



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**

*La Universidad Católica de Loja*

**ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMEDICA**

**TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**“Identificación de oxalato en setaria *sphacelata*”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

AUTOR: Luzón Ramírez, Fernando David

DIRECTOR: Burneo Valdivieso, Juan Ignacio, PhD.

LOJA – ECUADOR

2017



*Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>*

*Septiembre, 2017*

## **APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

PhD

Juan Ignacio Burneo Valdivieso

## **DOCENTE DE LA TITULACIÓN**

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: Identificación de oxalato en *Setaria sphacelata* realizado por Fernando David Luzón Ramírez ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Enero del 2017

.....

PhD. Juan Ignacio Burneo Valdivieso

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Fernando David Luzón Ramírez declaro ser autor (a) del presente trabajo de Titulación: Identificación de oxalato en *Setaria sphacelata* , de la Titulación Bioquímica y Farmacia , siendo el PhD Juan Ignacio Burneo Valdivieso director (a) del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

.....  
Autor: Fernando David Luzón Ramírez  
Cédula: 1105112880

## **DEDICATORIA**

Esta tesis se la dedico a Dios y a la Virgen del Cisne, quiénes supieron guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaron, enseñándome a enfrentar las adversidades para no desfallecer en el intento.

A mi mis padres, en especial a mi mamá Martha Ramírez que hace todo en la vida para que pueda conseguir mis sueños y objetivos planteados, y que hoy gracias a ella puedo ver alcanzada esta meta.

A Camila y Emilia razones de mi vida..., ni esta vida me alcanzará para comprender lo afortunado que soy por recibir, sus cariñosas sonrisas a cada instante.

A mi abuelita Rosario Luna, por su siempre eterno amor y fortaleza de espíritu, valores que me dieron la pauta para elegir mi carrera universitaria.

A mis amigos, y familiares ya que de una u otra manera contribuyeron para el logro de mi meta y han fomentado en mí el deseo de superación.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios, por las bendiciones derramadas, por la vida y por la capacidad que me dio para culminar con esta etapa en mi vida, a la Virgen del Cisne por ser mi respuesta en toda necesidad y mi fortaleza en toda debilidad y por haberme brindado sabiduría para cumplir este logro.

A la Universidad Técnica Particular de Loja, de manera especial al anterior Departamento de Ciencias Agropecuarias y de Alimentos, que me dieron la oportunidad para realizar este trabajo.

A la Dra. Julia Adams y al Prof. Dr. H.C. E. Beck, así como a la Universidad de Bayreuth, Alemania, y a la Fundación Alemana para la Investigación Científica (DFG), por el cofinanciamiento de este trabajo.

Al Doctor Juan Ignacio Burneo Valdivieso por orientar este trabajo, gracias por la confianza, paciencia y constancia; al Ph.D. Eduardo Valarezo Valdez y Ph.D. Edwin Daniel Capa Mora por impartir con generosidad sus conocimientos para la realización de esta investigación.

A mis padres, por sus sabios consejos, por creer en mí y por brindarme todo su apoyo incondicional en cada momento para el logro de esta meta.

También agradezco a mi compañera y gran amiga Ana Jackeline Michay Caraguay, quien de manera incondicional me ayudó en los análisis de laboratorio, para llevar a cabo este trabajo. Gracias Amiga.

Y finalmente a todas las personas que de una u otra forma ayudaron para la realización de mi investigación, por todos los ánimos y apoyo brindado.

## ÍNDICE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
INDICE DE TABLAS .....	ix
ABREVIATURAS .....	x
RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN.....	12
CAPÍTULO I.....	15
MARCO TEÓRICO.....	15
1.1.    Las plantas Forrageras .....	16
1.2.    Setaria .....	17
1.2.1.    Setaria <i>sphacelata</i> .....	17
1.3.    Cromatografía .....	18
1.3.1.    Cromatografía de capa fina.....	18
1.4.    Oxalatos.....	19
1.4.1.    Biom mineralización en plantas .....	20
1.4.2.    Oxalato de calcio en la salud humana.....	20
1.4.3.    Oxalato de calcio en la salud animal .....	20
CAPITULO 2. ....	22
MATERIALES Y MÉTODOS .....	22
2.1.    Metodología para la fase de campo .....	23
2.2.    Metodología para la fase de laboratorio.....	23
2.2.1.    Preparación de muestra para los análisis: .....	23
2.2.2.    Separación de Fases .....	24
2.2.3.    Siembra .....	25
2.2.4.    Revelado.....	26
2.2.5.    Análisis en el Software Just Tlc.....	27
.....	28
2.2.6.    Análisis estadístico .....	28
.....	29
CAPÍTULO 3. ....	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29
3.1.    Identificación de Oxalato .....	30
3.2.    Evaluación de los diferentes estadios de fertilización .....	32
3.3.    Evaluación de la cantidad de fertilizante necesaria para un adecuado desarrollo de la planta Setaria <i>sphacelata</i> y una baja producción de oxalato. ....	35
CONCLUSIONES .....	39
RECOMENDACIONES .....	40

<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>41</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>46</b>
<b>Anexo 1.....</b>	<b>47</b>
<b>Anexo 2.....</b>	<b>48</b>
<b>Anexo 3.....</b>	<b>50</b>
<b>Anexo 4.....</b>	<b>51</b>
<b>Anexo 5.....</b>	<b>53</b>
<b>Anexo 6.....</b>	<b>54</b>
<b>Anexo 7.....</b>	<b>54</b>
<b>Anexo 8.....</b>	<b>55</b>
<b>Anexo 9.....</b>	<b>56</b>
<b>Anexo 10.....</b>	<b>57</b>



## INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Estructura del oxalato de calcio. ....¡Error! Marcador no definido.
- Figura 2. Muestra de *Setaria sphacelata* seca y triturada. ....¡Error! Marcador no definido.
- Figura 3. Muestra de *Setaria sphacelata* sometidas a incubación, para su respectiva separación de fases. ....¡Error! Marcador no definido.
- Figura 4. Siembra y corrida de placas TLC. ....¡Error! Marcador no definido.
- Figura 5. Revelado de placas TLC. ....¡Error! Marcador no definido.
- Figura 6. Resultados arrojados por el programa. ....¡Error! Marcador no definido.
- Figura 7. Placa cromatográfica en capa fina, TLC con presencia de Oxalato de calcio soluble. ....¡Error! Marcador no definido.
- Figura 8. Placa cromatográfica en capa fina, TLC con presencia de Oxalato de calcio soluble. ....¡Error! Marcador no definido.
- Figura 9. Representación estadística del crecimiento lineal, versus el tipo de tratamiento al cual fueron sometidas las plántulas de *Setaria sphacelata* en el primer corte (30 días).....¡Error! Marcador no definido.
- Figura 10. Representación estadística del crecimiento lineal, versus el tipo de tratamiento al cual fueron sometidas las plántulas de *Setaria sphacelata* en su segundo corte (60 días). ....¡Error! Marcador no definido.
- Figura 11. Representación estadística del crecimiento lineal, versus el tipo de tratamiento al cual fueron sometidas las plántulas de *Setaria sphacelata* en el tercer corte (120 días). ....¡Error! Marcador no definido.

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración de oxalato, perteneciente al corte 2 .....	37
Tabla 2. Análisis de correlación entre variables de concentración y altura en diferentes cortes.....	38

## ABREVIATURAS

**CHCl<sub>3</sub>**: Cloroformo

**CH<sub>3</sub>OH**: Metanol

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**: Ácido Sulfúrico

**T0**: Tratamiento con 0 fertilización

**T50**: Tratamiento con 0.5 g de fertilización

**T100**: Tratamiento con 1 g de fertilización

**T150**: Tratamiento con 1.5 g de fertilización

**C1**: Corte número 1 (30 días)

**C2**: Corte número 2 (60 días)

**C3**: Corte número 3 (120 días)

**ml** : mililitro

**fR**: factor de retención

**g** : gramos

**μL**: micro litro

**cm<sup>2</sup>** : centímetros cuadrados

**O<sub>2</sub>CCO<sub>2</sub>** - : Acido oxálico

**CCF**: Cromatografía de capa fina

**CaC<sub>2</sub>O<sub>4</sub>**: Oxalato de calcio

## RESUMEN

Se planteó un diseño experimental con 28 plántulas de *Setaria sphacelata* provenientes de la estación científica San Francisco las mismas que fueron resembradas, una vez que las plántulas se adaptaron se realizó tratamientos de fertilización. T0 (sin fertilización), T50 (0,5 g de nitrógeno/ 1000 ml de agua) T100 (1g de nitrógeno/1000ml ), T150 (1.5g de nitrógeno/ 1000ml), realizado esto establecemos los cortes post fertilización. Corte 1 ( C1) se lo llevó a cabo un mes luego de realizada la fertilización, Corte 2 (C2) luego de dos meses y por ultimo Corte 3 (C3) llevado a cabo luego de cuatro meses.

Los resultados obtenidos fueron la presencia de oxalato de calcio en *Setaria sphacelata*, evidenciada en las placas de TLC, por otro lado la fertilización llevada a cabo mostro un efecto positivo hacia el crecimiento lineal de las plantas en los diferentes tiempos de corte.

Los resultados finales indican que los tratamientos promueven el óptimo crecimiento lineal de la planta. Destacando el tratamiento T150 por presentar un desarrollo lineal optimo y una concentración de oxalato de 22.60 ppm la cual esta encasillada dentro de los valores no tóxicos para el ganado.

**Palabras clave:** Nitrógeno, Fertilización, *Setaria sphacelata*, TLC, Oxalatos

## ABSTRACT

An experimental design was proposed with 28 *Setaria sphacelata* seedlings from the San Francisco scientific station, which were re-planted, once the seedlings were adapted, the fertilization treatments were performed. T0 (without fertilization), T50 (0.5 g nitrogen / 1000 ml water) T100 (1g nitrogen / 1000ml), T150 (1.5g nitrogen / 1000ml), once finished the post fertilization cuts were established. Cut 1 (C1) was carried out one month after fertilization was done, Cut 2 (C2) after two months and finally Cut 3 (C3) was carried after four months.

The results obtained were the presence of calcium oxalate in *Setaria sphacelata*, evidenced in the TLC (Thin Layer Chromatography), on the other hand the fertilization showed a positive effect towards the linear growth of the plants in the different cutting times.

The final results show that the treatments promote the optimal linear growth of the plant. Emphasizing the treatment T150 for presenting an optimum linear development and an oxalate concentration of 22.60 ppm which is enclosed within the non-toxic values for livestock.

**Key words:** Nitrogen, Fertilization, *Setaria sphacelata*, TLC, Oxalates.

## INTRODUCCIÓN

El análisis de tejidos vegetales, consiste en la determinación de la composición química de la planta. Actualmente se considera como una referencia indispensable para saber los requerimientos nutricionales de plantaciones así como los estados carenciales de elementos presentes en las plantas (Legaz et al., 2005).

Las fabáceas (Fabaceae) son una familia del orden de las fabales. Reúne árboles, arbustos y hierbas perennes o anuales, fácilmente reconocibles por su fruto tipo legumbre y sus hojas compuestas y estipuladas. Es una familia de distribución cosmopolita con aproximadamente 730 géneros y unas 19.400 especies, lo que la convierte en la tercera familia con mayor riqueza de especies. Se ha estimado que alrededor del 16% de todas las especies arbóreas en los bosques lluviosos neotropicales son miembros de esta familia. Asimismo, las fabáceas son la familia más representada en los bosques tropicales lluviosos y en los bosques secos de América, África y Australia. (Camargo 2000)

La Setaria (*Setaria spachelata*) es un pasto originario del Trópico Húmedo, su importancia radica en que constituye una buena alternativa para la alimentación del ganado bovino. Ya que permite a ganaderos disponer de un recurso forrajero (alimentario) para incrementar la producción de leche y carne (Sánchez, 2011).

Los oxalatos son compuestos orgánicos muy comunes en las plantas, sin embargo hay algunas especies, como las forrajeras, que se identifican por contener grandes cantidades de este compuesto, este es el caso de la *Setaria spachelata*, que es considerada como productora de intoxicaciones agudas y osteodistrofia fibrinosa al ser consumida por el ganado (Caspe et al., 2009)

Se ejecutó una investigación bibliográfica en donde se logró recopilar la metodología más adecuada para la determinación de oxalato soluble, la cual básicamente busca la extracción a través del material vegetal seco y una solución de metilación EMS (ácido sulfúrico, metanol y cloroformo) una solución que contiene oxalato la cual se la siembra en placas de cromatografía de capa fina TLC. La importancia de esta determinación radica en que el oxalato soluble puede conducir a la toxicosis aguda y otras alteraciones a nivel del

aparato excretor en los rumiantes, mientras el oxalato insoluble se cree que no presenta un efecto perjudicial sobre el metabolismo del cuerpo, ya que pasa a través del tracto digestivo y de esta manera es más fácil su excreción (Mljanur et al., 2011).

La UTPL, a través de su laboratorio de química de suelos, tiene desarrollado las metodologías para análisis físico químicos de los suelos agrícolas y foliares, sin embargo se cree conveniente la implementación de análisis del tipo bioquímico para de esta manera analizar los componentes vegetales, para brindar un mejor servicio y asesoramiento en cuanto a fertilización, ya sea en investigaciones, trabajos de consultorías o asesoramiento a pequeños y grandes productores agrícolas y ganaderos del sur del país.

El presente trabajo es elaborado con la finalidad de analizar parámetros relacionados con la determinación de oxalato soluble, en diferentes tratamientos de fertilización, ya que este es un precursor de la producción de oxalato en las especies forrajeras. La implementación de estos análisis es de total importancia en la carrera de bioquímica y farmacia ya que como analista de laboratorio se ha aplicado técnicas de Química Analítica, Bioquímica y Análisis de laboratorio.

El análisis llevado a cabo nos dará una indicación precisa de la absorción de las cantidades de nitrógeno por la planta y su metabolización, debido a que las hojas son muy sensibles a los cambios de la composición del medio nutritivo (Valenzuela et al., 2000). De los resultados obtenidos dependerán las medidas a tomar para controlar los estándares de fertilización. Las dosificaciones acertadas de fertilización mineral u orgánica permitirán el adecuado desarrollo de los cultivos agrícolas, lo cual se logra mediante un análisis bioquímico de los tejidos vegetales (Legaz et al., 2005).

Para poder cumplir con el desarrollo de este trabajo se ha planteado los siguientes objetivos.

### **Objetivo General**

Identificar la presencia de oxalato soluble en hojas de *Setaria sphacelata*, sometidas a diferentes tratamientos de fertilización con nitrógeno.

### **Objetivo Específicos**

- Contribuir al estudio bioquímico de plantas forrajeras, identificando la presencia de oxalato soluble en las hojas de Setaria (*Setaria sphacelata*). Además de su posterior evaluación en los diferentes estadios de fertilización.
- Establecer la cantidad de fertilizante necesaria para un adecuado desarrollo de la planta *Setaria sphacelata* y una baja producción de oxalato.



## **CAPÍTULO I**

### **MARCO TEÓRICO**

## 1.1. Las plantas Forrageras

Las principales especies forrajeras pueden ser divididas en dos familias: Gramíneas (poaceae) y Leguminosas (fabaceae), las mismas que pueden ser suministradas como alimento a los animales, sea verde, seco o procesado. Ambas pertenecen a la clase Angiosperma (del latín angi-, encerrada, y del griego esperma, semilla, nombre común de la división o filo que contiene las plantas con flor, que constituyen la forma de vida vegetal dominante). Presentan similitudes en la polinización, fertilización y estructura de sus flores (poseen cáliz con dos sépalos, corola formada por pétalos, además de estambres y pistilos) y el hecho de que sus semillas están cubiertas por algunas estructuras (Alejandro & Correa, 2016)

**Gramíneas:** producen un tipo especial de semilla llamado "grano" que es rico principalmente en carbohidratos pero también suele contener algo de aceite y proteínas. Su función primordial para el organismo es proporcionar calorías, o sea, energía. En cada región del mundo se han originado una o varias gramíneas útiles que formaron el "pan" local: maíz, trigo, arroz, mijo, centeno, cebada, avena, etc. Actualmente los cultivos de estas plantas se encuentran en casi todas partes del mundo y no sólo en las áreas en que se originaron. Esta familia presenta un gran número de especies (más de 6000), que se adaptan a diversas condiciones de climáticas y de suelo. Proporcionando así una muy buena alternativa alimenticia tanto para el ser humano como para los animales, por su fácil adaptación a las diferentes regiones climáticas del mundo (Arciniegas & Vega, 2015)

**Leguminosas:** denominadas también "legumbres" son alimentos con un gran aporte nutritivo. Se presentan, en general, como granos secos separados de las vainas donde se producen. Algunas de ellas alfalfa, algarrobo, poroto, trébol. Gracias a su capacidad para captar el nitrógeno molecular gaseoso, producen semillas con una gran cantidad de proteínas, que son los compuestos estructurales de las células vivas. Casi en cada región del mundo existe alguna leguminosa de importancia básica en la dieta: frijol, haba, papas, lenteja, alubia, chícharo, garbanzo, etc. Aunque en realidad estos grupos forman una parte pequeña de la población mundial y la gran mayoría de los seres humanos depende de alguna o varias leguminosas como fuente importante de proteínas. En nuestro país es el frijol (poroto) es la leguminosa de más importancia. Esta familia es más numerosa que la de las gramíneas, 15 mil especies, se diferencian de otras familias por rasgos morfológicos

importantes, como frutos contenidos en una vaina o legumbre y flores de variado tamaño y vistosidad (Alejandro & Correa, 2013).

## **1.2. Setaria**

Es un género de plantas herbáceas perteneciente a la familia de las poaceae. Es originario de las regiones templadas y tropicales del mundo.

Son plantas anuales, cuyas hojas con vaina pelosa o glabra; lígula representada por una fila de pelos; limbo plano. Inflorescencia en panícula espiciforme, densa, con eje escábrido o pubescente. (West, 2015) Pedúnculos de las espiguillas con numerosas setas rígidas, antrorsas o retrorso-escábridas, persistentes. Espiguillas cortamente pedunculadas, ovadas o elípticas, con flor inferior masculina o estéril y la superior hermafrodita. Glumas, desiguales, membranosas, más cortas que las flores o la superior tan larga como las flores; la inferior con 1- 3 nervios y la superior con 5-7 nervios. Flor inferior con lema tan larga como la de la flor superior, con 5-7 nervios, membranosa; pálea membranosa. Flor superior con lema con 5 nervios poco marcados, coriácea; pálea casi tan larga como la lema y con 2 quillas, endurecida en la madurez (Moore, 2015)

### **1.2.1. Setaria *sphacelata***

*Setaria sphacelata* es una gramínea subtropical la misma que es originaria de África tropical y subtropical, y se cultiva ampliamente en todo el mundo como pastos de hierba y de forraje la misma presenta una amplia variación de formas y tipos dando lugar a numerosas descripciones de especies afines. Algunos investigadores han propuesto considerarla como una sola especie mientras que otros han presentado diferentes formas de agrupamiento según especies. Estas son plantas perennes, cespitosas, rizomatosas o estoloníferas, de crecimiento vigoroso, tallos finos que alcanzan de 60-150 cm. de altura. Abundantes hojas largas y finas, provistas de una vaina foliar dura y persistente que protege a los brotes tiernos (Mas, 2007). La inflorescencia es una panícula compacta, semejante a una espiga, que semilla profusamente y la inflorescencia es una panoja cilíndrica compacta. La planta se extiende rápidamente por medio de rizomas y por resiembra natural. (León, 2008). Su importancia radica en que constituye una buena alternativa para la alimentación del ganado bovino. Ya que permite a ganaderos disponer de un recurso forrajero (alimentario) para

incrementar la producción de leche y carne (Sánchez, 2011). Una característica indeseable en variedades de Setaria, es la acumulación de oxalato hasta niveles que pueden resultar fatales a los rumiantes (Sánchez, 2011).

### 1.3. Cromatografía

Es una técnica que permite la separación de los componentes de una mezcla debido a la influencia de dos efectos contrapuestos.

- **Retención:** Efecto producido sobre los componentes de la mezcla por una fase estacionaria, que puede ser un sólido o un líquido anclado a un soporte sólido.
- **Desplazamiento:** Efecto ejercido sobre los componentes de la mezcla por una
- fase móvil, que puede ser un líquido o un gas (Kolthoff et al., 2008).

El fenómeno de migración de los componentes de una mezcla a lo largo de la fase estacionaria, impulsados por la fase móvil, recibe el nombre de elución. La mezcla a separar se deposita sobre la fase estacionaria, mientras que la móvil atraviesa el sistema desplazando a los componentes de la mezcla a distinta velocidad, dependiendo de la magnitud de sus interacciones relativas con ambas fases. Las dos fases se eligen de forma que los componentes de la muestra se distribuyan de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente (Jhonson & Pasto, 1977).

#### 1.3.1. Cromatografía de capa fina

Se basa en la preparación de una capa, uniforme de un absorbente mantenido sobre una placa, la cual puede ser de vidrio, aluminio u otro soporte. La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los

componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares (Guamán, 2010).

La mezcla a analizar se deposita a una pequeña distancia del borde inferior de la placa y se introduce en una cubeta que contiene la fase móvil, que asciende a lo largo de la placa por capilaridad, desplazando a los componentes de la mezcla a diferentes velocidades, lo que provoca su separación. Cuando el frente del disolvente se encuentra próximo al extremo superior de la placa esta se saca y se visualiza (Guamán, 2010).

La relación entre la distancia recorrida por un compuesto y por el disolvente desde el origen se conoce como factor de retención ( $R_f$ ) (Jhonson & Pasto, 1977).

#### 1.4. Oxalatos.

Los oxalatos son sales o ésteres del ácido oxálico (figura 1). Las sales tienen en común el anión  $-O_2CCO_2^-$ , los ésteres el motivo estructural  $R-O_2CCO_2R'$ . Los oxalatos se tratan de sustancias habitualmente reductoras y tóxicas; son tóxicas debido a que en presencia de iones de calcio forman el oxalato de calcio,  $CaC_2O_4$ , una sal muy poco soluble. De esta manera, por una parte se elimina el calcio como elemento esencial del organismo, y por otra parte si cristaliza formando un cálculo puede obstaculizar los conductos renales, por otro lado la acumulación de este tipo de compuesto tóxico en el tracto digestivo ya sea de seres humanos como animales provoca severas intoxicaciones a nivel digestivo y a nivel renal. (Barrios, 2016).

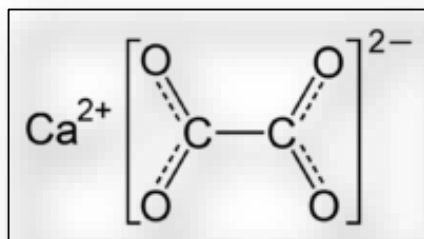


Figura 1. Estructura del oxalato de calcio.

Fuente. Oxalato.com

Los Oxalatos tienen gran importancia en los siguientes campos:

#### **1.4.1. Biomineralización en plantas**

La formación de cristales de oxalato de calcio parece jugar un papel central en importantes funciones de las plantas, entre las que se incluyen la regulación en los niveles de calcio, la protección contra la herbivoros y la destoxificación de metales pesados (Bula, 2016).

#### **1.4.2. Oxalato de calcio en la salud humana**

El oxalato soluble es altamente reductor, corrosivo y posee una gran actividad quelante, por lo cual puede ser muy tóxico. En humanos el oxalato es ingerido con muchos alimentos comunes (por ejemplo el chocolate, la espinaca, el frijol, etc.) como ácido oxálico u oxalato de calcio, adicionalmente es producido internamente como producto de desecho del metabolismo. La homeostasis del oxalato es mantenida por la degradación del oxalato por la acción de enzimas endógenas como el oxalato oxidasa y principalmente por la acción bacterial. Las bacterias responsables de la degradación residen en el tracto gastrointestinal y pertenecen principalmente al género *Oxalobacter formigenes*. Cuando se excede la capacidad de degradación del oxalato de las bacterias o enzimas endógenas, ya sea por un exceso en el consumo de alimentos ricos en oxalato o por desórdenes metabólicos, es excretado en la orina. La consecuencia más adversa de un alto contenido de oxalato en la orina es la formación de cálculos renales (Nefrolitiasis) (Bula, 2016)

#### **1.4.3. Oxalato de calcio en la salud animal**

La intoxicación aguda es más frecuente en bovinos que en otros animales. Al respecto cabe considerar que, la mayor parte de los oxalatos ingeridos son degradados por la microbiota ruminal. Al no existir previa adaptación una ingestión elevada y en tiempo breve de plantas ricas en estos compuestos condiciona alta absorción de oxalatos solubles, los cuales -al combinarse con el calcio iónico en el torrente circulatorio- originan una hipocalcemia aguda que puede llevar a la muerte. Por otra parte, la elevada absorción de oxalatos solubles lleva a la precipitación de cristales de oxalato de calcio en las paredes de arteríolas de la mucosa gastrointestinal, de los capilares pulmonares y de los túbulos renales, con lesión de tales órganos (Arteaga, 2016).

En general, el cuadro agudo se presenta entre 2 y 8 horas después de iniciarse el consumo de plantas ricas en oxalatos. La intoxicación en este tipo de ganado es severa y rápido, siendo frecuente encontrar muertos o en estado comatoso a estos animales al iniciarse la sintomatología, el ganado afectado se observa deprimido y desorientado, pronto aparece temblor, debilidad progresiva y ataxia. Además, se presenta profusa salivación y líquido espumoso de color rosado, taquicardia, disnea, midriasis, cesación de movimientos ruminales, meteorismo leve y cólico. Puede ocurrir hemoglobinuria, por cuanto altos niveles circulantes de oxalatos causan destrucción de glóbulos rojos. Finalmente los animales caen y generalmente adoptan la posición pleurotótona que se observa en la hipocalcemia bovina (Arteaga, 2016). En forma paralela se detecta rigidez en distintos grupos musculares, especialmente en el cuello, propia de la tetania causada por la severa hipocalcemia. Es posible la presentación de convulsiones premortales.

En cuanto a la forma crónica de la intoxicación, la combinación de oxalatos solubles con el calcio dietético en el intestino afecta la absorción de este mineral al formarse oxalato de calcio inabsorbible; por ello, el consumo prolongado de plantas moderadamente ricas en oxalatos solubles suele provocar trastornos esqueléticos, particularmente cuando la dieta no es suplementada con cantidades adecuadas de calcio y vitamina D (Gaston et al., 2016).

Las consideraciones anteriores permiten explicar la presentación de osteomalacia, afección manifestada por cojera, dolor articular, fracturas espontáneas o provocadas por traumatismos menores, en animales que ingieren dietas moderadamente ricas en oxalatos por períodos prolongados. En bovinos la osteomalacia adopta la modalidad de "osteodistrofias fibrosa", frecuentemente causada por el prolongado pastoreo de estos animales en praderas constituidas fundamentalmente por plantas del género *Setaria*. Cabe recordar, finalmente, que la precipitación de oxalato de calcio en el sistema tubular renal puede provocar una nefrosis oxálica que se manifiesta por intensa proteinuria y hematuria. (Gaston et al., 2016)

## **CAPITULO 2.**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**



## **2.1. Metodología para la fase de campo**

Para el presente trabajo se utilizó plántulas de *Setaria sphacelata* provenientes de Estación Científica San Francisco la misma que está ubicada en la provincia de Zamora Chinchipe, a 30 Km. de la ciudad de Loja, en el límite Norte del Parque Nacional Podocarpus.

Se planteó un diseño experimental con 28 plántulas de *Setaria sphacelata* ( 7 plántulas por tratamiento) véase Anexo 1. Las mismas que fueron sembradas en macetas que contenían 8 kilos de suelo, procedente de la Estación Científica San Francisco, una vez que las plántulas estaban adaptadas a las macetas se realizaron los tratamientos de fertilización T0 (no tienen ningún tipo de fertilización), T50 (0,5 g de nitrógeno/ 1000 ml) T 100 (1g de nitrógeno/ 1000 ml), T150 (1.5g de nitrógeno/ 1000 ml), realizamos un primer corte con la finalidad de dejar todas las plantas a una misma altura y posterior evaluación de su crecimiento lineal teniendo en cuenta los diferentes tipos de tratamiento de fertilización. Realizado esto se establecen los cortes post fertilización es decir Corte 1 ( C1) se lo lleva a cabo un mes luego de realizada la fertilización, Corte 2 (C2) luego de dos meses y por último Corte 3 (C3) llevado a cabo luego de cuatro meses.

## **2.2. Metodología para la fase de laboratorio**

### **2.2.1. Preparación de muestra para los análisis:**

Secar las hojas de la planta a 60 °C en estufa con circulación de aire, por 12 horas aproximadamente, eliminando la humedad de la hoja. Se procede finalmente a triturar las hojas de la planta hasta obtener un material vegetal totalmente fino. (figura 2)



**Figura 2.** Muestra de *Setaria sphacelata* seca y triturada.

**Fuente:** El Autor

### **2.2.2. Separación de Fases**

Posterior a la preparación de la muestra, procedemos a pesar 0.2 g de muestra vegetal (seco y triturado), añadimos 5 ml de solución de metilación (EMS), el mismo proceso lo repetimos para la elaboración de nuestro estándar de ácido oxálico, como nuestro estándar es líquido, medimos 200  $\mu$ L y se adiciona 5 ml EMS.

La solución de metilación se preparó mediante la adición de ácido sulfúrico concentrado (5 ml) a la mezcla de 2 : 1 (v / v) de cloroformo anhidro y metanol absoluto. Esta mezcla mediante una reacción de metilación, adiciona de un grupo metilo ( $\text{CH}_3$ ) a un sustrato. En nuestro caso adicionara un grupo metilo al oxalato, permitiéndonos así extraer la fase orgánica del material vegetal en donde se encuentra el oxalato en su estado soluble.

Estableciendo un blanco para el análisis posterior, incubamos a 40<sup>0</sup> C por 90 min. Transcurrido el tiempo de incubación, añadimos 1 ml de agua destilada a las nuestras, estándar y blanco. Las muestras se separan en dos fases diferentes, la parte superior procedemos a eliminar luego filtramos la fase inferior. (figura 3)

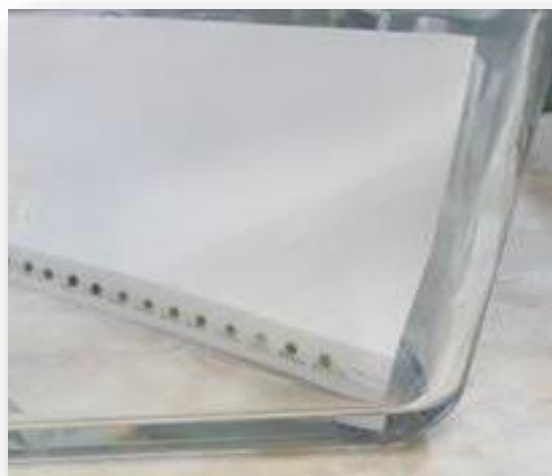


**Figura 3.** Muestra de *Setaria sphacelata* sometidas a incubación, para su respectiva separación de fases.

**Fuente:** El Autor

### **2.2.3. Siembra**

Del resultado de la filtración (fase inferior), pipeteamos 5  $\mu$ l para la siembra en la placa de Cromatografía en Capa Fina (TLC) placas de sílice  $\text{NH}_2$  amino-modificado, las cuales cuentan con un grosor de capa de 250  $\mu\text{m}$  con una área de placa de 20 por 20  $\text{cm}^2$ , una vez realizada la siembra sumergimos la placa en benceno. El mismo que funciona como disolvente o solvente permitiendo la dispersión de compuestos, el mismo que asciende entonces por capilaridad a lo largo de la placa (TLC), arrastrando a los compuestos a diferentes velocidades en este caso el Oxalato, según el grado de adsorción de éstos produciéndose así su separación. Además, también se podría decir que es la sustancia que disuelve al soluto (Oxalato) y que se encuentra en mayor proporción. Transcurridos unos minutos, cuando el disolvente se encuentra próximo al extremo de la placa, se saca de la cámara, se deja secar y se examina. Los compuestos que avanzan a lo largo de la placa se ven atraídos por fuerzas electrostáticas sobre la superficie del adsorbente, interaccionando el disolvente con ambos. Esta interacción competitiva establece las velocidades relativas con que ascienden por la capa de adsorbente. (Figura 4)



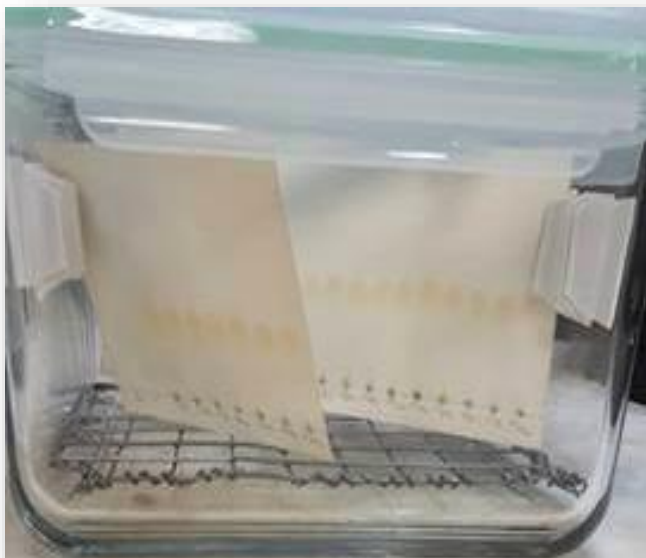
**Figura 4. Siembra y corrida de placas TLC.**

**Fuente:** El Autor

#### **2.2.4. Revelado**

Una vez seca la placa de TLC la sometemos en un recipiente cerrado, a una atmosfera de amoniac (figura 5), hasta que se revele el oxalato en la placa, el mismo que se presenta en forma circular con una coloración marrón intensa posterior a ello incubamos la placa a 50 °C por 30 min para su fijación definitiva. (Gyatten Roughand & Roger Slack, 1973).

Una vez revelada la placa de TLC se procede a medir la distancia que recorrió el oxalato. Este dato nos ayuda a la determinación del factor de retención  $t_R$ , este se calcula dividiendo la distancia recorrida por el soluto (oxalato de calcio) para la distancia que recorrió la fase móvil (benceno).



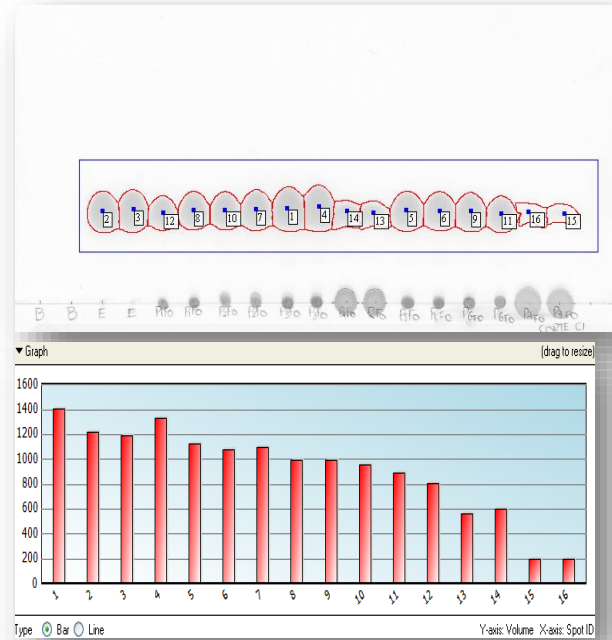
**Figura 5.** Revelado de placas TLC.

**Fuente:** El Autor

#### **2.2.5. Análisis en el Software Just Tlc**

Una vez reveladas las placas de TLC se procede a su escaneo, la imagen resultante de este proceso fue sometida a un posterior análisis utilizando software Just TLC para la cuantificación de compuestos en placas de TLC midiendo en área de las manchas y su factor de retención (figura 6).

ID	Series	Rf	Area
1	None	0.477	16604
2	None	0.445	14748
3	None	0.464	14410
4	None	0.495	16019
5	None	0.458	14866
6	None	0.452	14284
7	None	0.464	14510
8	None	0.458	13250
9	None	0.445	13461
10	None	0.458	13197
11	None	0.421	12537
12	None	0.427	11430
13	None	0.427	9808
14	None	0.452	9458
15	None	0.421	7662
16	None	0.439	8106



**Figura 6.** Resultados arrojados por el programa.

**Fuente:** El Autor

### 2.2.6. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente, donde la media de las muestras analizadas se efectuó mediante ANOVAS de una vía con el test de Tukey, con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ . Para ello se utilizó el programa SPSS versión 17.0.

## **CAPÍTULO 3.**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 3.1. Identificación de Oxalato

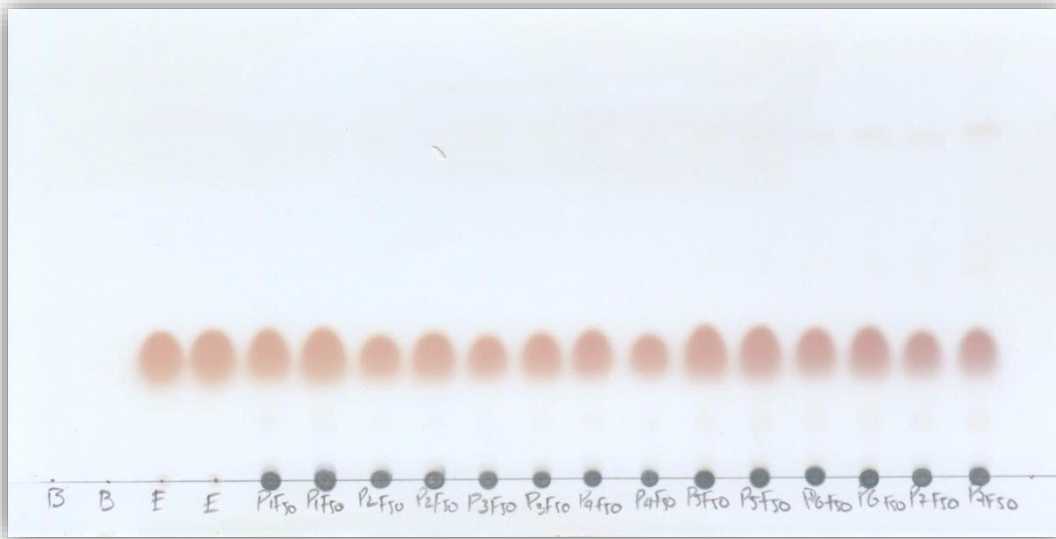
En nuestro trabajo se identificó la presencia de oxalato de calcio en hojas de *Setaria sphacelata* mediante la técnica de cromatografía de capa fina CCF, Figura 7 y 8. Investigaciones similares respaldan el uso de esta técnica cualitativa es el caso de (Meyyanathan et al., 2004) que utilizó la cromatografía de capa fina para la detección de simvastatina en preparaciones farmacéuticas, dichos autores manifiestan que gracias a esta técnica pudieron establecer que las simvastatinas muestran una forma circular con una tonalidad amarilla brillante luego de haber sido reveladas con una disolución de etanol más vainillina. Estos resultados se verificaron posteriormente con un análisis cuantitativo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) donde efectivamente pudieron encontrar simvastatinas en preparaciones farmacéuticas.

Los análisis llevados a cabo en nuestra investigación mediante TLC revelaron la presencia de oxalato de calcio soluble en las hojas de *Setaria sphacelata*, como se puede observar en la Figura 7 y 8, este patrón, es decir la presencia de oxalato en forma circular y de color marrón oscuro, se hizo presente en todos los cortes y los diferentes intervalos de tiempo en los que llevaron a cabo los cortes (30, 60, 120 días) así como en los diferentes tratamientos de fertilización con nitrógeno.

Este resultado se respalda al evidenciar también la presencia de oxalato en los estándares utilizados, los mismos que presentaron una concentración de 10, 25, 50 y 100 ppm de ácido oxálico. Estos estándares al ser analizados, arrojaron como resultado la presencia de oxalato evidenciado en las placas de TLC en forma circular y color marrón oscuro. Anexo 8

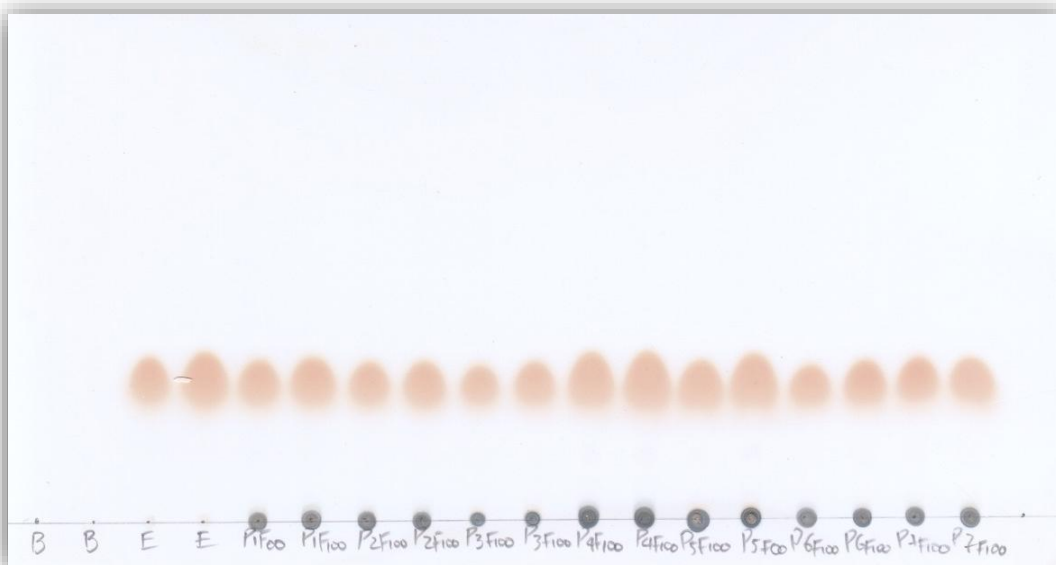
Los oxalatos son compuestos muy frecuentes en plantas forrajeras y forman parte de las sustancias presentes en el metabolismo de bovinos como en seres humanos, teniendo en cuenta que este compuesto en dosis bajas no produce cambios en el metabolismo de ambos individuos. Pero al contrario cuando su cantidad supera los niveles aceptables puede causar daños a nivel renal y afectar el sistema óseo llegando a producir hasta la muerte del individuo que haga el consumo excesivo de este compuesto (Arroyo et al., 2009).





**Figura 7. Placa cromatografica en capa fina, TLC con presencia de Oxalato de calcio soluble. P1F50:** Planta 1 Tratamiento de fertilización 50, **P2F50:** Planta 2 Tratamiento de fertilización 50, **P3F50:** Planta 3 Tratamiento de fertilización 50, **P4F50:** Planta 4 Tratamiento de fertilización 50, **P5F50:** Planta 5 Tratamiento de fertilización 50, **P5F50:** Planta 5 Tratamiento de fertilización 50, **P6F50:** Planta 6 Tratamiento de fertilización 50, **P7F50:** Planta 7 Tratamiento de fertilización 50.

**Fuente:** El Autor



**Figura 8. Placa en capa fina, TLC con presencia de Oxalato de calcio soluble. P1F100:** Planta 1 Tratamiento de fertilización 100, **P2F100:** Planta 2 Tratamiento de fertilización 100, **P3F100:** Planta 3 Tratamiento de fertilización 100, **P4F100:** Planta 4 Tratamiento de fertilización 100, **P5F100:** Planta 5 Tratamiento de fertilización 100, **P5F100:** Planta 5 Tratamiento de fertilización 100, **P6F100:** Planta 6 Tratamiento de fertilización 100, **P7F100:** Planta 7 Tratamiento de fertilización 100.

**Fuente:** El Autor

En un estudio realizado por (Gyatten Roughand & Roger Slack, 1973) utilizaron la misma técnica con diferentes tipos de especies forrajeras en donde estuvo incluida la *Setaria sphacelata*, luego de haber realizado los análisis a los diferentes tipos de especies los resultados demostraron la presencia de oxalato de calcio en cromatografía de capa fina TLC. Este oxalato se manifestaba de color marrón oscuro, y forma circular.

Según (Miyazaki et al., 2003), el oxalato de calcio al encontrarse revelado en las placas de TLC presenta un  $tR= 0.5$  el mismo que se encuentra dentro del rango clasificándolo al mismo como oxalato de calcio, demostrando así que efectivamente los resultados de nuestro trabajo concuerdan con esos trabajos ya que el compuesto que fue identificado es el oxalato de calcio  $tR$ : de 0.5.

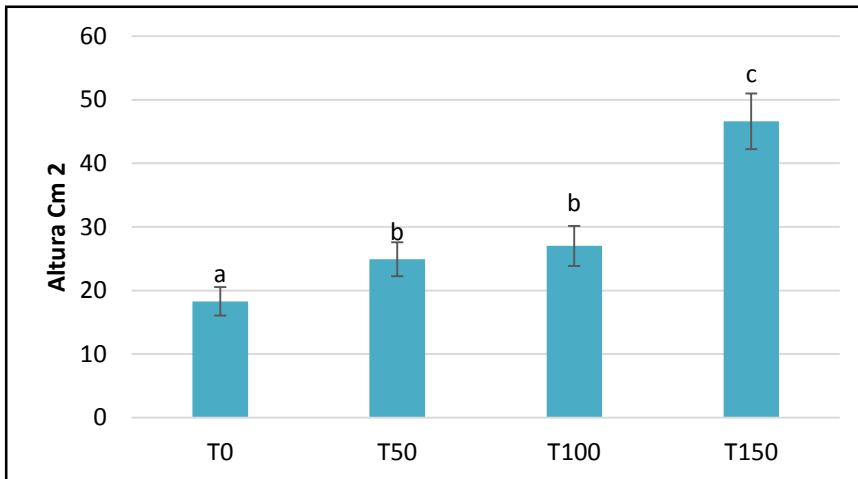
### **3.2. Evaluación de los diferentes estadios de fertilización**

Se puede reportar que la concentración de fertilizante utilizado en los diferentes tratamientos de nuestra investigación modifica en función a la edad el desarrollo de las hojas, es decir, las plántulas que fueron sometidas a tratamientos más concentrados de fertilizante (T150) y su corte se realizó a mayor edad (120 días), mostraron un crecimiento lineal más significativo, como se puede observar en las figura 9, 10 y 11. Al contrario de las otras plántulas que no tuvieron fertilización, o una baja concentración de fertilizante y un tiempo de corte más reducido, su desarrollo lineal fue menor que las anteriores concordando con (Bendersky et al., 2006) el mismo que realizó un análisis fertilizando parcelas de *Setaria sphacelata*, este ejecutó cortes para evaluar si existe diferencia entre el tiempo de corte 60, 90 y 120 días, con diferentes cantidades de Nitrogeno 0,75 y 150 kg N ha<sup>-1</sup>. Los resultados de ese estudio indican que el rendimiento y la estructura del forraje de setaria son afectados por el período de aplazamiento y la fertilización con nitrógeno. Bajo las condiciones de ensayo el mayor rendimiento de planta viva se alcanzó a 120 días y 75 kg N ha<sup>-1</sup>.

Al realizar el análisis estadístico de nuestros resultados se puede observar que estos presentan una diferencia estadística significativa entre ellos, en la Figura 9 existe dicha diferencia teniendo en consideración el crecimiento lineal y el tipo de tratamiento que

estos tienen, ya que el Tratamiento T0 obtuvo una altura media de 18.2 cm<sup>2</sup>, esto indica que este tratamiento varía con todos los demás.

Las plantas con tratamientos de T50 alcanzaron una altura de 24.9 cm<sup>2</sup>, con el T100 una altura de 27 cm<sup>2</sup>, y los Tratamientos T50, T100 no presentan diferencias estadísticas significativas, es decir, no hay influencia de la cantidad de fertilizante que se coloque en las plántulas, ya que su crecimiento lineal va a ser similar a los treinta días, por otro lado el T150 fue el que mostró una diferencia entre todos los tratamientos observándose un crecimiento lineal óptimo de la planta con 46.6 cm<sup>2</sup> en un corte referente a 30 días.

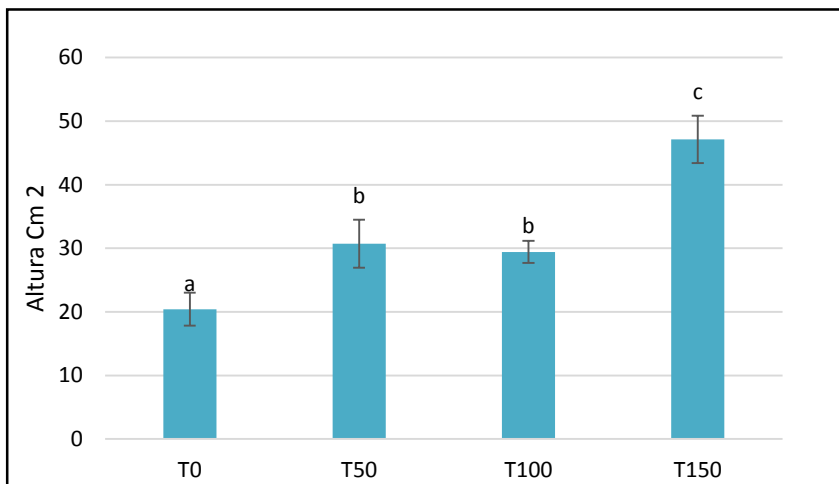


**Figura 9. Representación estadística del crecimiento lineal, versus el tipo de tratamiento al cual fueron sometidas las plántulas de *Setaria sphacelata* en el primer corte (30 días).**

Fuente: El Autor

Por otro lado la Figura 10 muestra el corte número 2 que se lo realizó luego de 60 días, este segundo corte muestra el mismo patrón de crecimiento entre las plántulas de *Setaria sphacelata* siendo el crecimiento lineal variante entre los tratamientos. Las plantas bajo el tratamiento T0 alcanzaron un altura media de 20.4cm<sup>2</sup>. Cabe destacar que el tratamiento T50 obtuvo un crecimiento lineal de 30.7 cm<sup>2</sup> y el tratamiento con fertilización T100 alcanzó una media en su altura de 29.4 cm<sup>2</sup> ambos tratamientos siguen la misma tendencia del corte uno llevado al cabo en 30 días, debido a que su crecimiento lineal muestra ligera diferencia visual, pero no presenta diferencia estadística significativa, mientras que el

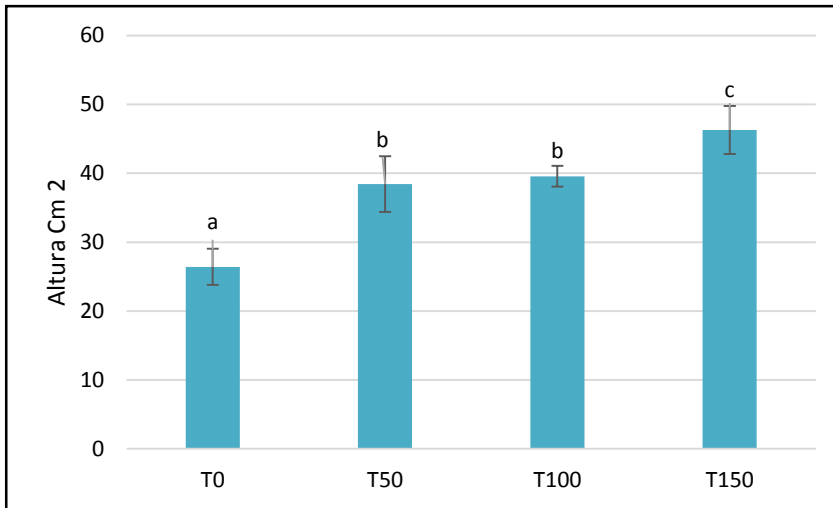
tratamiento T150 al cabo de 60 días es el que nos indica que el crecimiento lineal de nuestras plántulas es mas sobresaliente que el resto de tratamientos en este corte con una media de 47.14 cm<sup>2</sup>.



**Figura 10. Representación estadística del crecimiento lineal, versus el tipo de tratamiento al cual fueron sometidas las plántulas de *Setaria sphacelata* en su segundo corte (60 días).**

Fuente: El Autor

Al observar la Figura 11 la cual nos indica nuestro tercer corte que se efectuó luego de 120 días, las diferencias entre los tratamientos es puntual, es decir, el tratamiento T0 muestra un crecimiento lineal de 26.4 cm<sup>2</sup> los tratamientos T50 obtuvo un crecimiento de 38.4 cm<sup>2</sup> y el tratamiento T100 alcanzó una altura media de 39.5 cm<sup>2</sup>, en estos tratamientos el crecimiento de *Setaria sphacelata* fue similar sin diferencias significativas estadísticas pero si visuales, por lo que se mantienen un patrón parecido al de los cortes anteriores. Mientras que el tratamiento T0 muestra una marcada diferencia al igual que la que presento en los cortes anteriores, siendo este el que presenta el menor crecimiento lineal que el resto de tratamientos, al contrario que el tratamiento T150 que obtuvo un crecimiento lineal de 46.2 cm<sup>2</sup> el mismo que presenta un desarrollo adecuado a lo largo de los 120 días.



**Figura 11. Representación estadística del crecimiento lineal, versus el tipo de tratamiento al cual fueron sometidas las plántulas de *Setaria sphacelata* en el tercer corte (120 días).**

Fuente: El Autor

### **3.3. Evaluación de la cantidad de fertilizante necesaria para un adecuado desarrollo de la planta *Setaria sphacelata* y una baja producción de oxalato.**

Es importante tener en cuenta que la respuesta a la fertilización está determinada por la humedad del suelo y las lluvias, durante un período de sequía no es conveniente aplicar fertilizantes, ya que el nitrógeno puede llegar a causar efectos tóxicos en la pastura (Borrajo & Pizzio, 2006). En diversos ensayos de fertilización con urea a diferentes tiempos de corte, se lograron aumentos entre un 15 a 25 % más de pasto, respecto a la pastura sin nitrógeno (Tomei, et al., 2009). Según, Borrajo & Pizzio (2006) deberá realizarse una fertilización con urea, para la cual se recomienda 60-70 kg/ha, con éste último estamos agregando nitrógeno al suelo que contribuye de manera significativa en el crecimiento lineal de los pastos forrajeros tomando en cuenta que a praderas que no son fertilizadas con urea su desarrollo lineal se mantiene bajo.

El nitrógeno en las gramíneas es un factor dominante que controla los procesos de formación de casi todos los tejidos vegetales, encontrándose respuestas positivas al mismo en la generalidad de los pastos tropicales contribuyendo al incremento de tallos fértiles

(Bilbao Et al., 2000). Los resultados obtenidos por nosotros, figuras 9, 10 y 11 muestran un comportamiento similar, obteniéndose la mayor producción con la adición de 1.5 g de N/ 1000, (T150) en los diferentes intervalos tiempo. Logrando un incremento en la altura lineal, sobre las que no se fertilizan o tienen una fertilización inferior a la mencionada.

Una vez observadas las características arrojadas por nuestras plántulas, tras ser sometidas a diferentes tratamientos de fertilización T0, T50, T100 y T150, el tratamiento de fertilización T150 (1.5 g de fertilizante/ 1000 ml) es el que nos presenta un adecuado desarrollo lineal durante el transcurso del análisis llevado a cabo en los diferentes cortes, sobresaliendo en el segundo corte realizado trascurridos los 60 días después de que las plántulas fueron fertilizadas, este presenta un promedio de crecimiento lineal de 47. 14 cm<sup>2</sup> siendo este el promedio mas significativo en cuanto a la altura de todos los cortes, por otro lado la concentración de oxalato es proporcional a esto ya que a mayor crecimiento lineal y mayor tiempo de corte de la planta, la cantidad de oxalato en estas plantas aumenta significativamente encontrándose en estas plántulas un promedio de 22.60 ppm, ver tabla 1, . Miyazaki et al., (2003) manifiesta en su estudio que los valores menores a 24,5 ppm de oxalato de calcio son considerados como no tóxicos para el ganado. De esta manera pueden ser consumidas las especies vegetales forrajeras que contengan valores inferiores a mencionados, sin causar ningún tipo de alteración al metabolismo del animal.

**Tabla 1.** Concentración de oxalato, perteneciente al corte 2

Concentración ppm	Tratamiento T150
<b>ID</b>	<b>c2-60</b>
3	27.84
4	26.89
5	34.96
6	29.75
7	21.80
8	28.40
9	22.38
10	16.95
11	15.00
12	16.23
13	29.30
14	14.63
15	11.27
16	20.99
Media	22.60

Fuente: **El Autor**

(Rojas et al., 2007) realizó análisis por difracción de rayos X en la especie *Opuntia ficus* indica reportando que la concentración de oxalato de calcio se modifica en función de la etapa de desarrollo de la penca, es decir. El oxalato de calcio se encuentra en mayor concentración en pencas de nopal cuya fase de desarrollo es más adulta comparado con las pencas cuya etapa de crecimiento es más temprano (Rodríguez et al., 2007). Concordando de esta manera con los resultados llevados a cabo, a pesar de que en nuestro estudio utilizamos otra metodología y otra especie vegetal.

Esto lo podemos verificar gracias a un análisis de correlación significativa Tabla 2, que nos muestra que estas variables son dependientes es decir que mientras mas alta sea la planta más será la concentración de oxalato presente en estas, ya que el valor de  $p=0.006$  siendo este un valor aceptable lo que nos da la pauta para establecer esta correlación entre variables aceptando la hipótesis.

**Tabla 2. Análisis de correlación entre variables de concentración y altura en diferentes cortes.**

		Conc_30	Conc_60	Conc_120
Altura_30	Correlación de Pearson	.397*	.224	.272
	Sig. (bilateral)	.036	.252	.162
	N	28	28	28
Altura_60	Correlación de Pearson	.403*	.190	.327
	Sig. (bilateral)	.029	.334	.090
	N	28	28	28
Altura_120	Correlación de Pearson	.506**	.211	.352
	Sig. (bilateral)	.006	.281	.066
	N	28	28	28

\*\*La correlación es significativa al nivel 0.001 (bilateral)

\*La correlación es significante al nivel de 0.05 (bilateral)

**Fuente:** El Autor

Por otro lado al enfocar el análisis de correlación a plantas con menor estatura y menor tiempo de corte nos indica que la concentración de oxalato de calcio es menor a la que indicamos con anterioridad 13.12 ppm siendo esta concentración de oxalato no toxica para el ganado como lo manifiesta (Miyazaki et al., 2003), al igual que nuestro resultado anterior nos basamos en el valor de  $p=0.036$  el mismo que es aceptable arrojando una correlación y de esta manera establecimos, la relación que hay entre estas variables analizadas. De la misma manera podemos indicar en base a los resultados que el mejor tratamiento es el la



fertilización para la obtención de una baja concentración de oxalato y un desarrollo lineal óptimo es T150 con 47.14 cm<sup>2</sup> este desarrollo se llevó a cabo luego de 60 días con una producción de 22.60 ppm de oxalato de calcio.

### CONCLUSIONES

- La separación cromatográfica del extracto de la *Setaria sphacelata*, obtenido a través de una solución de metilación condujo a la identificación cualitativa del oxalato de calcio mediante cromatografía de capa fina TLC.
- Podemos indicar que el mejor tratamiento de fertilización para la obtención de una concentración baja de oxalato y un desarrollo lineal óptimo es el tratamiento T150 (1.5 g de N/1000ml) ya que este permite un desarrollo lineal de la planta de 47.14 cm<sup>2</sup> con una producción de 22.60 ppm de oxalato de calcio, la misma que es considerada como baja.
- Este proyecto ofrece un método de medición para el oxalato de calcio. Esto puede ser efectivo para monitorear las concentraciones de oxalato soluble en las gramíneas para evitar envenenamiento provocado por este compuesto.
- La fertilización nitrogenada es una herramienta útil para incrementar la producción de biomasa y el desarrollo lineal de la *Setaria sphacelata*, ya que el nitrógeno cumple una función vital en el desarrollo de los tejidos vegetales en las plantas.

## RECOMENDACIONES

- Continuar con el estudio de *Setaria sphacelata* realizando el aislamiento e identificación del oxalato de calcio soluble utilizando cromatografía de gases HPLC.
- La muestra seca y triturada debe estar guardada en una funda bien sellada y libre de humedad.
- Establecer curvas de calibración con ácido oxálico para minimizar los errores del método.
- Realizar trabajos de investigación similares con otras especies del género en la búsqueda de variantes en la producción de oxalato, dentro de las cuales podemos mencionar el kikuyo, alfalfa, pasto llanero.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arroyo, R., Santiyán, M., & Rodríguez, F. (2009). Diferencias entre las intoxicaciones del vacuno en sistemas de explotación intensivo y extensivo. *Revista de Toxicología*
- Alejandro, S. & Correa, M. (2016). Manual De Forrajes. *Educación Agraria*, Preliminar, Argentina
- Alejandro, S. and Correa, M. (2013). Manual De Forrajes. *Educación Agraria*, Preliminar, Caracas
- Arteaga, C. (2016). Oxalato. Recuperado de [http://www.ropana.cl/plantas\\_toxicas/oxal.htm](http://www.ropana.cl/plantas_toxicas/oxal.htm) [Accessed 10 Jul. 2016].

- Arciniegas, G. & Vega, M. (2015). Manual de Pastos y Forrajes. Instituto Nacional Tecnológico. Recuperado de [https://www.jica.go.jp/project///nicaragua/007/materials/ku57pq0000224spz-att/Manual\\_de\\_Pastos\\_y\\_Forrajes.pdf](https://www.jica.go.jp/project///nicaragua/007/materials/ku57pq0000224spz-att/Manual_de_Pastos_y_Forrajes.pdf) [Accessed 5 Jul. 2016]
- Barrios, E. (2016). Ácido oxálico - *Oxalato*. Recuperado de [http://www.oxalato.com/cido\\_oxlico](http://www.oxalato.com/cido_oxlico) [Accessed 8 Aug. 2016].
- Bula, C. (2016). Síntesis y caracterización de oxalatos de metales. *Departamento de Ingeniería Química*. EPSEVG. Recuperado de <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/6774/Article.pdf>
- Bendersky, D., Brizuela, A., Altuve, S., Cid, M., & Barbera, P. (2006). Rendimiento y composición estructural de forraje diferido de *Setaria sphacelata* cv. Narok. *Reunión del Grupo Técnico en Forrajeras del Cono Sur, Grupo Campos*
- Borrajo, C., & Pizzio, R. (2006). Manual de producción y utilización de *Setaria*. *Proyecto ganadero de Corrientes, Argentina*.
- Bilbao, B., Febles, G., & Matías, C. (2000). Fertilización nitrogenada y momento de cosecha en la semilla de *Cenchrus ciliaris* cv Biloela. I. Producción y calidad de la semilla. *Pastos y Forrajes, Cuba*.
- Caspe, S., Barbera, P., & Bendersky, D. (2009). Plantas Tóxicas De La Provincia De Corrientes. *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina*
- Camargo, S. (2000). Descripción, distribución, anatomía, composición química y usos de *Mimosa tenuiflora* (Fabaceae-Mimosoideae) en México. *Revista de Biología tropical*,
- Legaz, D., Serna, P., Ferrer, V., Cebolla, E. (2005). Análisis de hojas, suelos y aguas para el diagnóstico nutricional de plantaciones de cítricos, análisis de hojas, suelos y aguas para el diagnóstico nutricional de plantaciones de cítricos, procedimiento de toma de muestras. Gráficas Fortuny S.L.

- Guamán, A. (2010). Aislamiento de alcaloides de 5 especies alucinógenas de la familia Lycopodiaceae usadas en medicina ancestral por los Rikuyhampiyachak (visionarios) de la Etnia Saraguro – Ecuador. UTPL
- Gaston, S., Bendersky, D. & Barbera, P. (2016). Pantas toxicas de la provincia de corrientes. Estacion Experimental Agropecuaria mercedes corrientes, Venezuela.
- Gyatten Roughand, P., & Roger Slack, C. (1973). Simple Methods for Routine Screening an Quantitative Estimation of Oxalate Content of Tropical Grasses, Nueva Zelanda.
- Jhonson, C., & Pasto, D. (1977). Determinación de estrcuturas orgánicas.(Ed) Reverté, Madrid-Ecuador
- Kolthoff, E., Sandell, E., Meshan,S. (2008). Análisis Químico Cuantitativo. (Ed) Nigar S.R.L, Buenos Aires-Argentina
- León, R. (2008). Pastos y forrajes. Manejo y producción. (Ed) Científicas Agustín Álvarez A. Cia. Ltda, Costa Rica
- Mas, C. (2007). *Setaria sphacelata*. Una gramínea a tener en cuenta. *Revista INIA*, Argentina.
- Mancilla, L. & Valbuena, J. (2016). La Agricultura Forrajera Sustentable Con El Manejo De Bovinos A Pastoreo. *Produccion Animal*. Recuperado de [http://www.avpa.ula.ve/congresos/cd\\_xi\\_congreso/pdf/forrajera.pdf](http://www.avpa.ula.ve/congresos/cd_xi_congreso/pdf/forrajera.pdf)
- 
- Mljanur,R., Mitsuhiro, N., & Kawamura, O. (2011). *Simple method for determination of oxalic acid in forages using high-performance liquid chromatography*. Kagoshima University, Faculty of Agriculture,. Grassland Science Blackwell Publishing Ltd. Japan

- Meyyanathan, S., Ramasarma, G., & Suresh, B. (2004). Análisis de la simvastatina en preparaciones farmacéuticas mediante cromatografía de capa fina de alto rendimiento, Granada
- Miyazaki, S., Yamanaka, N., & Guruge, K. (2003). Simple capillary electrophoretic determination of soluble oxalate and nitrate in forage grasses. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 15(5), Visalia
- Moore, G. (2015). Setaria. Recuperado de <https://www.agric.wa.gov.au/pasture-management/setaria> [Accessed 4 Jul. 2016].
- Rojas I., Gutiérrez C., & Gutiérrez A.(2009) . Distribución E Identificación De Los Compuestos De Calcio Presentes En La Penca De Nopal (Opuntia ficus-indica), Mexico
- Rodríguez- M., E. Hernández, M.,Cornejo, A., Palacios I., Rojas-Molina, R. Reynoso, L.C. Quintero, A. Del-Real, T.A. Zepeda and C. Muñoz-Torres. (2007). Physicochemical characterization of nopal pads (Opuntia ficus indica) and vacuum nopal powders as a function of the maturation. *Plant Foods for Human Nutrition*, Mexico
- Sanches, J. (2011). ESTABLECIMIENTO DE UNA PRADERA Setaria splendida (Setaria *sphacelata*) PARA ORTE, EN LA FINCA PUNZARA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA. *UNL* , Ecuador
- Tomei, C., Oreña, D., Elsa, M., Castelán, M., & Hack, C. (2009). Efecto del agregado de P e inoculación con Azospirillum en el establecimiento de Setaria *sphacelata* cv. Kazungula en un Haplustol Entico, Corrientes-Argentina.

- West, J. (2015). Setaria. Recuperado de <http://www.dpi.nsw.gov.au/agriculture/pastures-and-rangelands/species-varieties/pf/factsheets/setaria> Departament of Primary Industries. California
- West, J. (2015). Setaria for coastal pastures. Recuperado de <http://www.dpi.nsw.gov.au/agriculture/pastures-and-rangelands/species-varieties/pf/factsheets/setaria-for-coastal-pastures> Departament of Primary Industries. Australia.

## **ANEXOS**



## Anexo 1

Plantas de *Setaria sphacelata* sometidas a diferentes tratamientos de fertilización T0, T50, T100 y T150



Plántulas de *Setaria sphacelata*.

Fuente: El Autor



Plántulas de *Setaria sphacelata*.

Fuente: El Autor.

## Anexo 2

### Preparación de reactivos:

#### SOLUCION DE METILACION EMS

67ml Cloroformo – 100ml

x                      170ml

x = 114 ml de cloroformo

33ml Metanol – 100ml

x                      170ml

x = 56 Metanol (112) ml

15ml H<sub>2</sub>so<sub>4</sub> – 100ml EMS

x                      170ml EMS

x = 25.5 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

**EMS=** Cloroformo 114 ml + Metanol 56ml + H<sub>2</sub>so<sub>4</sub> 25.5

#### HIDROXILAMINA

60ml – 1g hidroxilamina

240ml – 4g hidroxilamina

#### CLORURO FERRICO ACUOSO

60g FeCl<sub>3</sub> - 100ml    w/v

X                      5ml

X = 3g

DM    100%

X        60%

X = 0.25ml – 250ul

#### ESTÁNDARES (5ml Metanol+ Acido Oxalico )

**10)** 0.7g    100%

X        10%

**X=0.07g** Acido Oxalico

**25)** 0.7g 100%

X 25%

**X=0.175g** Acido Oxalico

**50)** 0.7g 100%

X 50%

**X=0.35g** Acido Oxalico

**100)** 0.7g 100%

X 75%

**X=0.525g** Acido Oxalico

### Anexo 3

#### CONCENTRACIÓN DE OXALATO

Una vez realizada la curva de regresión lineal con las áreas resultantes de nuestros estándares, deducimos esta fórmula para determinar la concentración de cada muestra en ppm.

$$C = 11.889(\text{Área cm}^2) - 12.067$$

$$C = 11.889 (1.83) - 12.067$$

$$C = 9.68\text{ppm}$$

## Anexo 4

### Placas sin revelar



**Placas de sin revelar, P1F50:** Planta 1 Tratamiento de fertilización 50, **P2F50:** Planta Tratamiento de fertilización 50, **P3F50:** Planta 3 Tratamiento de fertilización 50, **P4F50:** Planta 4 Tratamiento de fertilización 50, **P5F50:** Planta 5 Tratamiento de fertilización 50, **P5F50:** Planta 5 Tratamiento de fertilización 50, **P6F50:** Planta 6 Tratamiento de fertilización 50, **P7F50:** Planta 7 Tratamiento de fertilización 50.

**Fuente:** El Autor



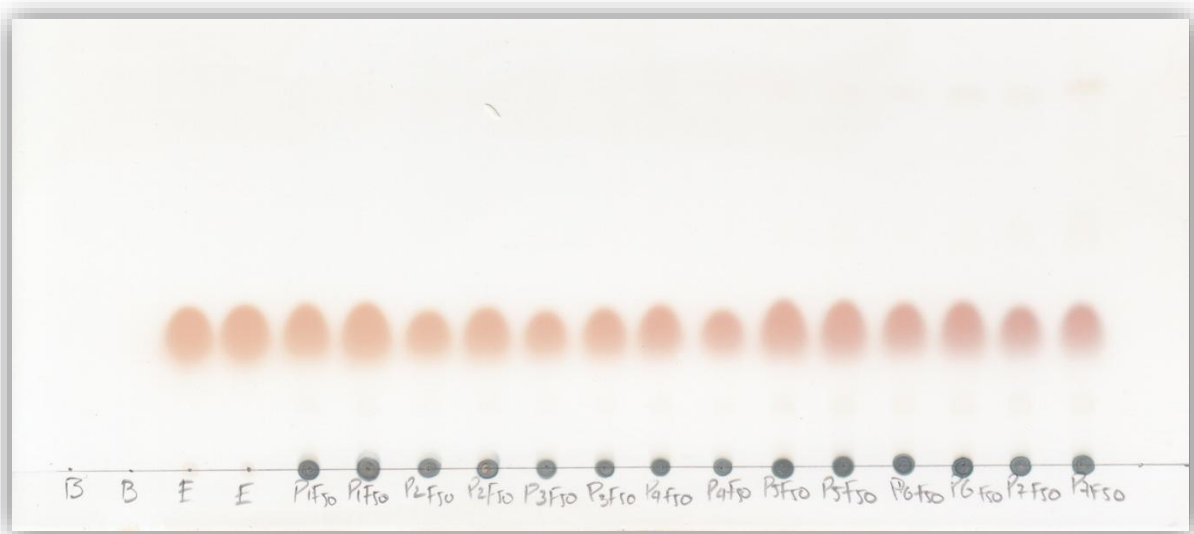
**Placas de sin revelar, P1F100:** Planta 1 Tratamiento de fertilización 100, **P2F100:** Planta 2 Tratamiento de fertilización 100, **P3F100:** Planta 3 Tratamiento de fertilización 100, **P4F100:** Planta 4 Tratamiento de

fertilización 100, **P5F100**: Planta 5 Tratamiento de fertilización 100, **P5F100**: Planta 5 Tratamiento de fertilización 100, **P6F100**: Planta 6 Tratamiento de fertilización 100, **P7F100**: Planta 7 Tratamiento de fertilización 100.

**Fuente:** El Autor

## Anexo 5

### Placa Revelada

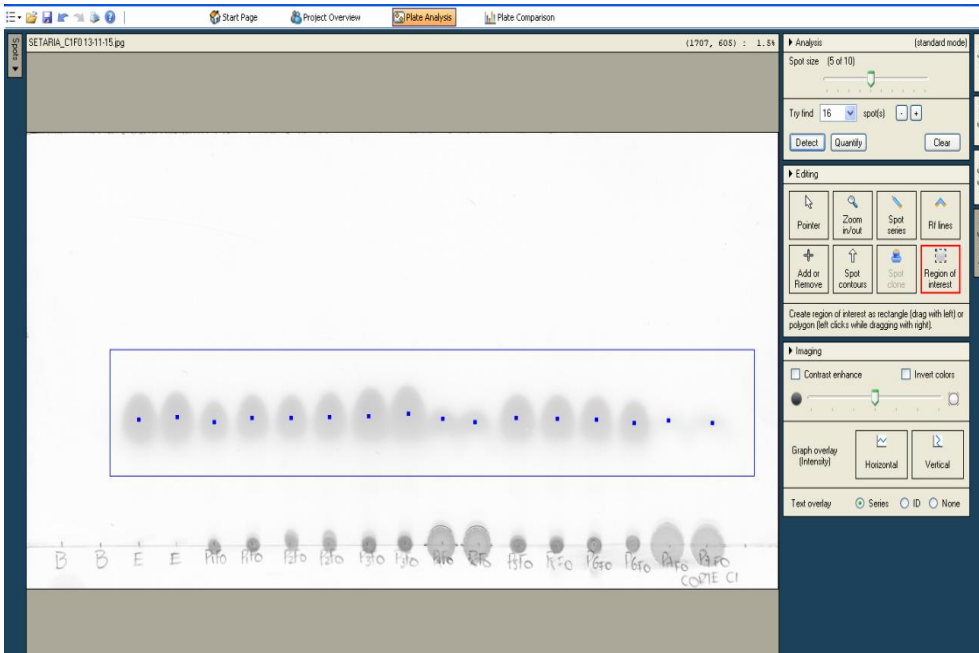


**Placa revelada, B:** Blanco, **E:** Estándar **P1F50:** Planta 1 Tratamiento de fertilización 50, **P2F50:** Planta 2 Tratamiento de fertilización 50, **P3F50:** Planta 3 Tratamiento de fertilización 50, **P4F50:** Planta 4 Tratamiento de fertilización 50, **P5F50:** Planta 5 Tratamiento de fertilización 50, **P5F50:** Planta 5 Tratamiento de fertilización 50, **P6F50:** Planta 6 Tratamiento de fertilización 50, **P7F50:** Planta 7 Tratamiento de fertilización 50.

**Fuente:** El Autor

## Anexo 6

### Placas Escaneadas en el software

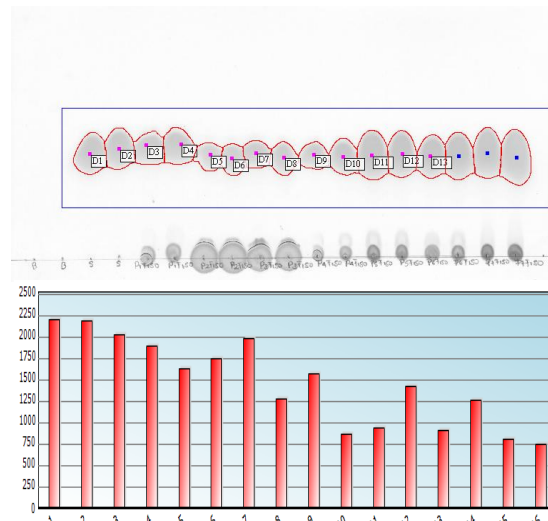


Fuente: El Autor

## Anexo 7

### Resultados arrojados por el software: área, tR.

Spots			
ID	Series	Rf	Area
1	D11	0.527	21446
2	None	0.502	23458
3	None	0.552	20013
4	D12	0.542	18840
5	D1	0.542	17673
6	D13	0.522	17495
7	None	0.522	19344
8	D10	0.512	14496
9	D2	0.592	16742
10	D9	0.537	10942
11	D8	0.507	11881
12	D4	0.642	16114
13	D7	0.552	10767
14	D3	0.632	14703
15	D6	0.498	10491
16	D5	0.532	10683

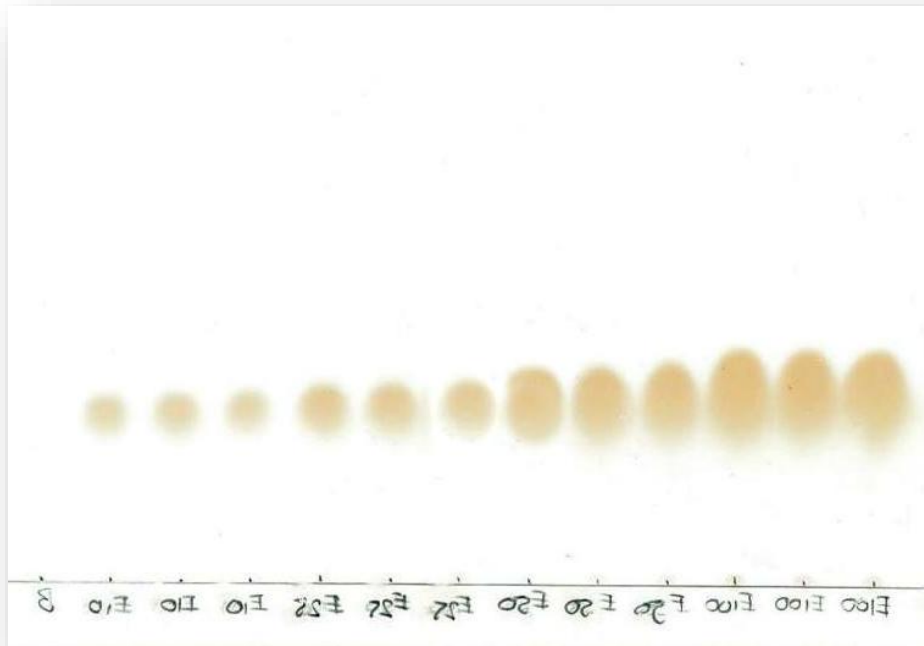




Fuente: El Autor

## Anexo 8

### Placas reveladas pertenecientes a los Estándares



**Placa revelada de estándares, B:** Blanco, E10: Estándar de 10 ppm, E25: Estándar de 25 ppm, E25: Estándar de 25 ppm, E100: Estándar de 100 ppm.

Fuente: El Autor

## Anexo 9

Matriz de datos perteneciente a la altura de todos los diferentes tipos de tratamientos.

	F0	F50	F100	F150
A L T U R A	22	28	26	45.5
	17	22	25.5	47.2
	17.5	21.5	28	40
	17	24	31.5	42
	17	24.5	30	50
	16.5	26.5	26	52
	21	28	22	49.5
	19.5	38	28	49
	19	27	28.5	47
	18.5	29	31.5	49
	20	28	32	48
	21	29	30	39
	19	33	28	50
	26	31	28	48
	26	38	40	48
	25	43	38	49
	25	39	41	50
	23	30	39	49
	30	40	38	42
	26	39	39	44
30	40	42	42	
PROMEDIO	22.19	32.61	32.92	47.08
DESV	4.36	6.71	5.97	3.79

Fuente: El Autor

## Anexo 10

Matriz de datos perteneciente a la concentración y los diferentes tipos de tratamientos.

Tratamientos	T0	T50	T100	T150
ID	c1-30	c1-30	c1-30	c1-30
3	18.61	27.14	26.71	29.86
4	21.67	23.52	25.25	34.71
5	17.90	23.59	24.53	30.88
6	16.99	24.81	24.08	33.43
7	14.08	21.13	24.56	21.80
8	13.03	19.12	22.88	28.65
9	10.07	8.24	26.96	23.64
10	8.88	5.96	21.28	15.62
11	15.84	6.14	24.66	29.43
12	12.46	6.81	25.08	13.56
13	9.74	7.39	16.12	13.93
14	9.32	5.30	16.61	7.93
15	8.81	5.54	17.82	14.53
16	6.24	4.48	15.43	20.95
media	13.12	13.51	22.28	22.78
Desv	4.55	8.94	4.07	8.59

Fuente: El Autor