados a Sulfato, este último está sujeto a reducción, fijación en arcillas, inmovilización, precipitación, intercambio, lavado y asimilación en las plantas. La principal forma en que la planta incorpora el Azufre en su sistema es a través de los Sulfatos. [14]

Una vez asimilado, la planta metaboliza el S en compuestos como los aminoácidos cisteína y metionina, que son incorporados en proteínas o precursores de coenzimas y metabolitos secundarios de las plantas. También se da la síntesis de glutatión el cual es un buen agente antioxidante; principalmente juega un papel importante en los cloroplastos neutralizando los radicales de

oxígeno y el peróxido de hidrógeno. Además el glutatión es precursor de las fitoquelatinas, un grupo de proteínas capaces de enlazar metales pesados. También forma parte de coenzimas y grupos prostéticos como la ferredoxina, biotina y el pirofosfato de tiamina. [15]

Para cuantificar los nutrientes, poder resolver posibles deficiencias de los mismos y garantizar un rendimiento adecuado en los cultivos, existen diversas técnicas instrumentales que se basan en diferentes principios dependiendo de cuál es el analito de interés. En la siguiente sección se explican algunos conceptos básicos de las técnicas empleadas que son fundamentales en la línea de investigación actual.

Métodos usados para el análisis de nutrientes

Para la determinación de la composición elemental de una muestra se cuenta con la Espectroscopía Atómica. El principio básico de funcionamiento radica en la aplicación de la ley de Beer-Lambert al medir longitudes de onda específicas; dependiendo del origen de dicha radiación es que esta técnica se subdivide en Espectroscopía de Emisión Atómica (EA), Espectroscopía de Absorción Atómica (AA) y la de Fluorescencia Atómica (FA). [16]

En la fase inicial la muestra, en disolución, debe ser atomizada en un proceso denominado nebulización y posteriormente llevada hasta un quemador con las condiciones adecuadas (relación combustible-comburente). Es aquí donde se diferencian la EA y AA, porque en la absorción atómica de llama se hace uso de los diferentes estados energéticos que posee cada elemento para excitarlos con la longitud de onda correcta (que corresponde a la diferencia entre dichos niveles) al aplicar una cantidad determinada de energía externa, la pérdida de intensidad por absorción se correlaciona a la concentración del elemento en cuestión. En cambio la emisión de llama se basa en la liberación de energía producto de la excitación que se da en la llama, es decir no existe una fuente externa; sin embargo las condiciones de la llama que se emplean hacen que esta última solo sea aplicable

a elementos fáciles de excitar (con bajos potenciales de ionización), como los elementos alcalinos (Na, K, Li, Rb, Cs) y alcalinotérreos (Be, Ca, Mg, Sr, Ba). [16] Además, como se mencionó anteriormente, el contenido de nitrógeno del abono aplicado es de suma importancia para *Bactris gasipaes*, en el caso de este estudio ese aporte viene del fertilizante orgánico el cual en gran medida se debe a la cantidad de proteína presente. Existen varias metodologías para su determinación, varias de ellas colorimétricas, es decir al igual que en la espectroscopía atómica obedecen la ley de Beer-Lambert, sin embargo en este caso se habla de absorción molecular y la complejidad instrumental para su determinación es mucho menor.

Uno de los métodos reconocidos para la determinación de proteínas es el Bradford, que consiste en la unión del colorante Comassie Blue G-250 a las proteínas, este colorante existe en dos formas (en medio ácido) una azul y otra roja. Las proteínas se unen al colorante cambiando el máximo de absorción de 465 a 595 nm formando un complejo rápidamente y estable por un tiempo razonable (al menos de una hora). Como interferencias se encuentran buffers alcalinos, 2-mercaptoetanol, sacarosa, glicerol, EDTA y detergentes. [17,18,19,20,21]

Otro método colorimétrico para determinar proteínas es el del ácido bincinconínico BCA, que aprovecha la reacción de Biuret en la que se da la producción de iones Cu^+ , por la reducción que sufre el Cu^{2+} en medio alcalino en presencia de proteínas. Esto unido al empleo del BCA que es altamente sensible y específico para el Cu^+ , formando un complejo púrpura, es lo que permite monitorear el contenido de proteínas. En cuanto a la estabilidad del complejo es necesario un control del tiempo ya que no es tan estable, además en comparación con otras metodologías presenta menos interferencias, entre ellas la presencia de azúcares reductores. [17,18,19,20,21]

Otra técnica analítica que permite saber el contenido de nitrógeno, y de manera indirecta la proteína a través de una fórmula empírica, es el empleo de un analizador elemental. Este sistema opera bajo el principio de Dumas en el cual la muestra es calentada alrededor de 1000 C° en atmósfera de oxígeno, para

convertir el nitrógeno de los compuestos en óxido de nitrógeno; después de algunos pasos que aseguren la total oxidación y otros de secado/limpieza del gas de arrastre, todos los óxidos son dirigidos a un catalizador en donde se reducen a nitrógeno molecular (se emplea como agente reductor cobre o tungsteno), finalmente la detección se lleva a cabo en una celda de conductividad (TCD). En caso de emplearla para determinar el contenido de proteína hay que tener claro que en matrices muy complejas no podrá discernir entre el nitrógeno proveniente de otros compuestos orgánicos distintos a los aminoácidos de las proteínas, por lo tanto podrían existir resultados mayores a los esperados. [22,23]

Al ser los carbohidratos una pieza fundamental en los procesos biológicos de la planta es de esperar su presencia en cualquier residuo de las mismas, por esta razón se emplea una técnica que permita cuantificar su contenido. Entre las diferentes metodologías existentes se encuentra el método del Fenol-Sulfúrico desarrollado por Dubois en 1956. Su principio se basa en el proceso de deshidratación de los carbohidratos que se da en un medio fuertemente ácido, produciéndose furfurales que se condensan al reaccionar con el fenol. Esos compuestos poseen un color naranja-amarillo que es medido por un espectrofotómetro UV-visible.

En el caso de necesitar conocer la estructura de algún metabolito se debe emplear la Resonancia Magnética Nuclear, cuyo principio se basa en núcleos magnéticamente activos (poseen espín), que al ser cargas positivas en rotación generan un campo magnético. En ausencia de un campo magnético externo, los espines nucleares se orientan al azar, sin embargo al aplicarles un campo magnético, los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo (en un estado denominado α de menor energía) mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en la dirección contraria (estado β). [24]

Normalmente existen más núcleos en el estado de baja energía y dependiendo de la fuerza del campo magnético aplicado la brecha energética entre ambos se puede aumentar. Es entonces cuando la muestra que está sometida al campo magnético también es irradiada por un pulso intenso y breve, lo que ocasiona un cambio de espín; en un proceso denominado relajación los núcleos emiten

señales cuya frecuencia depende de la diferencia energética entre los estados de espín para liberar la energía absorbida. Lo que se obtiene es entonces una gráfica de frecuencias frente a intensidad que denominados espectro RMN, dependiendo del átomo monitoreado así será el espectro, por ejemplo para el espectro protónico se denominaría ^1H -RMN y en el caso del Carbono sería ^{13}C -RMN. [24]

También existen experimentos con condiciones específicas que permiten obtener espectros de dos dimensiones, lo que se traduce en observar relaciones homonucleares o heteronucleares. En el caso de los heteronucleares permitirán seguir la secuencia de enlaces en compuestos orgánicos, el más comúnmente usado se da del acoplamiento H^1 con C^{13} . De allí nace el experimento de Espectroscopía de Correlación Heteronuclear de un único Cuanto (por sus siglas en inglés HSQC) el cual muestra la interacción Carbono-Hidrogeno a un enlace de distancia, por otra parte también existe la Espectroscopía de Correlación Heteronuclear de Múltiples Enlaces (HMBC) que permite observar interacciones hasta 3 enlaces de distancia entre núcleos. Así dependiendo de la configuración del experimento existen otras variantes que aportan distinta información de la estructura de un compuesto. [24]

Planteamiento del problema:

De acuerdo a conversaciones con agricultores encargados del cultivo de palmito en Costa Rica, la práctica habitual es utilizar la corteza de palmito fresca como fertilizante orgánico para el mismo cultivo. Sin embargo, se intentó mezclar esta corteza con excrementos de ganado (bokashi) para que fuera utilizado como fertilizante; esta mezcla se fermentó a los pocos días (favorecido por las condiciones climáticas de la región tropical húmeda) y al ser utilizada en estas condiciones, el efecto sobre el crecimiento presentado por la corteza fresca no pudo ser reproducido y no se obtuvo un aumento tan favorable en el crecimiento. Sin embargo, luego de almacenado el bokashi bajo condiciones secas y de haber perdido el olor a fermento, su efecto sobre el crecimiento de la planta fue similar al de la corteza fresca.

Objetivo principal

- Determinar cuáles son los componentes que causan el crecimiento vegetal acelerado al utilizar los desechos frescos del procesamiento del palmito (corteza) y cuáles son los componentes que inhiben el crecimiento en los desechos fermentados (bokashi) –o que están ausentes en los desechos frescos-.

Objetivos específicos

- Llevar a cabo un estudio del perfil de los compuestos que contiene la corteza de palmito fresca y el desecho fermentado (incluyendo todos los tipos de nutrientes).
- Encontrar las diferencias en contenido de sustancias entre la corteza de palmito fresca y el desecho fermentado.
- Aislar los metabolitos o compuestos que puedan estar relacionados con el mayor crecimiento vegetal y aquellos que puedan estar relacionados con la inhibición del crecimiento en el caso de los desechos fermentados.

Metodología

Reactivos

Agua	Acetona
Etanol 96%	Ácido Sulfúrico
Acetato de Etilo 99,99%	Fenol
Agua deuterada	Estándar de Glucosa
Kit Bradford	Estándares 1000 mg/L Ca, K, Mg
Ácido aspártico	Azul de Coomassie G-250
Ácido Fosfórico	Albúmina de suero bovina (BSA)
Anhídrido acetic	4-dimetilaminopiridina
Bicarbonato de Sodio	MTBE
Metanol	Permanganto de potasio
Kit BCA	Membrana YSI

Equipo

Rotavapor Heidolph Laborota Control 20
Liofilizador Christ 1-16 LSC
Ultra Low Temperature Freezer New Brunswick Scientific
Beaker 3500 mL
Embudo de filtración
Rapid N Cube Elementar Analysysteme GmbH
Synergy H1 Microplate Reader BioTek
Lambda 35 UV/VIS Spectrometer Perkin Elmer
Analizador Bioquímico YSI
AAAnalyst 800 Atomic Absorption Spectrometer Perkin Elmer

Lambda 35 UV/VIS Spectrometer Perkin Elmer
Spectrum One FT-IR Spectrometer Perkin Elmer
Columna MXT Wax 30 m
Balanza Analítica
Espectrómetro de resonancia magnética nuclear Bruker 600

Procedimientos

Determinación de la densidad aparente de la corteza

1. Se pesó por triplicado en Beakers de 3500 mL diferentes cantidades de corteza.
2. De manera manual se compactó el material hasta alcanzar un volumen determinado.

Determinación de la densidad real de la corteza

1. Se pesó en una probeta de 500 mL una cantidad de corteza que no sobrepasara ese volumen.
2. Se adicionó mediante una bureta Etanol al 96%, hasta alcanzar la marca de aforo de 500 mL.
3. Se determinó la diferencia de masas correspondiente a la de Etanol agregado. El volumen ocupado por la corteza se determinó como la diferencia entre 500 mL de la probeta y el valor del etanol.

Obtención de extractos acuosos

1. Se pesó las muestras de corteza y de bokashi como se muestra en el cuadro I.
2. A cada una de las muestras se le agregó 14 y 21 L de agua de osmosis respectivamente, se mantuvieron a temperatura ambiente durante 2 horas.
3. Las mezclas obtenidas se filtraron y el líquido obtenido se almacenó a 4°C.
4. Finalmente los extractos obtenidos se congelaron a -20°C durante 1 día y se liofilizaron durante un período de 4 días hasta la obtención de las muestras sólidas requeridas para los análisis por resonancia magnética nuclear ^1H .

Obtención de extractos con disolventes

1. Los residuos sólidos de corteza y de bokashi obtenidos del proceso de filtración del punto anterior se mezclaron con 7 y 10 L de etanol al 96% respectivamente, se mantuvieron a temperatura ambiente durante dos días.
2. Las mezclas anteriores se filtraron y el líquido obtenido se concentró con un rotavapor a una presión de 200 mmHg y temperatura de 40 °C, hasta obtener un líquido acuoso concentrado de color amarillo paja en el caso de la corteza y café para el bokashi.
3. Los residuos sólidos obtenidos de cada muestra se mezclaron con 4 y 8 L de acetato de etilo respectivamente, se mantuvo a temperatura ambiente durante dos días.
4. Las mezclas obtenidas se filtraron y el líquido obtenido se concentró con un rotavapor (100mmHg y una temperatura de 40 °C hasta obtener un líquido acuoso concentrado de color amarillo paja en el caso de la corteza y café para el bokashi.

5. Finalmente los extractos obtenidos se congelaron a -20°C durante 1 día y se liofilizaron durante un periodo de 4 días hasta la obtención de las muestras sólidas requeridas para los análisis por resonancia magnética nuclear ^1H .

Análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los análisis de RMN de las muestras se realizaron en el Centro de investigaciones en Productos Naturales de la UCR.

1. Las muestras acuosas se disolvieron en agua deuterada al 99.9% y se analizaron en el equipo 600 MHz Bruker.
2. Se midieron espectros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, HSQC y HMBC de los extractos correspondientes y compuestos puros.

Determinación del contenido de cenizas en los extractos

1. Se llevaron crisoles a peso constante y luego se determinaron sus masas.
2. Se pesó una cantidad determinada de muestra en cada crisol, de cada uno de los extractos.
3. Se llevaron los crisoles a una mufla a una temperatura de 600°C durante 4 horas.
4. Se enfriaron en un desecador y posteriormente se determinó su peso.

Determinación del nitrógeno total

1. Se utilizó como patrón ácido aspártico, se pesó 0.15 g y se colocó en el Analizador elemental de N Rapid N Cube Elementar Analysysteme GmbH.

2. Se pesó aproximadamente 0.15 g de cada muestra y de igual manera se colocó en el equipo.
3. Se procedió a realizar las lecturas en el equipo.

Determinación del porcentaje de proteína mediante el método Bradford en la corteza de palmito

1. Se pesó 25 mg de azul de Coomassie G-250 y se disolvió en 25 mL de etanol al 95% para preparar el reactivo de Bradford.
2. Se agitó durante 10 minutos y luego se filtró con papel Whatman n°1.
3. Al filtrado se le agregó 25 mL de ácido fosfórico concentrado y se llevó a 50 mL en un balón aforado.
4. Se tomó una alícuota de 25 mL de reactivo Bradford y se le agregó 100 mL de agua destilada.
5. Se empleó como estándar una disolución de BSA (Albúmina de suero bovina) con una concentración de 1 mg/mL. Se preparó una curva de calibración a partir del estándar anterior como se muestra a continuación.

Concentración Estándar (mg/mL)	Cantidad de BSA 1 mg/mL (µL)	Agua destilada (µL)	Reactivo Bradford (mL)
Blanco	0	50	1,5
0.1	5	45	1,5
0.2	10	40	1,5
0.3	15	35	1,5
0.4	20	30	1,5
0.5	25	25	1,5
0.6	30	20	1,5
0.7	35	15	1,5

6. Se preparó por triplicado disoluciones del extracto acuoso de la corteza de aproximadamente 2 mg/mL.

- Utilizando cubetas de plástico se procedió a realizar la medición de las muestras a una longitud de onda de 590 nm en un equipo Lambda 35 UV/VIS Spectrometer.

Determinación del porcentaje de proteína mediante el método del ácido bincinconínico (BCA) en la corteza de palmito

- Se preparó por triplicado disoluciones del extracto acuoso de la corteza de aproximadamente 5 mg/mL
- Se empleó como estándar una disolución de BSA con una concentración de 1 mg/mL. Se preparó una curva de calibración a partir del estándar anterior como se muestra a continuación.

Concentración Estándar (mg/mL)	Cantidad de estándar BSA 1mg/mL (µL)	Agua milliQ (µL)
Blanco	0	100
0.2	20	80
0.4	40	60
0.6	60	40
0.8	80	20
1.0	100	0

- Se preparó la disolución de trabajo de BCA mezclando 8 mL de disolución de ácido bincinconínico con 0.160 mL de una disolución de sulfato de cobre pentahidratado al 4%.
- En una placa del lector de microplacas Synergy H1 BioTek, se colocó en cada pozo 160 µL de la disolución de trabajo de BCA y 20 µL del blanco, las muestras y los estándares.
- Se incubó las muestras a 37 °C por 30 minutos y posteriormente se realizó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 562 nm.

Determinación de Glucosa en los extractos acuosos mediante analizador Bioquímico YSI (que significa YSI?)

1. Se prepararon las muestras aproximadamente a 1 g/60 mL, y se realizaron las diluciones pertinentes para lograr quedar a una concentración dentro de la curva de calibración.
2. Se preparó e instaló las disoluciones buffer y de calibración del Analizador Bioquímico YSI.
3. Se instaló una membrana adecuada, en este caso la específica para analizar glucosa.
4. Se encendió el equipo y establecieron los parámetros generales y de medición.
5. Se comprobó el correcto funcionamiento a través de las mediciones de línea base y máximo.
6. Una vez realizado se procedió a la lectura de las muestras y los patrones.

Determinación del infrarrojo del extracto acuoso de Bokashi

1. Se colocó el extracto acuoso liofilizado del bokashi en la celda HATR de un Infrarrojo Spectrum One FT-IR y se procedió a realizar la medición en el intervalo 4000 cm^{-1} a 650 cm^{-1} ; el extracto se coloca directamente en la celda de SeZn y se cubre con el cobertor metálico, luego se compacta con el tornillo sin sobrepasar el medidor de presión.

Determinación del contenido de proteína por precipitación

1. Se pesó una cantidad determinada de los extractos acuosos del bokashi y corteza.

2. Se disolvió en 60 mL de agua desionizada y se tomó una alícuota de 20 mL.
3. A esa alícuota se le añadieron 20 mL de acetona fría y se mantuvo en refrigeración a -20° C durante 3 días.
4. Se extrajo la mayor cantidad del líquido supernatante y el resto se colocó en eppendorf para centrifugar.
5. Se eliminó el líquido y los sólidos se colocaron en el liofilizador durante 3 días.
6. Se determinó la masa precipitada de proteína.

Determinación del contenido de Carbohidratos por el método del Fenol-Sulfúrico en los extractos acuosos de Bokashi y Corteza

1. En tubos de ensayo pequeños limpios y secos se hizo las siguientes disoluciones a partir de una disolución madre de glucosa a 100 mg/L:

Concentración (mg/mL)	Cantidad de estándar Glucosa 100mg/L (mL)	Agua MilliQ (mL)
Blanco	0.00	2.00
10	0.20	1.80
25	0.50	1.50
45	0.90	1.10
65	1.30	0.70
85	1.70	0.30
100	2.00	0.00

2. Se Tomó 1 mL de cada una de las disoluciones anteriores, y se agregó 0.60 mL de una disolución de fenol al 5% y se mezcló bien.

3. Se Adicionó 3.6 mL de ácido sulfúrico concentrado, se mezcló bien y dejó enfriar a temperatura ambiente.
4. Se preparó la muestra de tal forma que tenga una concentración de carbohidratos entre 10-100mg/L.
5. Por triplicado se realizó en la muestra el mismo procedimiento descrito para la preparación de la curva de calibración.
6. Se determinó la absorbancia a 480 nm en un Lambda 35 UV/VIS Spectrometer de las muestras, patrones y blanco. Mediante la curva de calibración se cuantificó la cantidad de carbohidratos presentes en la muestra.

Determinación del contenido de Ca, Mg y K en los extractos acuosos de Bokashi y Corteza por medio de Espectroscopia Atómica

1. Se pesó una cantidad de los extractos acuosos de bokashi y corteza, se disolvió en agua destilada.
2. Se llevó a un balón aforado, y posteriormente se realizó las diluciones necesarias para conseguir una señal dentro del ámbito de trabajo.
3. Se preparó una curva de calibración a partir de madres de 1000 mg/L de cada uno de los elementos de interés (en el caso del Ca y Mg se adicionó una disolución de lantano de tal manera que quedase al 3% en la disolución final) y se optimizó las condiciones de acuerdo a los parámetros mostradas a continuación:

	Potasio (K)	Calcio (Ca)	Magnesio
Modo	Emisión	Emisión	Absorción
Longitud de onda (nm)	766.5	422.7	285.2
Flujo Aire (L/min)	12.0	12.0	11.0
Flujo Acetileno (L/min)	0.90	0.80	1.50

4. Se realizó las mediciones de cada uno de los patrones utilizados para comprobar la linealidad en orden ascendente de concentración.
5. Posteriormente se midió las muestras y se realizó las diluciones necesarias para alcanzar una señal dentro del rango de trabajo.

Determinación de los alcoholes de bajo peso molecular por medio de cromatografía de gases

1. Se tomó, y colocó en bolsas herméticas, muestras tanto de bokashi, como corteza de palmito fresca (para el bokashi muestras de 15 días y 30 días en proceso).
2. Se procedió a inyectar directamente 250 μ L del gas contenido en las bolsas de las muestras en un cromatógrafo de gases equipado con una columna MXT Wax 30 m, 0.53 mm bajo las siguientes condiciones: Temperatura Inyector 150 °C, Temperatura Detector 220 °, Carrier 7psi, Hidrógeno 20 psi, Aire 5 psi, Split cerrado y rampa de temperatura en el horno de 5 minutos a 36 °C, a un gradiente de 16 °C/min hasta llegar a 170 °C, manteniéndose durante 7 minutos a esa temperatura.
3. Se inyectó también un estándar de una mezcla de alcoholes de bajo peso molecular con el fin de determinar el tiempo de retención de cada analito.
4. La identificación procede por comparación directa de los tiempos de retención en muestra y estándar.

Acetilación del extracto acuoso de bokashi, separación e identificación de los principales componentes.

1. Se pesó aproximadamente 1 g del extracto acuoso de bokashi liofilizado en un balón.
2. Se añadió 50 mL de anhídrido acético y una punta de espátula de 4 dimetilamino piridina.

3. Se deja proceder la reacción durante 3 días a agitación constante.
4. Luego de ese periodo se procede a neutralizar con bicarbonato de sodio.
5. Se realiza una extracción con diclorometano, conservando únicamente la fase orgánica en cada extracción.
6. Se evapora todo el disolvente y luego se redisuelve en una pequeña cantidad de diclorometano.
7. Se aplica el extracto en placas cromatográficas y se procede a eluir con una mezcla 80:20 MTBE:Metanol.
8. Se identifican las principales fracciones con una lámpara UV y revelando con KMnO_4 .
9. Se extraen cada una de las diferentes fracciones y concentran para su posterior análisis por RMN; realizando los siguientes experimentos ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, HSQC y HMBC.

Resultados

Determinación de la densidad

Los datos de la determinación de la densidad aparente de la corteza se muestran en el cuadro I. Por otra parte se determinó la densidad real de la corteza (datos mostrados en el cuadro II) la cual es una característica intrínseca del material y no va presentar variación respecto a la forma de embalaje.

Cuadro I. Resultados de la densidad aparente de la muestra de corteza.

	Masa muestra (g)	Volumen alcanzado (mL)	Densidad aparente (g/mL)
BM-14-4-6 Corteza palmito r1	2140,6	3500	0,6116
BM-14-4-6 Corteza palmito r2	2377,0	3500	0,6791
BM-14-4-6 Corteza palmito r3	1533,3	2250	0,6815
		Promedio	0.6574

Cuadro II. Resultados de la densidad real de la muestra de corteza.

Masa corteza (g)	Masa corteza+Etanol llevado a 500 mL (g)	Densidad Etanol (g)	Masa Etanol adicionada (g)	Volumen de Etanol calculado (g)	Volumen de corteza calculado (g)	Densidad real (g/mL)
142,48	435,34	0,8010	292,86	365,62	134,38	1,06

Extracción de las muestras

A cada muestra en estudio se les realizó extracciones con tres tipos de disolventes diferentes: agua, etanol y acetato de etilo, en el cuadro III se pueden observar las masas de partida en cada caso.

Cuadro III. Masas y Volúmenes empleados en las diferentes extracciones realizadas.

Muestra	Masa muestra (kg)	Volumen H2O (L)	Volumen Etanol (L)	Volumen Acetato de Etilo (L)
BM-14-4-5 Bokashi	7,1294	21	10	8
BM-14-4-6 Corteza palmito	6,0509	14	7	4

Determinación del contenido de nitrógeno total

Se determinó el contenido de nitrógeno de ambos extractos acuosos en un analizador elemental de Nitrógeno que utiliza como principio de funcionamiento el método de Dumas. (Véase cuadro IV).

Cuadro IV. Masas empleadas para la determinación del nitrógeno total.

Muestra Extracto	Masa muestra (mg)	N (%)	Proteína (%)
BM-14-4-5 Bokashi r1	153.40	3.027	18.916
BM-14-4-5 Bokashi r2	159.40	4.155	25.971
BM-14-4-6 Corteza palmito r1	184.20	1.176	7.351
BM-14-4-6 Corteza palmito r2	158.30	1.235	7.720

Además el equipo calcula, mediante una fórmula, la cantidad de proteína presente asumiendo que todo el nitrógeno encontrado proviene de proteínas. Por esta razón es necesario emplear un método específico para cuantificar el contenido de proteínas y eliminar el nitrógeno proveniente de otros compuestos orgánicos. En este caso se emplearon los métodos de Bradford y del BCA.

Determinación del porcentaje de proteína mediante el método Bradford en la corteza de palmito

Los resultados obtenidos para la curva de calibración se muestran en el cuadro V, de la figura 2 se deduce la correlación lineal entre la concentración de proteína y la absorbancia obtenida.

Cuadro V. Concentraciones y absorbancias obtenidas para la curva de calibración del método de Bradford.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia
0.10	0.0609
0.20	0.1089
0.30	0.1340
0.40	0.1844
0.70	0.3277

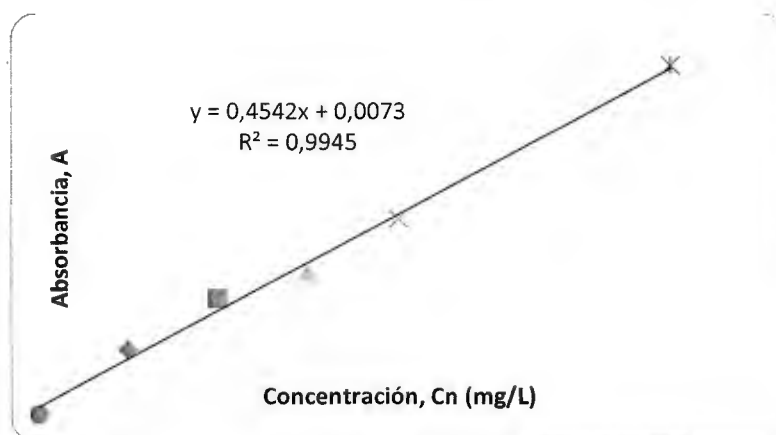


Figura 2. Curva de calibración para la determinación de la cantidad de proteína mediante el método de Bradford.

Mediante este método se obtuvo, a dos niveles de concentración distintos (véase cuadro VI), un porcentaje de proteína aproximadamente similar.

Cuadro VI. Porcentaje de proteína obtenido en la muestra de corteza de palmito a dos niveles de concentración distintos.

Replica	Masa muestra (mg)	Absorbancia	Concentración calculada en disolución (mg/mL)	% Proteína
R1	2.2	0.0158	0.0339	1.54
R2	25.2	0.1672	0.3492	1.38

Determinación del porcentaje de proteína mediante el método BCA en la corteza de palmito

Los resultados de la curva indican una respuesta lineal, entre el contenido de proteína y la absorbancia, en el ambito de trabajo elegido, lo cual permite aplicar el método de manera confiable (véase cuadro VII y figura 3).

Cuadro VII. Concentraciones y absorbancias obtenidas para la curva de calibración del método de Bradford.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia
0.20	0.227
0.40	0.485
0.60	0.646
0.80	0.849
1.00	1.087

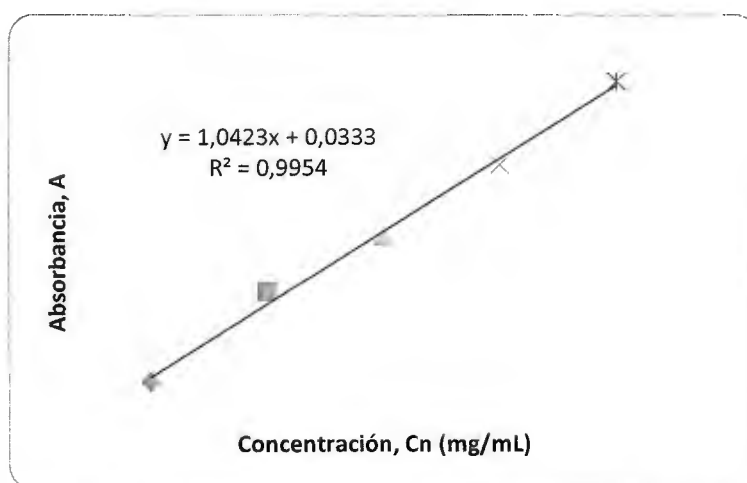


Figura 3. Curva de calibración para la determinación de la cantidad de proteína mediante el método de BCA.

En este caso la preparación inicial de las muestras a una concentración de aproximadamente 5 mg/mL llevó a obtener absorbancias mayores al estándar más alto de proteína, por lo cual fue necesario realizar una dilución para hacer la cuantificación (Véase en el cuadro VIII).

Cuadro VIII. Porcentaje de proteína obtenido en la muestra de corteza de palmito a dos niveles de concentración distintos.

Replica	Masa muestra (mg)	Dilución	Absorbancia	Concentración calculada en disolución (mg/mL)	% Proteína
R1	4,9	300 μ L/1000 μ L	1.021	0.9473	64.44
R2	5,1		1.057	0.9818	64.17
R3	5,2		1.038	0.9636	61.77

Los resultados obtenidos hacen presumir la presencia de interferencias en este método por este motivo se decidió utilizar otra metodología para determinar el contenido total de proteína, en este caso fue precipitación total de las proteínas con disolventes.

Determinación del contenido de proteína por precipitación

Debido a que anteriormente los resultados de porcentaje de proteína no dieron un resultado concluyente se decidió determinar el contenido de proteína de ambos extractos acuosos mediante el método de precipitación. Los resultados mostrados en el cuadro IX indican que utilizando esta metodología también existen interferencias.

Cuadro IX. Determinación del contenido de proteína por precipitación con disolventes.

	Masa erlenmeyer (g)	Masa erlenmeyer+ muestra (g)	Masa muestra (g)	Volumen final (mL)	Alícuota (mL)	Volumen acetona (mL)	Masa eppendorf (mg)	Masa eppendorf+ muestra (mg)	Masa proteína (mg)	% m/m proteína
Bokashi	30,404	31,5317	1,1277	60	20	20	1090,3	1265,1	174,8	46,50
Corteza	30,3315	30,8567	0,5252				1091,7	1114,4	22,7	12,97

Determinación de Glucosa en los extractos acuosos mediante analizador Bioquímico YSI

Se procedió a cuantificar la glucosa mediante un Analizador Bioquímico YSI. Los resultados se muestran en el cuadro X.

Cuadro X. Contenido de glucosa en los extractos acuosos mediante analizador bioquímico YSI.

Muestra	Masa muestra (g)	Volumen final (mL)	Lectura Concentrado	Lectura dilución (1:2)	Enriquecido con estándar 9 g/L (g/L)
BM-14-4-5 Bokashi	1,1277	60	-	-	3.23
BM-14-4-6 Corteza palmito	0,5252		-	-	4.34

Determinación del contenido de cenizas del extracto acuoso de la corteza de palmito y el Bokashi

Se determinó el contenido de cenizas en los extractos acuosos, los resultados muestran una mayor presencia en el caso del bokashi (Véase Cuadro XI).

Cuadro XI. Determinación del contenido de cenizas en los extractos.

Muestra Extracto	Masa crisol (g)	Masa crisol + muestra (g)	Masa crisol+ residuo (g)	% cenizas
BM-14-4-5 Bokashi r1	17.4609	18.0191	17.6671	36.94
BM-14-4-5 Bokashi r2	20.3131	21.4240	20.7700	41.13
BM-14-4-6 Corteza palmito r1	18.6565	19.2266	18.7405	14.73

Determinación del contenido de Carbohidratos por el método del Fenol-Sulfúrico en los extractos acuosos de Bokashi y Corteza

Los resultados obtenidos para la curva de calibración se muestran en el cuadro XII, de la figura 4 se deduce la correlación lineal entre la concentración de carbohidratos y la absorbancia obtenida.

Cuadro XII. Concentraciones y absorbancias obtenidas para la curva de calibración del método de Fenol-Sulfúrico.

Concentración estándar de glucosa (mg/L)	Absorbancia
10,0495	0,0196
25,1238	0,0953
85,4208	0,4193
100,495	0,5109

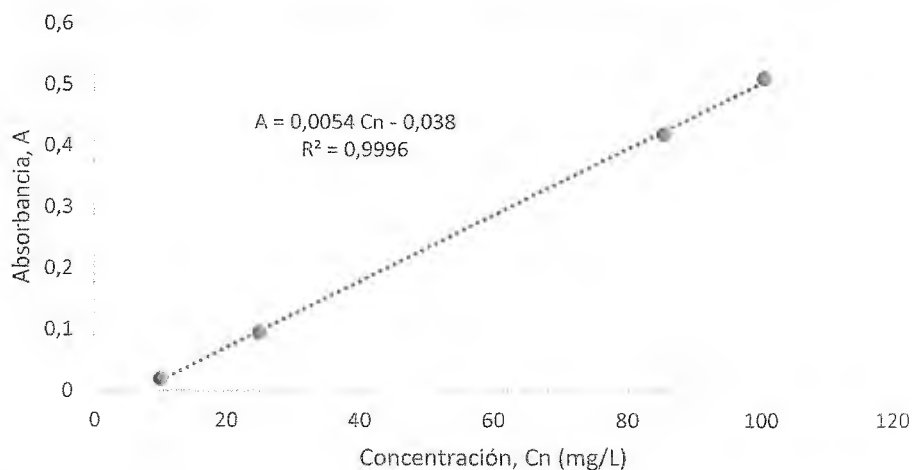


Figura 4. Curva de calibración para la determinación del contenido de carbohidratos por el método del Fenol-Sulfúrico.

Cuadro XIII. Porcentaje de carbohidratos totales obtenidos por el método del Fenol-Sulfúrico

	Masa (g)	Volumen Final (mL)	Absorbancia	%m/m	Promedio
Bokashi r1	0,0097	100	0,0000*	-	-
Bokashi r2	0,0097		0,0000*	-	-
Bokashi r3	0,0097		0,0000*	-	-
Corteza r1	0,0099		0,1108	27,8339	24,7974
Corteza r2			0,0929	24,4856	
Corteza r3			0,08	22,0726	

*Valores dentro del ruido

Mediante este método se obtuvo que en el extracto acuoso de corteza el contenido de carbohidratos en promedio es 24,80 % m/m, mientras que en el bokashi no fueron detectados por esta metodología

Determinación del contenido de Ca, Mg y K en los extractos acuosos de Bokashi y Corteza por Espectroscopía Atómica

Los resultados de la curva indican una respuesta lineal en el ámbito de trabajo elegido, lo cual permite aplicar el método de manera confiable (Véase cuadro XIV y XV, Figuras 5, 6 y 7).

Cuadro XIV. Concentraciones y absorbancias obtenidas para las curvas de calibración del K, Ca analizadas mediante Emisión Atómica.

K		Ca	
Concentración estándar (mg/L)	Absorbancia	Concentración estándar (mg/L)	Absorbancia
20,00	20144,8	10	2996,743
40,00	29291,68	20	5280,888
60,00	37017,45	60	11940,72
80,00	43195,07	80	14599,1

Cuadro XV. Concentraciones y absorbancias obtenidas para las curvas de calibración del Mg analizadas mediante Absorción Atómica.

Mg	
Concentración estándar (mg/L)	Absorbancia
0,40	0,339504
0,80	0,627677
2,00	1,227599

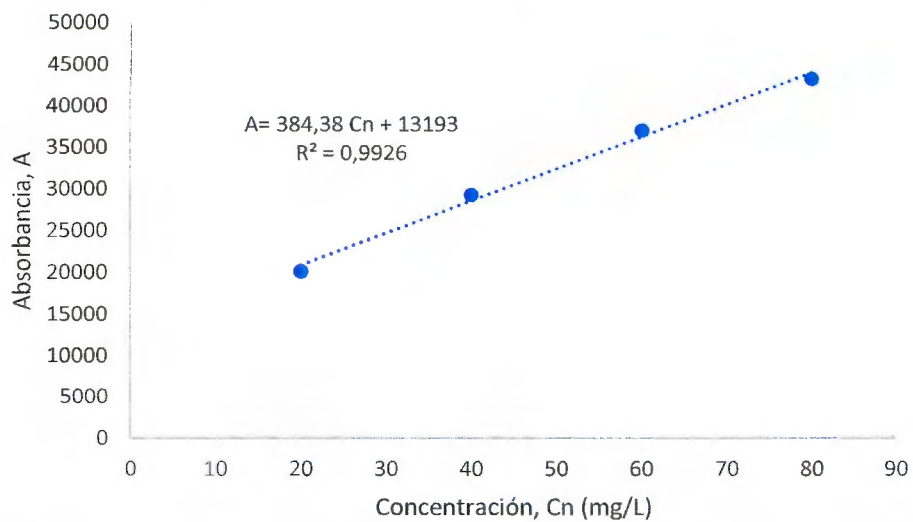


Figura 5. Curva de calibración para la determinación de la contenido de potasio.

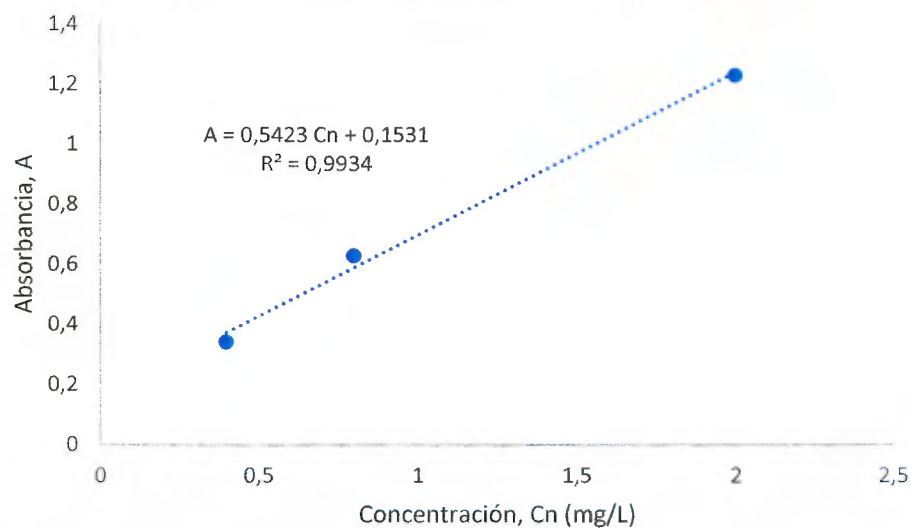


Figura 6. Curva de calibración para la determinación de la contenido de magnesio.

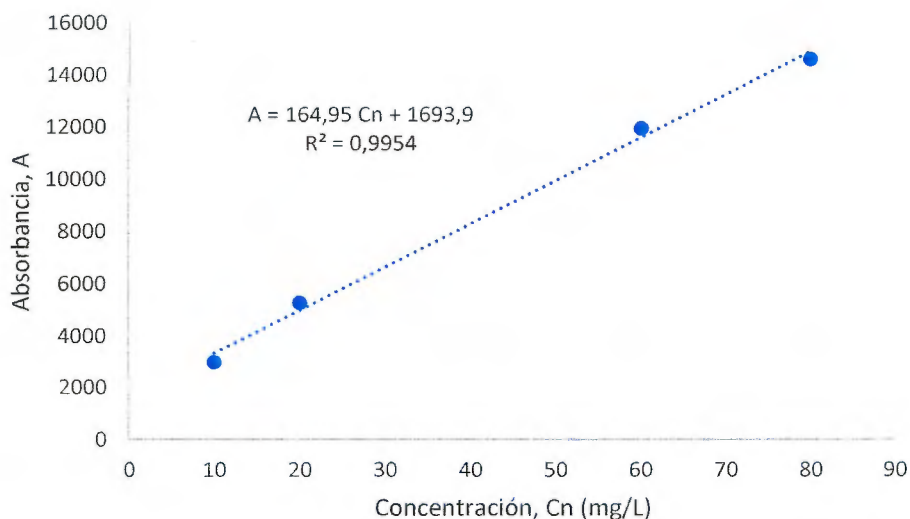


Figura 7. Curva de calibración para la determinación de la contenido de calcio.

El contenido obtenido de los macronutrientes analizados por Espectroscopía Atómica de los extractos acuosos se muestran en el cuadro XVI.

Cuadro XVI. Porcentaje de K, Ca y Mg presentes en los extractos acuosos de Bokashi y Corteza.

		Masa (g)	Volumen Final (mL)	Dilución	Absorbancia	Concentración Calculada (mg/L)	%m/m
K	Bokashi	0,1186	50,00	2ml/25 mL	26327,77	34,17	18,01
Ca					7304,40	34,01	17,92
Mg					0,67	0,95	0,50
K	Corteza	0,0556	25,00	2ml/25 mL	18742,52	14,44	8,11
Ca					5196,95	21,24	11,94
Mg					1,02	1,60	0,90

Análisis de RMN

Una vez que se obtuvo el extracto acuoso liofilizado del bokashi se procedió a realizar las mediciones de Resonancia Magnética Nuclear (Véase Figuras 8, 9, 10 y 11. En los extracto de acetato de etilo y etanol, de los cuales también se hicieron mediciones de RMN, demostraron la ausencia compuestos de interés.

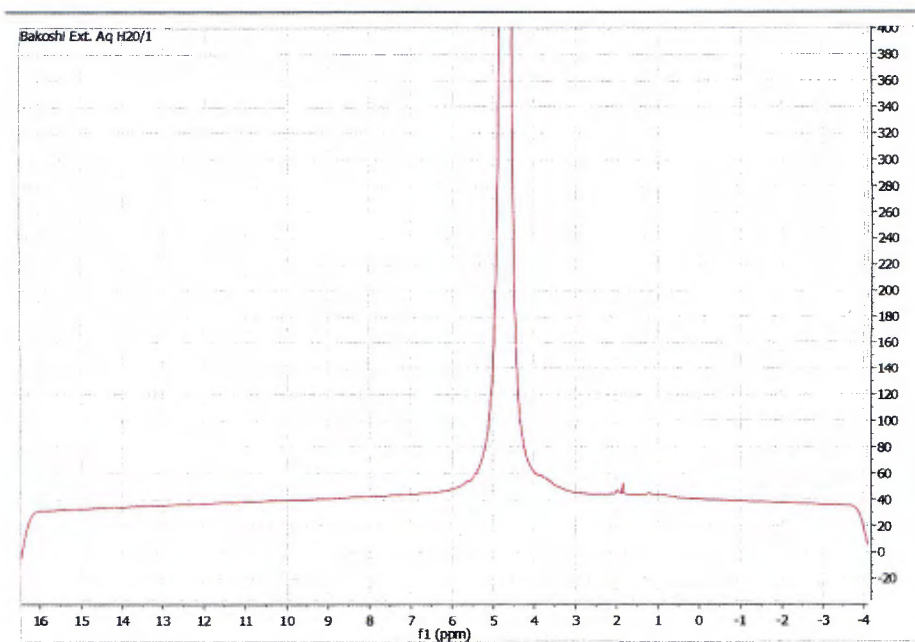


Figura 8. Espectro ^1H -RMN del extracto acuoso bokashi, 400 MHz, acuoso.

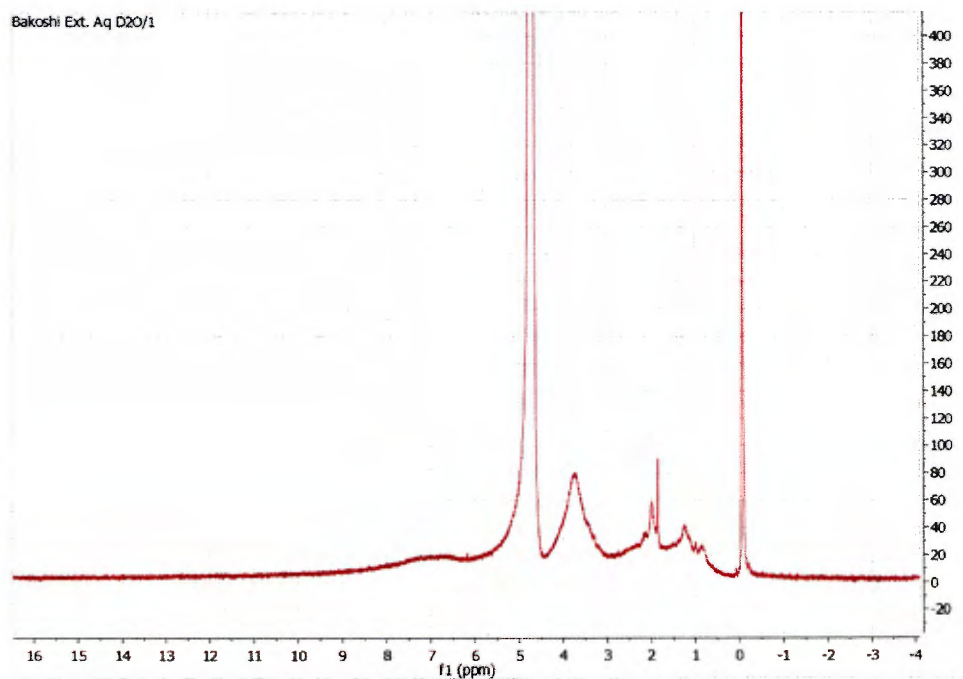


Figura 9. Espectro ^1H -RMN, del extracto acuoso bokashi 400 MHz, en agua deuterada.

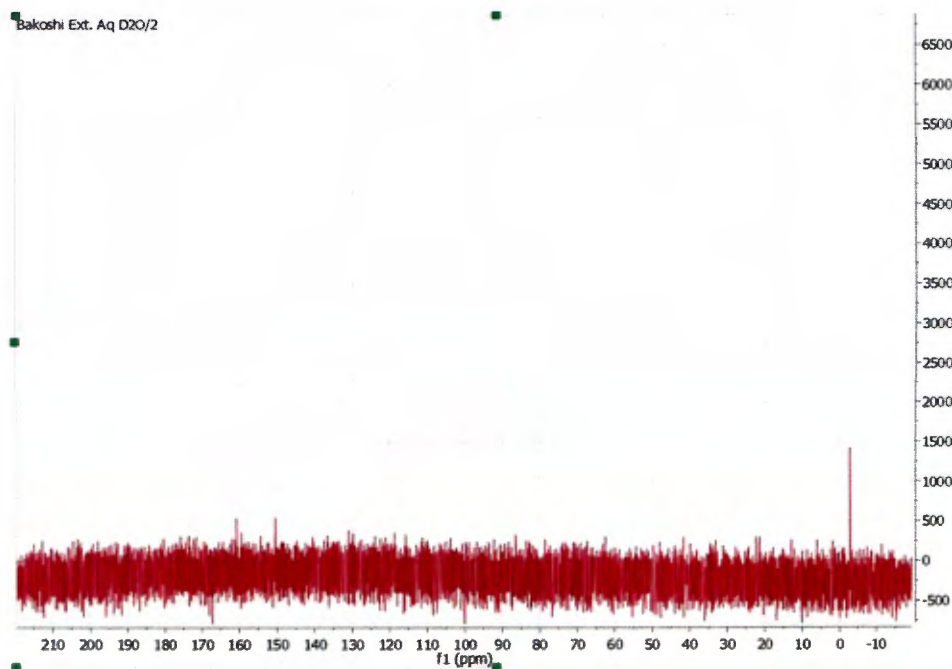


Figura 10. Espectro ^{13}C -RMN del extracto acuoso bokashi, 100 MHz, en agua deuterada.

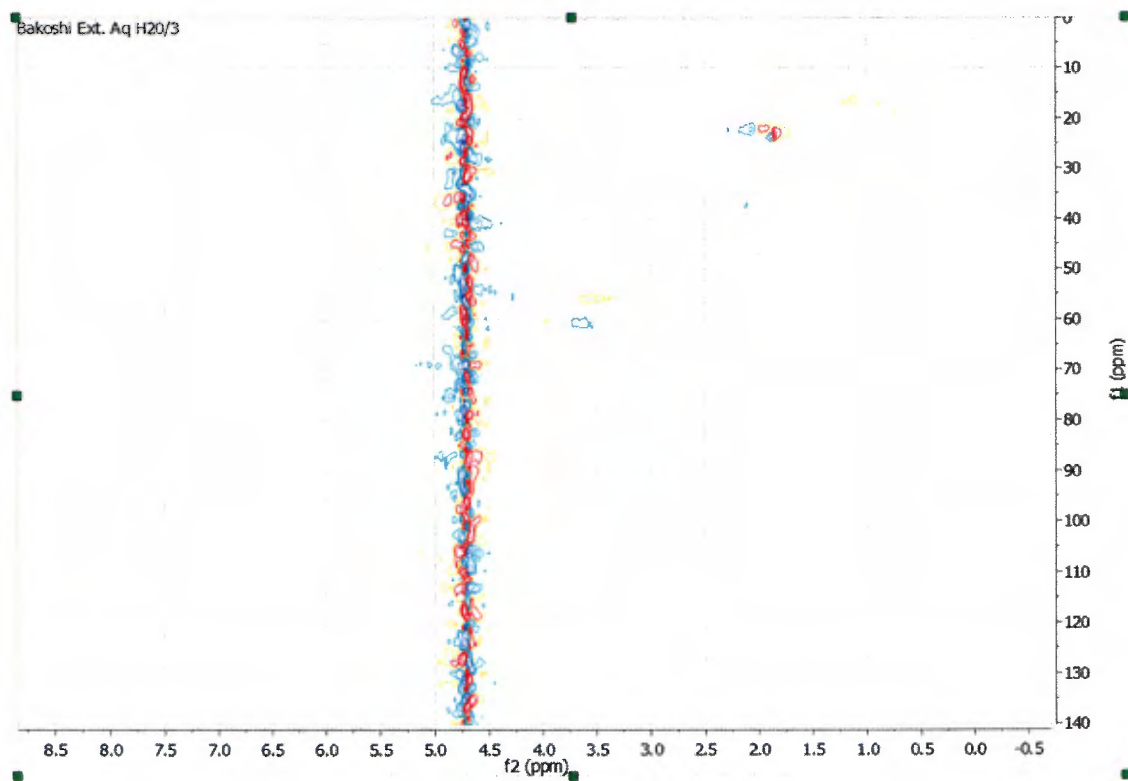


Figura 11. Espectro HSQC del extracto acuoso bokashi, 400 MHz, agua deuterada.

En el caso del extracto acuoso liofilizado de la corteza de palmito si se observa la presencia de señales importantes, por lo cual se decide continuar separando este extracto. (Véase Figuras 12, 13 y 14)

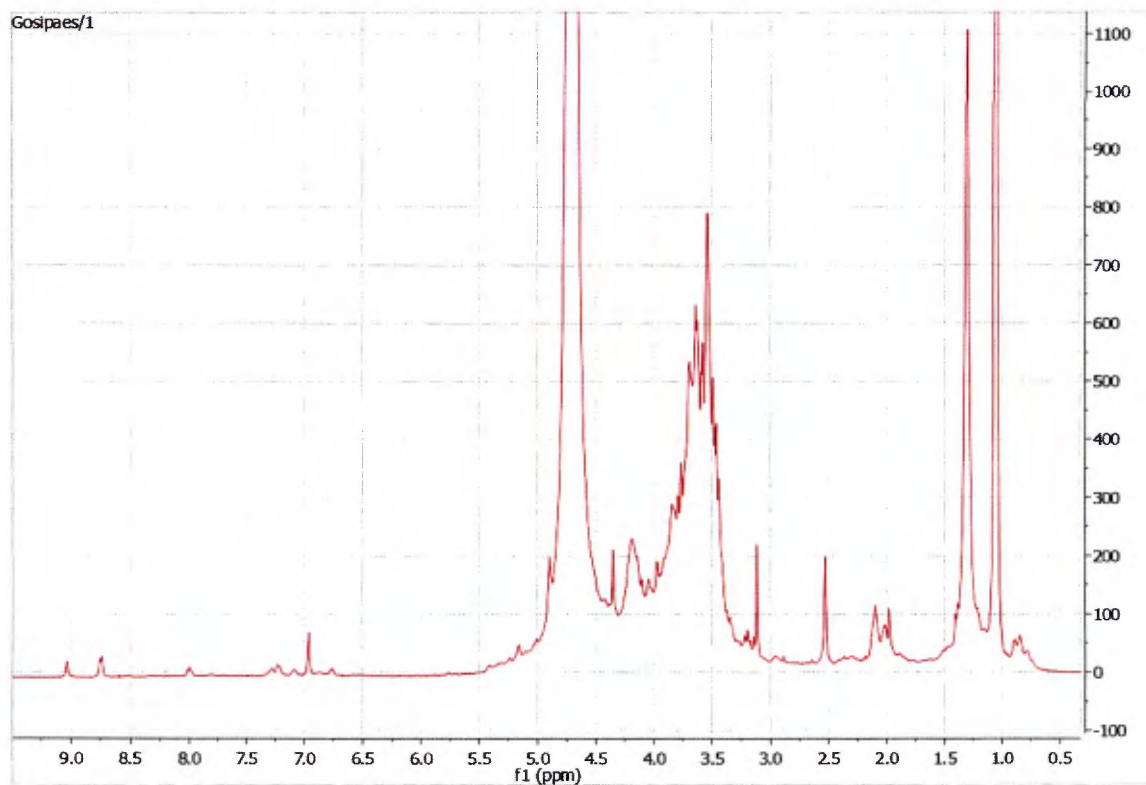


Figura 12. Espectro ¹H-RMN, del extracto acuoso de la corteza de palmito, 400 MHz, en agua deuterada.

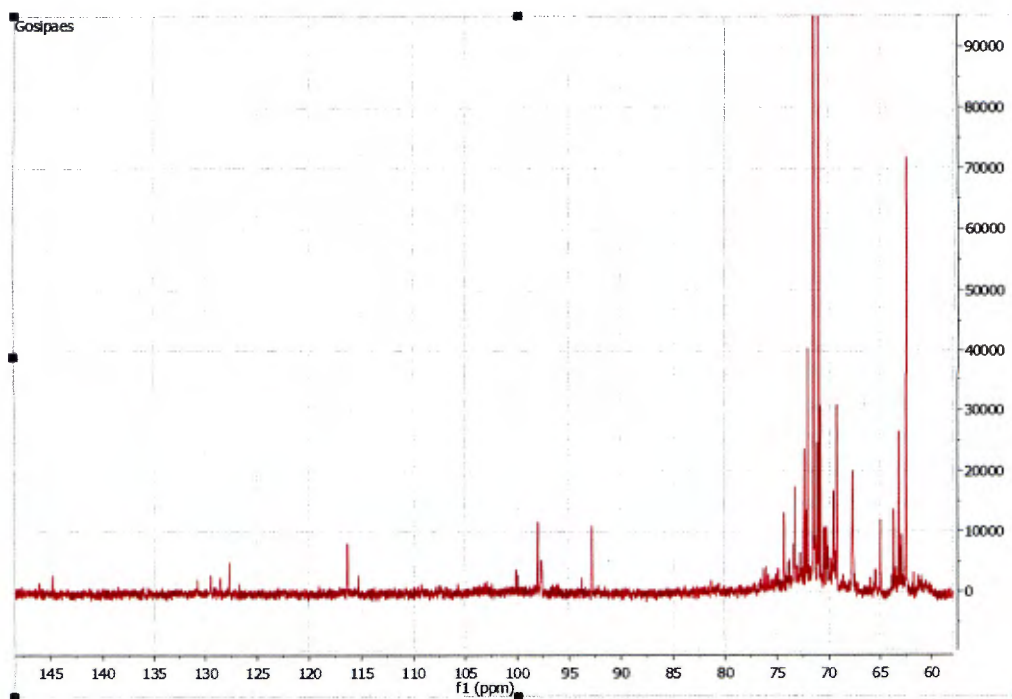


Figura 13. Espectro ^{13}C -RMN del extracto acuoso de la corteza de palmito, 100 MHz, en agua deuterada.

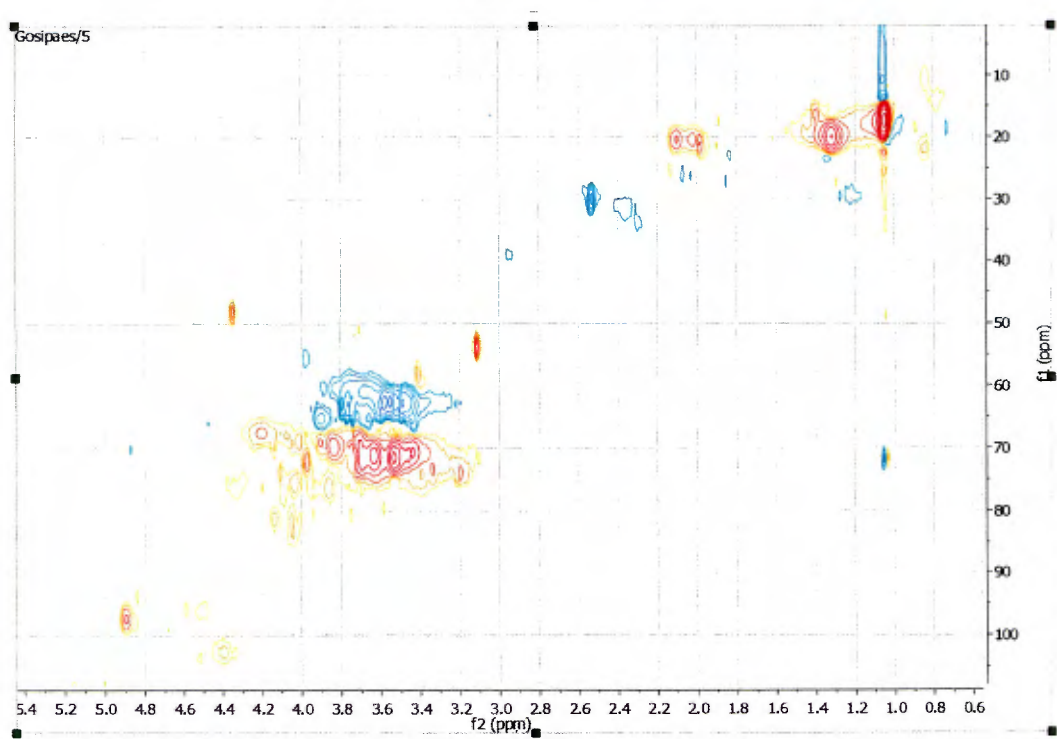


Figura 14. Espectro HSQC del extracto acuoso de la corteza de palmito, 400 MHz, agua deuterada.

Determinación del Espectro Infrarrojo del extracto acuoso liofilizado del Bokashi

Se determinó el espectro Infrarrojo con el fin de visualizar los tipos de compuestos esperados según los grupos funcionales presentes. El espectro obtenido se muestra a continuación.

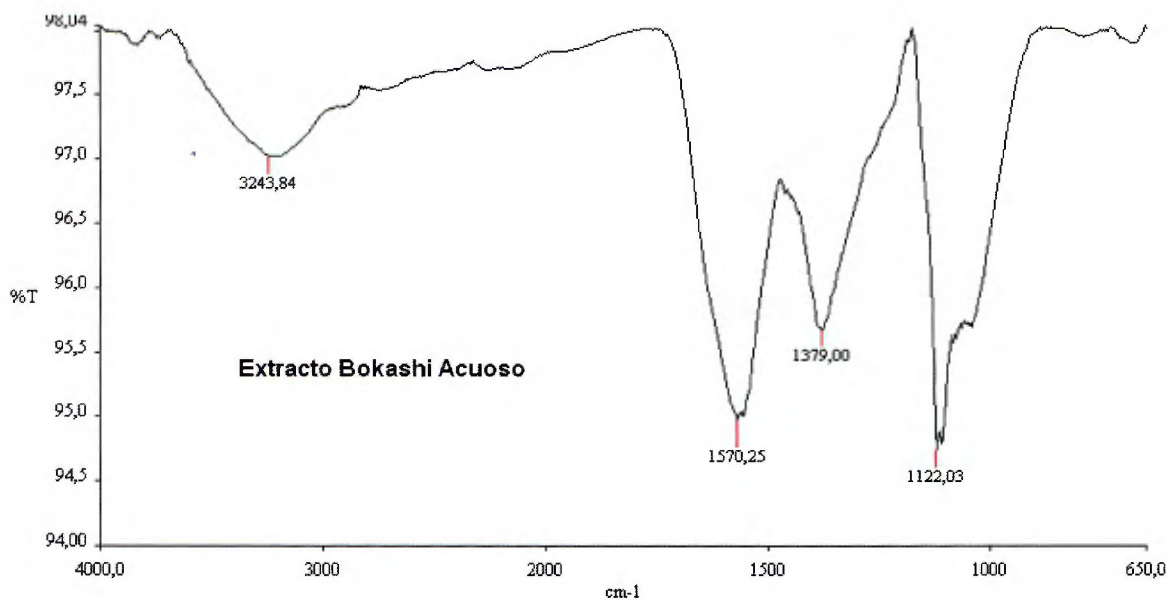


Figura 11. Espectro infrarrojo del extracto acuoso liofilizado de bokashi.

Determinación de los componentes orgánicos presentes en el extracto acuoso de Corteza

Después de la acetilación del extracto acuoso de la corteza de palmito y su posterior separación por medio de placas cromatográficas, se obtuvieron 5 fracciones de las cuales la de mayor importancia, tanto en cantidad como en las señales obtenidas en los espectros de RMN, fue la número 5. En el cuadro XVII se muestran las masas obtenidas de todas las fracciones.

Cuadro XVII. Masas de las fracciones obtenidas de la acetilación del extracto acuoso de la corteza de palmito.

Masa extracto (g)	Masa producto acetilado (g)	Fracción	Masa balón (g)	Masa balón+muestra (g)	Masa fracción (mg)
2,0747	0,7595	1	35,7222	35,7233	1,1
		2	28,0033	28,0036	0,3
		3	24,5662	24,5665	0,3
		4	25,2256	25,2291	3,5
		5	33,3326	33,3447	12,1

Se realizaron las mediciones correspondientes en RMN, demostrando que la fracción más importante era la 5, en las Figuras 15, 16, 17 y 18 se muestran los espectros obtenidos.

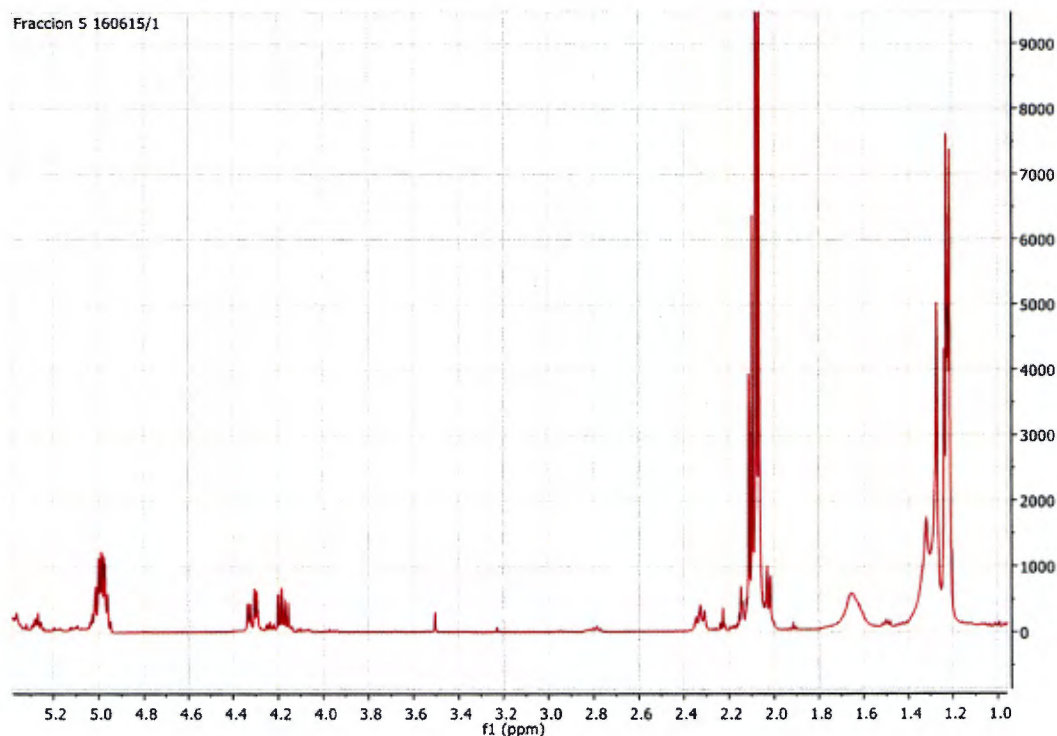


Figura 15. Espectro 1H-RMN del extracto acuoso de la corteza acetilado, 400 MHz, acuoso.

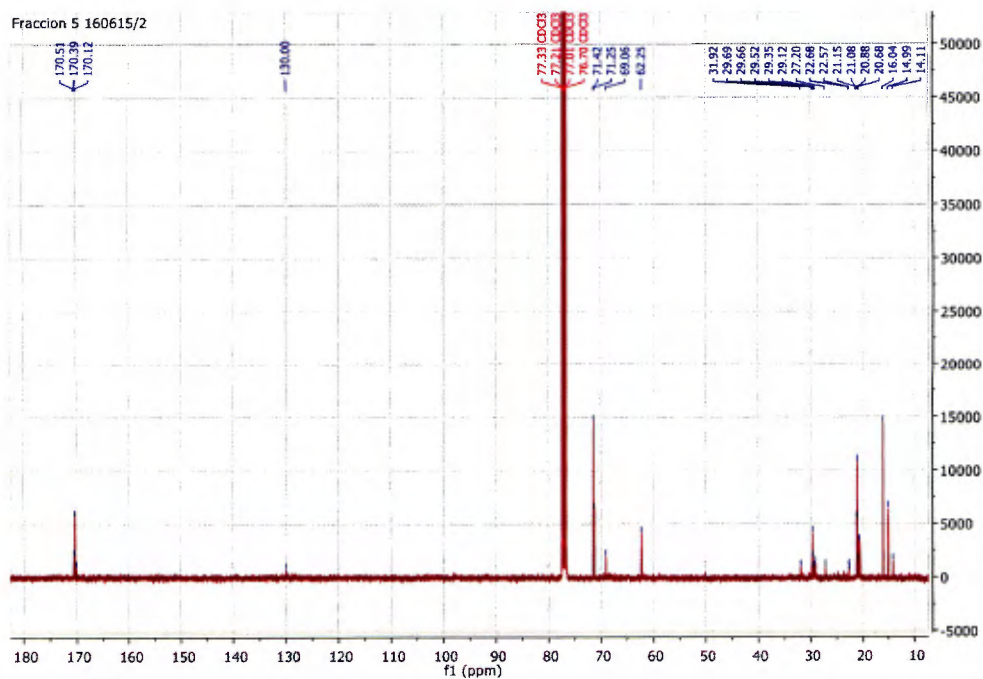


Figura 16. Espectro ¹³C-RMN del extracto acuoso de la corteza acetilado, 100 MHz.

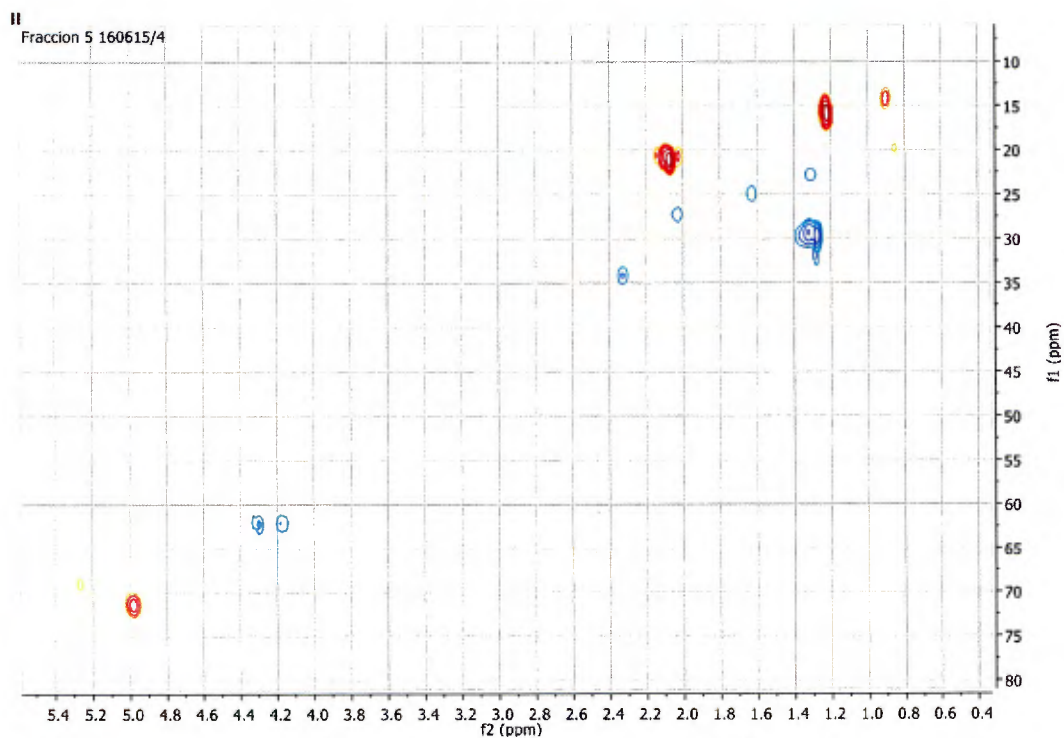


Figura 17. Espectro HSQC del extracto acuoso de la corteza acetilado, 400 MHz.

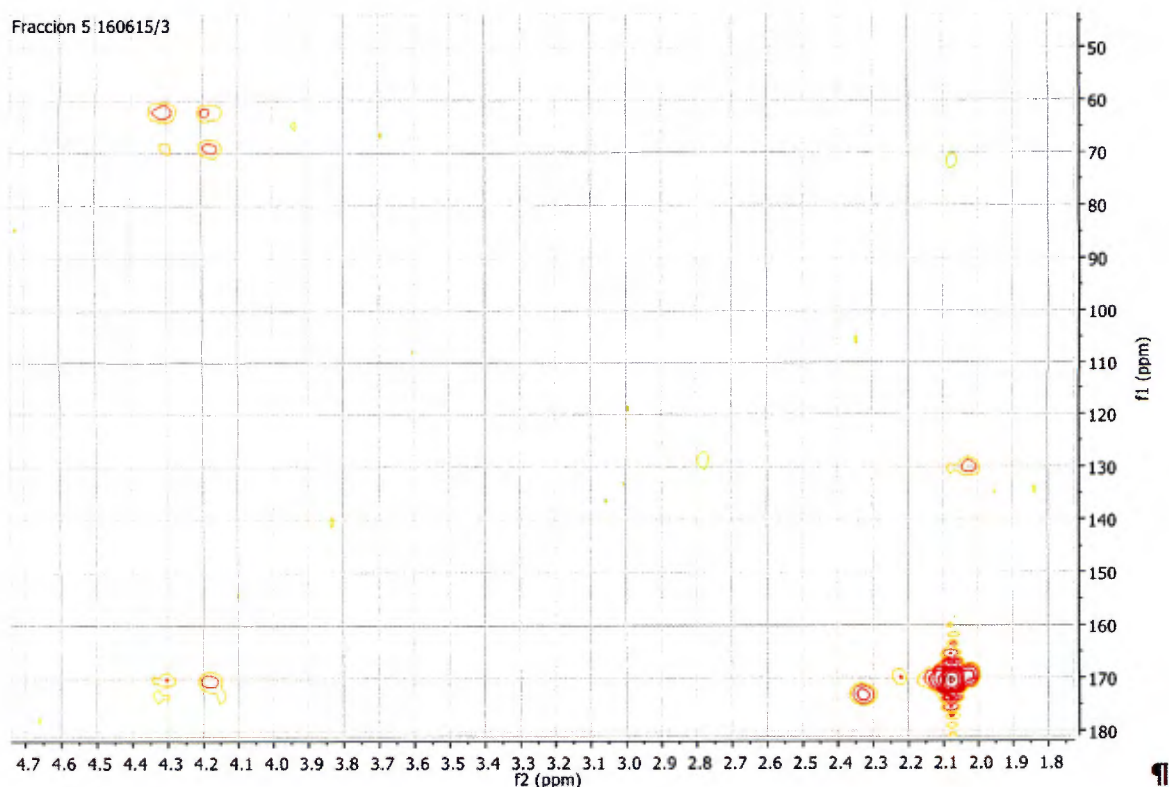


Figura 18. Espectro HMBC del extracto acuoso de la corteza acetilado, 400 MHz.

Determinación de alcoholes de bajo peso molecular por cromatografía de gases

Los resultados obtenidos en la cromatografía de gases con detector de llama indican ausencia de alcoholes en el bokashi tanto a los 15 días como al mes (Véase Figura 19 y 20), mientras que si fueron detectados en la corteza (Figura 21) por esta razón más adelante se plantea una nueva metodología y se exponen las razones.

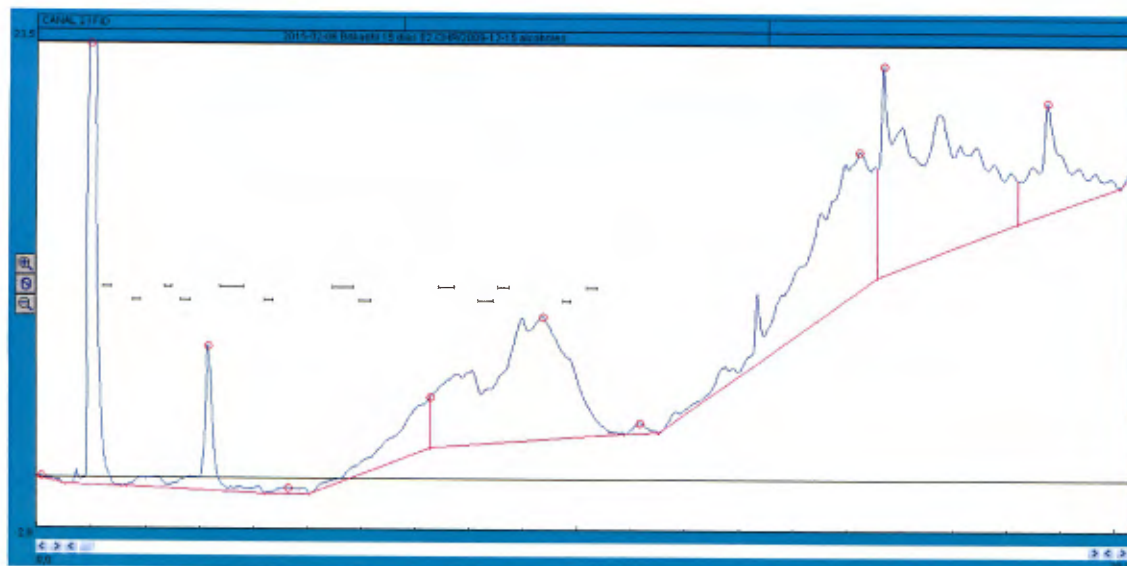


Figura 19. Prueba Perfil de Alcoholes Bokashi a los 15 días.

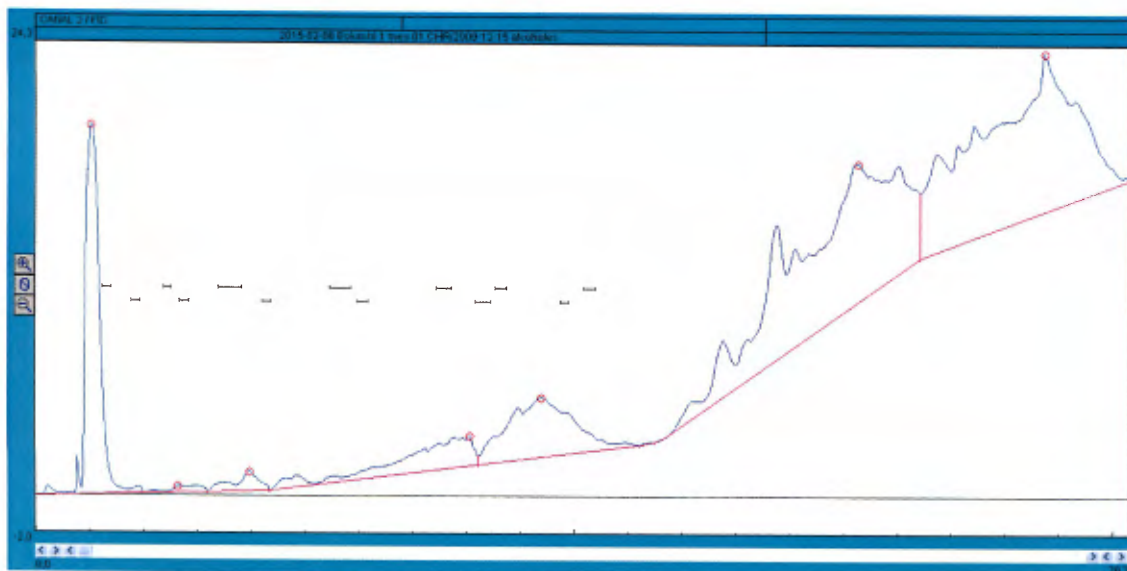


Figura 20. Prueba Perfil de Alcoholes Bokashi al mes.

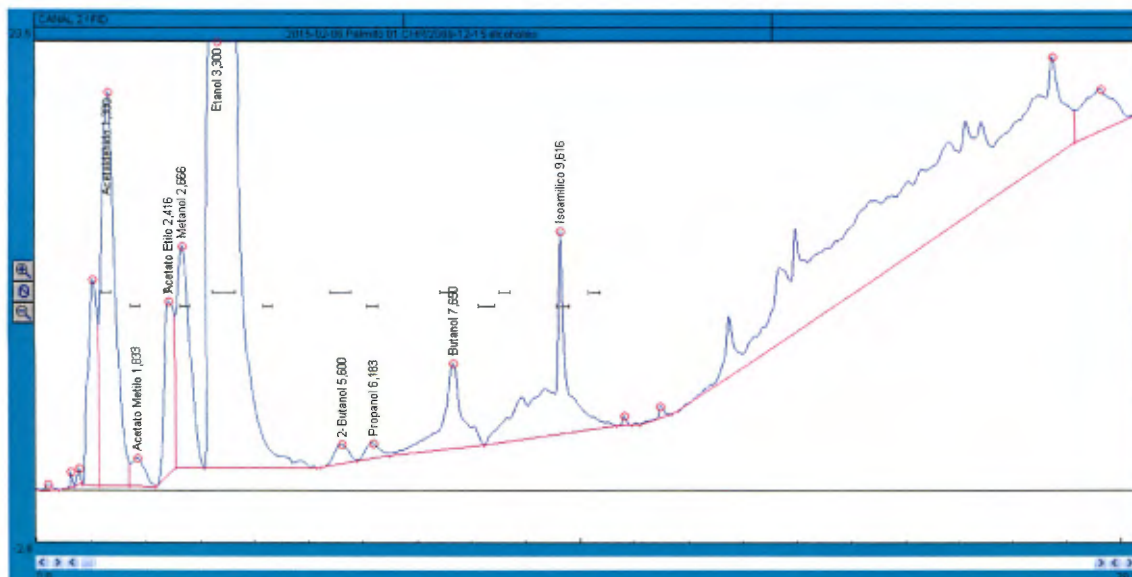


Figura 21. Prueba Perfil de Alcoholes Corteza Palmito.

Discusión

Determinación de la densidad

Los datos de la determinación de la densidad aparente de la corteza muestran una alta variabilidad debido a que los resultados dependen directamente del nivel de compactación de la muestra, y dado la heterogeneidad de ésta, es difícil la reproducibilidad entre mediciones.

La importancia de estas mediciones radica en el transporte de los residuos hasta la zona de producción del bokashi, ya que la corteza no recibe tratamiento posterior a la extracción del palmito y debe ser llevada a la zona destinada para ser mezclada con los demás componentes.

Cabe destacar que este lugar está expuesto a las condiciones ambientales de la zona, protegido tan solo de la lluvia.

Determinación del contenido de nitrógeno total

Se determinó el contenido de nitrógeno de ambos extractos acuosos puesto que la literatura señala que es un factor muy importante en el proceso de fertilización de las palmas como *Bactris gasipaes*, teniendo un impacto positivo en el crecimiento al aumentar su concentración.

Los resultados mostraron que existe mayor cantidad de nitrógeno en el extracto acuoso de Bokashi en comparación con la corteza de palmito. Lo cual también significa un contenido de proteína mayor, sin embargo se debe tener presente que dicho valor se obtiene al utilizar un factor empírico, por esta razón es que se emplearon técnicas específicas para la cuantificación de proteína; con la finalidad de eliminar cualquier aporte de nitrógeno por otros compuestos orgánicos. Debido a que esto va en contraposición con las observaciones del aumento en el crecimiento, estos datos deben evaluarse con cautela.

Determinación del porcentaje de proteína mediante el método Bradford en la corteza de palmito

La repetibilidad entre las mediciones obtenidas fue buena, sin embargo respecto al nitrógeno total y el porcentaje de proteína obtenido con el analizador elemental, se observa que es mucho menor por lo cual se decidió aplicar otro método más sensible para determinar el contenido de proteína.

Determinación del porcentaje de proteína mediante el método BCA en la corteza de palmito

En este caso los resultados obtenidos superaron el contenido de proteína obtenido con el analizador elemental, dado que esta última metodología involucra la combustión total de la muestra para producir óxidos de nitrógeno, que posteriormente son reducidos a nitrógeno molecular, es una buena aproximación

decir que ese sería el máximo posible; por esta razón se presume también la presencia de interferencias en este método.

Determinación del contenido de proteína por precipitación

Finalmente se decide probar otro procedimiento para la cuantificación de proteínas debido a que anteriormente no se obtuvieron resultados concluyentes. Con este método nuevamente se obtienen mayores contenidos de proteína en comparación con los del nitrógeno total. Dada la complejidad de las muestras que se están analizando es de esperar la presencia de una amplia gama de compuestos que podrían estar interfiriendo: por absorción en las longitudes de onda empleadas, reacciones alternas con los agentes generadores del color, precipitación al disminuir la polaridad del medio e inclusive partículas en dispersión que no hayan podido ser removidas de la disolución; por esta razón es más confiable basarse en los cálculos de nitrógeno total para tener una idea del contenido de proteína en las muestras.

Determinación del contenido de Carbohidratos por el método del Fenol-Sulfúrico en los extractos acuosos de Bokashi y Corteza

Las metodologías para la determinación de proteína indican en sus protocolos que algunos carbohidratos son interferencias importantes, por esta razón es que se decidió cuantificar el contenido total de carbohidratos. Los resultados mostraron la presencia en el extracto acuoso de la corteza, más no en el bokashi.

De hecho estos resultados son consistentes con las demás pruebas, por ejemplo en el caso del espectro infrarrojo del bokashi no se obtuvo mayor información sobre los grupos funcionales de los compuestos presentes ni indicó presencia de carbohidratos. Inclusive analizando los espectros RMN del extracto acuoso liofilizado de bokashi no se logró distinguir ninguna señal que indicara la presencia de carbohidratos.

Determinación de Glucosa en los extractos acuosos mediante analizador Bioquímico YSI

En el caso del método del BCA se sabe que la glucosa es una interferencia, puesto que los resultados de proteína obtenidos fueron mayores a los esperados y la glucosa es común en organismos vivos, se procedió a cuantificar la glucosa mediante un Analizador Bioquímico YSI. Los resultados muestran ausencia de glucosa, se presume la presencia de otros carbohidratos ya que no se generó señal en las muestras, inclusive al diluir el patrón de 9 g/L a la mitad con cada una de las muestras se observa un valor próximo al teórico (4.5 g/L)

Determinación del contenido de cenizas de los extractos acuosos de la corteza de palmito y bokashi

Los resultados variables en los métodos para la determinación de proteína en el extracto hace sospechar la presencia de interferencias, al ser estos métodos colorimétricos podría deberse a la presencia de partículas insolubles en agua, que en suspensión generen una importante dispersión de la luz. Los resultados permiten visualizar que en efecto ambos extractos contienen una importante fracción inorgánica, siendo el extracto acuoso de bokashi el que posee más cantidad. Analizando los resultados altos de proteína obtenidos por los métodos espectrofotométricos se deduce el papel de estas partículas insolubles. Esto en conjunto con la presencia de carbohidratos corrobora la idea que es mejor basarse en los resultados obtenidos con el analizador elemental.

Determinación del contenido de Ca, Mg y K en los extractos acuosos de Bokashi y Corteza

En este caso en general los macronutrientes analizados se encuentran en mayor proporción en el extracto acuoso del bokashi lo cual refuerza la observación sobre la mayor actividad del mismo, solamente el magnesio está ligeramente en menor proporción.

Uniéndolo estos resultados con los de nitrógeno total se verifica el mayor aporte nutricional que tiene el bokashi sobre el cultivo de *Bactris gasipaes* y por ende el mejor rendimiento obtenido.

Determinación de alcoholes de bajo peso molecular

El objetivo por el cual se desea saber el contenido de alcoholes de bajo peso molecular es debido al efecto inhibitorio que podrían tener en el crecimiento de las plantas (en el bokashi fermentado), de lograr hallarlo en etapas tempranas del proceso de bokashi se tendrían razones para pensar que están implicados en la inhibición. Lo último por cuanto existen estudios realizados en arroz sobre germinación y crecimiento de sistema radical de la planta que muestran un menor crecimiento al aumentar la cantidad de alcohol presente en el medio. [25] Inclusive en otros estudios, en plantas de interés ornamental, demuestran que la adición de etanol puede reducir el crecimiento de las plantas significativamente. [26]

Debido a que no se logró encontrar los alcoholes en el bokashi, más en la corteza de palmito sí, se propone un procedimiento para manejar el proceso de descomposición del palmito y cuantificar los alcoholes producidos:

Inicialmente se necesita tanto corteza de palmito como el material que utilizan para producir el bokashi, el día cero se coloca en igual proporción las partes que componen el bokashi (en recipiente hermético y que permita muestrear el gas producido) y por otra parte una cantidad de corteza equivalente a la empleada en el bokashi que serviría como control.

Ambos se colocan en una incubadora a una temperatura similar al promedio de la zona de guápiles, se van realizando mediciones periódicas de la concentración de los alcoholes presentes en la fase gaseosa durante un mes, que es en teoría el periodo de tiempo que se deja reposar ese material antes de aplicar.

Esta propuesta surge de observaciones realizadas tanto en el campo como en los análisis realizados en el laboratorio:

- 1) No se cuenta con bokashi fresco, el que se muestreó ya tenía 15 días en proceso

- 2) La temperatura a un nivel muy superficial de ese material es bastante elevada, y sería de esperar sea mayor al interior del montículo lo cual ocasionaría una pérdida rápida de los alcoholes por volatilización en etapas tempranas del proceso.
- 3) Debido a lo anterior sería muy difícil con un muestreo puntual detectar los alcoholes
- 4) Las mediciones de gases en la corteza realizadas en el laboratorio unos 2 días después de tomadas las muestras, mostraron presencia de alcoholes que se podrían deber a la descomposición que va progresando

Las condiciones exactas del proceso son muy difíciles de reproducir ya que la temperatura oscila durante ese periodo de tiempo, además del proceso de calentamiento que se origina producto de la descomposición de la materia orgánica al interior del material, también la humedad es muy variable.

Se propone centrarse en la temperatura ambiental para tratar de simular el proceso, la humedad dejarla solo como la contenida en los materiales adicionados ya que colocar agua podría retener los alcoholes y complicar el proceso de cuantificación.

Lo que se pretendería obtener con este experimento es:

- 1) Comprobar que el palmito produce alcoholes en su descomposición
- 2) Que el bokashi favorece su producción
- 3) A través del análisis en el tiempo corroborar que el bokashi acelera el proceso
- 4) Encontrar que se llega a una fase estacionaria, que correspondería al punto en el cual los alcoholes han sido liberados en su totalidad y el bokashi está listo para ser aplicado

En el presente trabajo no se aplicó este procedimiento por decisión de la empresa encargada del proyecto, sin embargo sería importante realizarlo en futuras investigaciones para concluir el rol de los alcoholes de bajo peso moleculares que fueron hallados en el proceso de descomposición de la corteza de palmito.

Extracción de las muestras

El propósito de la extracción acuosa es aislar los compuestos que en las condiciones normales de utilización de la corteza como abono, son liberados por el mismo proceso de lixiviación. Por la naturaleza del disolvente es de esperar encontrar carbohidratos, aminoácidos, ácidos orgánicos y en general compuesto altamente polares o capaces de protonarse.

En el caso de las extracciones con etanol y acetato de etilo lo que se quiere es ir disminuyendo paulatinamente la polaridad de los compuestos aislados y asegurarse que metabolitos menos solubles en agua y que estén implicados en el efecto potenciador del crecimiento, sean tomados en cuenta.

Análisis de RMN

Los resultados obtenidos tanto en los espectros de carbono y protónico demuestran ausencia de carbohidratos e indican que probablemente el color y el contenido del extracto es más de origen inorgánico en el extracto acuoso de bokashi. Esto debido a que existen muy pocas señales e incluso en el caso del carbono prácticamente las señales están ausentes (Véase Figuras 8, 9, 10 y 11. En los extracto de acetato de etilo y etanol, de los cuales se hicieron mediciones de RMN también demostraron la ausencia de compuestos de interés, únicamente se detectaron grasas.

En el caso del extracto acuoso de la corteza, en todos los espectros medidos se puede observar la presencia de carbohidratos: señales entre 3 y 4.5 ppm en el espectro ^1H -RMN, de la misma forma se observan señales de carbohidratos en el espectro de ^{13}C -RMN con señales entre 60-80 ppm. Las correlaciones observadas en el espectro HSQC-DEPT (correlaciones azules y rojas en el centro, indicativas de CH rojas y CH_2 azules, todas base de alcoholes) corroboran una vez más la presencia de carbohidratos. (Figuras 12, 13 y 14) Estos datos de resonancia magnética concuerdan con los análisis realizados para el contenido de carbohidratos por el método del fenol sulfúrico.

Observando el espectro del ^{13}C -RMN de la corteza, queda claro que el contenido de carbohidratos se basa en moléculas de bajo peso molecular y no de estructuras poliméricas, por lo que un análisis más detallado y métodos de separación, podría llegarse a saber cuáles son estos carbohidratos.

Determinación de los componentes orgánicos presentes en el extracto acuoso de Corteza

En los espectros ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de la fracción 5 (Véase figuras 15 y 16) se distinguen señales de un alcohol de bajo peso molecular. Las señales entre 60 y 75 ppm en el ^{13}C -RMN indican que el alcohol es de al menos 3 carbonos y de estructura simétrica. Las señales de los grupos acetilos se deben a que la muestra fue previamente acetilada con anhídrido acético y piridina (δ 2 ppm en ^1H -RMN y δ 20 y 170 ppm en ^{13}C -RMN).

Del espectro HSQC (Figura 17) se observa –en conjunto con los espectros anteriormente mencionados- la presencia de un ácido graso. Las correlaciones de los protones de los alcoholes con los carbonos a 63 y 72 ppm y sus respectivos cambios químicos sugieren la presencia de glicerol acetilado, lo cual se corrobora con el espectro HMBC en la Figura 18 (J^2, J^3 heteronuclear).

El papel que juega el glicerol en el crecimiento de las plantas de palmito no está claro, sin embargo varias referencias indican que puede ser empleado como sustrato por las bacterias *Lactobacillus reuteri*. Este es un microorganismo comúnmente presente en los intestinos de diversas especies, puesto que el bokashi contiene excremento de vaca sería de esperar su presencia. [27, 28]

La importancia de *Lactobacillus reuteri* radica en su capacidad de convertir el glicerol, en condiciones anaerobias, en reuterina (β -hidroxipropionaldehído) un agente antimicrobiano de amplio espectro soluble en agua, resistente al calor y estable en un rango amplio de pH. Se ha encontrado que es capaz de inhibir el crecimiento de bacterias gram positivo, gram negativo, levaduras, hongos y protozoarios. [29, 30, 31, 32]

En la presente investigación no podemos asegurar la presencia de *Lactobacillus reuteri*, ni la producción de reuterina. Pero el efecto observado experimentalmente que se tiene es: el bokashi promoviendo el crecimiento vegetal, y por otra parte la corteza aportando glicerol en el bokashi; por esta razón en futuros trabajos será necesario corroborar esta hipótesis a través de un estudio detallado del metabolismo del glicerol en las condiciones normales de producción del bokashi.

Además otra investigación señala que el mono laurato de glicerol posee una de las mayores actividades antimicrobianas de una serie de compuestos evaluados en ese estudio; nuevamente se encuentra que un compuesto relacionado con el glicerol posee actividad antimicrobiana, es posible que metabolitos del glicerol estén actuando a través de este mecanismo para mejorar la producción de palmito, sin embargo será necesario contar con más resultados experimentales que respalden esta teoría. [33]

Conclusiones

1. Los resultados de contenido de nitrógeno, a través de las distintas metodologías, evidencian la complejidad de las matrices, al obtenerse valores muy distintos en todas las pruebas, por ello es más confiable el valor proveniente del analizador elemental.
2. El contenido de macro nutrientes en general se encuentra en mayor proporción en el bokashi que en la corteza de palmito.
3. A pesar de que los resultados demuestran que el bokashi tiene un contenido mayor de nutrientes, este no tiene propiedades superiores a la corteza de palmito, por lo que los efectos de la matriz deben jugar un papel más importante.
4. Cuando el bokashi pierde su olor a fermentado, este tiene una actividad ligeramente mejor que la corteza de palmito como fertilizante, situación que está de acuerdo al contenido de nutrientes detectado.
5. En vista de que las mediciones de alcoholes en el bokashi no se pudieron llevar a cabo de manera adecuada por el tipo de manejo que debe llevar la

muestra, no se pudo corroborar que este fuera el factor determinante en la pérdida de actividad del bokashi recién fermentado. Sin embargo las observaciones sugieren que esto debe ser así, razón por la cual el análisis de alcoholes del fermentado debe llevarse a cabo para una determinación inequívoca.

6. Solo dos aspectos diferencian la corteza de palmito y el bokashi, en primer lugar la presencia de alcoholes de bajo peso molecular, que por las razones explicadas con anterioridad, no se analizaron a profundidad para reconocer el efecto que podrían tener en el cultivo. Y segundo el contenido de glicerol que solo fue hallado en la corteza de palmito, el cual podría estar relacionado en la producción de compuestos con efectos antimicrobianos, como se mencionó anteriormente; mejorando indirectamente la producción a través de plantas en buenas condiciones de salud.
7. Sin embargo para tener un panorama más claro del rol desempeñado por el glicerol será necesario analizar los procesos al interior del bokashi, incluyendo posibles microorganismos benéficos que lo empleen como sustrato y produzcan compuestos importantes en las funciones vitales de las plantas.
8. Cabe mencionar que el efecto inhibitorio del bokashi en etapas tempranas es un problema que debe ser afrontado desde varios horizontes y encontrar la manera en que estas variables se conectan para dar el resultado observado.
9. Inicialmente por el origen acuoso de los extractos se pensó en la presencia de carbohidratos, por lo cual se realizó el método del fenol-sulfúrico, la que indicó su presencia en la corteza de palmito; sin embargo al emplear el analizador bioquímico YSI no se detectó la presencia de glucosa.
10. Las señales obtenidas en los espectros de RMN del bokashi indican la ausencia de compuestos de importancia, lo que podría significar que el color se deba al contenido de compuestos inorgánicos.
11. En el caso de la corteza de palmito desde el proceso inicial de extracción mostraban la presencia de un alcohol de bajo peso molecular, al realizar el

proceso de acetilación y posterior separación cromatográfica se constató la presencia de glicerol principalmente.

12. Se descartó analizar los extractos en etanol y acetato de etilo de ambas muestras debido a que en la inspección inicial solo fue posible encontrar señales de grasas.

En general los resultados relacionados con los potenciales nutrientes presentes en los extractos acuosos muestran claramente que el bokashi los tiene en mayor proporción. De hecho, el bokashi cuenta con el mayor contenido de nitrógeno, que según la literatura está estrechamente relacionada con una mayor producción del cultivo; inclusive la mayor parte de los macronutrientes esenciales de las plantas que fueron examinados en esta investigación (K, Ca) se obtuvieron en mayor concentración. Con estos resultados se refuerza la observación del mayor crecimiento producido por el bokashi, más no indica la causa por la cual no es efectivo en etapas tempranas.

Solo dos aspectos diferencian la corteza de palmito y el bokashi, en primer lugar la presencia de alcoholes de bajo peso molecular, que por las razones explicadas con anterioridad, no se analizaron a profundidad para reconocer el efecto que podrían tener en el cultivo. Y segundo el contenido de glicerol que solo fue hallado en la corteza de palmito, el cual podría estar relacionado en la producción de compuestos con efectos antimicrobianos, como se mencionó anteriormente; mejorando indirectamente la producción a través de plantas en buenas condiciones de salud.

Sin embargo para tener un panorama más claro del rol desempeñado por el glicerol será necesario analizar los procesos al interior del bokashi, incluyendo posibles microorganismos benéficos que lo empleen como sustrato y produzcan compuestos importantes en las funciones vitales de las plantas.

Por último cabe mencionar que el efecto inhibitorio del bokashi en etapas tempranas es un problema que debe ser afrontado desde varios horizontes y encontrar la manera en que estas variables se conectan para dar el resultado observado.

Bibliografía

- [1] Lim, T. Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. **2012**, *1*, 285-292.
- [2] Cole, D.; White, T.; Nair, P. Maintaining genetic resources of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth): The role of seed migration and swidden-fallow management in northeastern Peru. *Genetic Resources and Crop Evolution*. **2007**, *54*, 189–204.
- [3] Cornelius, J.; Weber, J.; Sotelo, C.; Ugarte, L. Phenotypic correlations and site effects in a Peruvian landrace of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth). *Euphytica*. **2010**, *173*, 173–183.
- [4] Hernández, J.; Mora, J.; Rocha, O. Genetic relationships among wild and cultivated populations of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth, Palmae): evidence for multiple independent domestication events. *Genetic Resources and Crop Evolution*. **2011**, *58*, 571–583.
- [5] Rodrigues, D.; Astolfi, S.; Clement, C. Molecular marker-mediated validation of morphologically defined landraces of Pejibaye (*Bactris gasipaes*) and their phylogenetic relationships. *Genetic Resources and Crop Evolution*. **2004**, *51*, 871–882.
- [6] Clement, C.; Manshardt, R. A review of the importance of spines for pejibaye heart-of-palm production. *Scientia Horticulturae*. **2000**, *83*, 11-23.
- [7] Bereau, D.; Benjelloun, B.; Banoub, J.; Bravo, R. FA and Unsaponifiable Composition of Five Amazonian Palm Kernel Oils. *Journal of the American Oil Chemist's Society*. **2003**, *80*, 49-53.
- [8] Monge, R.; Campos, H. Tocopherol and carotenoid content of foods commonly consumed in Costa Rica. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2011**, *24*, 202–216.

- [9] Rojas, C.; Pérez, A.; Bustos, J.; Vaillant, F. Identification and quantification of carotenoids by HPLC-DAD during the process of peach palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.) flour. *Food Research International*. **2011**, *44*, 2377–2384.
- [10] Deenik, J.; Ares, A.; Yost, R. Fertilization response and nutrient diagnosis in peach palm (*Bactris gasipaes*): a review. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*. **2000**, *56*, 195–207.
- [11] Boniche, J.; Alvarado, A.; Molina, E.; Ares, A.; Smyth, T. Respuesta del pejibaye para palmito a la fertilización con fósforo en la zona norte de Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. **2008**, *32*, 31-54.
- [12] Chaimsohn, F.; Villalobos, E.; Mora, J. El fertilizante orgánico incrementa la producción de raíces en pejibaye (*Bactris gasipaes* K.). *Agronomía Costarricense*. **2007**, *31*, 57-64.
- [13] Boniche, J.; Alvarado, A.; Molina, E.; Smyth, T. Descomposición y liberación de carbono y nutrimentos de los residuos de cosecha en plantaciones de pejibaye para palmito en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. **2008**, *32*, 73-86.
- [14] Wood, C.; Adams, J.; Wood, B. Encyclopedia of Soils in the Environment. **2005**, 387-393.
- [15] Hawkesford, M.; Horst, W.; Kichey, T.; Lambers, H.; Schjoerring, J.; Møller, I.; White, P. Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. **2012**, *3*, 135-189.
- [16] Skoog, D.; West, D.; Holler, F. Fundamentos de Química Analítica. **1997**, *4*.
- [17] López, J.; Imperial, S.; Valderrama, R.; Navarro, S. An improved Bradford protein proteins assay for collagen. *Clinica Chimica Acta*. **1993**, *220*, 91-100.
- [18] Fountoulakis, M; Juranville, J.; Manneberg, M. Comparison of the Coomassie brilliant blue, bicinchoninic acid and Lowry quantitation assays, using non-glycosylated and glycosylated proteins. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **1992**, *24*, 265-274.

- [19] Redmile, M.; Armenise, E.; White, R.; Hirsch, P.; Goulding, K. A comparison of two colorimetric assays, based upon Lowry and Bradford techniques, to estimate total protein in soil extracts. *Soil Biology & Biochemistry*. **2013**, *67*, 166-173.
- [20] Stephenson, F. Calculations of Molecular Biology and Biotechnology. **2010**, *2*, 369-412.
- [21] Antharavally, B.; Mallia, K.; Rangaraj, P.; Haney, P.; Bell, P. Quantitation of protein using a dye-metal-based colorimetric protein assay. *Analytical Biochemistry*. **2009**, *385*, 342–345.
- [22] Saint-Denis, T.; Goupy, J. Optimization of a nitrogen analyser based on the Dumas method. *Analytica Chimica Acta*. **2004**, *515*, 191–198.
- [23] Amamcharla, J.; Metzger, L. Evaluation of a rapid protein analyzer for determination of protein in milk and cream. *Journal of Dairy Science*. **2010**, *93*, 3846-3857.
- [24] Pavia, D.; Lampman, G.; Kriz, G.; Vyvyan, J. Introduction to Spectroscopy. **2008**, *4*.
- [25] Kato, H.; Kugimiya, T. Effects of ethanol on growth of rice seedlings. *Plant Growth Regulation*. **2001**, *35*, 93-96.
- [26] Mibus, H.; Hoff, K.; Serek, M. Ethanol treatment induces compact growth in *Kalanchoë*. *Scientia Horticulturae*. **2014**, *168*, 234–239
- [27] Langa, S.; Landete, J.; Martín, I.; Rodríguez, E.; Arqués, J. *In situ* reuterin production by *Lactobacillus reuteri* in dairy products. *Food Control*. **2013**, *33*, 200-206.
- [28] Tobajas, M.; Mohedano, A.; Casas, J.; Rodríguez, J. A kinetic study of reuterin production by *Lactobacillus reuteri* PRO137 in resting cells. *Biochemical Engineering Journal*. **2007**, *35*, 218-225.

- [29] Guo, C.; Daomao, Y.; Yaquin, X.; Hongwen, C. Influence of Conditions on Reuterin Accumulation by Resting Cell Biotransformation Process. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. **2011**, *19*, 1023-1027.
- [30] El-Ziney, M.; Arneborg, N.; Uyttendaele, M.; Debevere, J.; Jakobsen, M. Characterization of growth and metabolite production of *Lactobacillus reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures. *Biotechnology Letters*. **1998**, *20*, 913-916.
- [31] Sung, H.; Chen, C.; Liang, H.; Hong, M. A natural compound (reuterin) produced by *Lactobacillus reuteri* for biological-tissue fixation. *Biomaterials*. **2003**, *24*, 1335-1347.
- [32] Talarico, T.; Dobrogosz, W. Chemical Characterization of an Antimicrobial Substance Produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **1989**, 674-679.
- [33] Fu, X.; Feng, F.; Huang, B. Physicochemical characterization and evaluation of microemulsion system for antimicrobial activity of glycerol monolaurate. *International Journal of Pharmaceutics*. **2006**, *321*, 171-175.