



Juan David Rivera<sup>1</sup>, Yaned Milena Correa<sup>1,2\*</sup>, Juan Pablo Penagos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Investigación en Campos Electromagnéticos Medio Ambiente y Salud Pública. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Caldas. Calle 65 N° 26-10. Manizales, Colombia.

<sup>2</sup>Grupo de Investigación en Cromatografía y Técnicas Afines (GICTA). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Caldas. Sede Principal, calle 65 N° 26-10. Manizales, Colombia.

\*Autor para correspondencia: yaned.correa@ucaldas.edu.co

Recibido: 27 de Octubre de 2016. Aceptado: 15 de Febrero de 2017.

## Evaluación de métodos de extracción para la obtención del ácido giberélico en semillas germinadas de maíz (*Zea mays* L.)

### Resumen

El maíz (*Zea mays* L.) es el segundo cereal de mayor cultivo a nivel mundial el cual es empleado como materia prima en diferentes industrias. Hasta el momento no se han encontrado reportes de la obtención del ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) en esta planta. En el presente trabajo se compararon los métodos de extracción sólido-líquido por lixiviación y la extracción dinámica con disolvente asistida por sonicación (DSASE) para la obtención del GA<sub>3</sub> a partir de semillas germinadas de maíz. Los factores trabajados en la extracción por lixiviación fueron el método físico, el solvente y el tiempo, mientras que los parámetros por DSASE fueron el flujo, el solvente y el tiempo. La mayor concentración del GA<sub>3</sub> se obtuvo con el método DSASE (30,012 mg/kg), empleando como solvente acetonitrilo-ácido fórmico 5% (80:20, v:v) a un flujo de 0,4 mL/min y un tiempo de extracción de 25,0 min. La identificación y la cuantificación del GA<sub>3</sub> se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detector de arreglo de diodos (DAD). Estos resultados evidenciaron que la DSASE es una alternativa novedosa para la obtención del GA<sub>3</sub>, dada su alta eficiencia, el bajo consumo de solvente y su simplicidad en la obtención del extracto.

**Palabras clave:** fitohormonas, DSASE, lixiviación, HPLC, *Zea mays* L.

## Comparison of different extraction methods for gibberelic acid obtention from corn (*Zea mays* L.) germinated seeds

### Abstract

Corn (*Zea mays* L.) is the second most cultivated cereal in the world and is used as raw material for different kind of industries. To date no reports about obtaining gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) from corn have been found. In the present study two methods for extracting solid samples were evaluated: lixiviation and dynamic sonication-assisted solvent extraction (DSASE), for obtaining gibberellic acid from corn germinated seeds. In lixiviation, the physical method (agitation and sonication), solvent, and time were the parameters analyzed; while in DSASE the variables were: solvent, flow, and time. The most efficient technique was DSASE employing acetonitrile-formic acid 5% (80:20, v:v) as solvent at a flow of 0,4 mL/min for 25,0 min, obtaining a concentration of 30,012 mg/kg gibberellic acid. Identification and quantification were performed by high performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detector (DAD). These results showed that dynamic sonication-assisted solvent extraction (DSASE) is a novel and powerful alternative technique for obtaining gibberellic acid, because of its high efficiency; low solvent consumption and simplicity in obtaining the extract.

**Keywords:** phytohormone, DSASE, lixiviation, HPLC, *Zea mays* L.

## Avaliação de metodologias de extração para a obtenção do ácido giberélico em sementes germinadas de milho (*Zea mays* L.)

### Resumo

O milho (*Zea mays* L.) é o segundo cereal mais cultivado no mundo e é usado como matéria-prima em diferentes indústrias. Até a data não foram encontrados estudos da obtenção do ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) neste cereal. Este trabalho teve como objetivo a comparação da metodologia de extração sólido-líquido por lixiviação e a metodologia de extração dinâmica com dissolvente assistida por sonicção (DSASE) para a obtenção do ácido giberélico a partir de sementes germinadas de milho (*Zea mays* L.). Na extração por lixiviação foram avaliados diferentes parâmetros: o método físico, o solvente e o tempo; e na metodologia DSASE estes parâmetros foram: o solvente, o fluxo e o tempo. A maior concentração de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) foi obtida com a metodologia DSASE, usando como solvente acetonitrila-ácido fórmico 5% v/v (80:20), fluxo de 0,4 mL/min e tempo de extração de 25,0 min. A identificação e a quantificação do GA<sub>3</sub> foi realizada mediante cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção de arreglo de diodos (DAD). Os resultados evidenciaram que a DSASE foi uma excelente alternativa para a obtenção do ácido giberélico, por apresentar alta eficiência, pouco consumo de solvente e ser umatécnica simples para a obtenção do extrato.

**Palavras-Chave:** fitohormônios, DSASE, HPLC, *Zea mays* L.

## Introducción

El ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) (Figura 1) es una fitohormona que hace parte de la familia de los diterpenos tetracíclicos de naturaleza ácida (1). Este ejerce efectos diversos en el crecimiento y desarrollo de la planta, promueve la germinación de las semillas que se encuentran en estado de dormancia, la elongación del tallo, el brote de las yemas y el desarrollo de los frutos (2, 3). La acción del GA<sub>3</sub> en el crecimiento de los tejidos puede estar regulada por la modulación celular de sus concentraciones, por la habilidad de la célula para responder al estímulo de esta fitohormona, o por ambas (4).

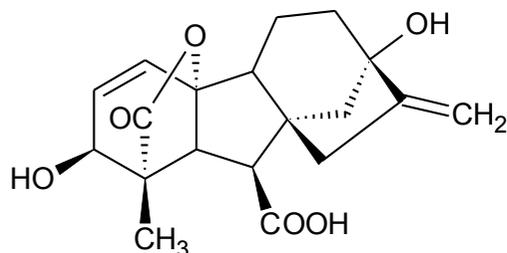


Figura 1. Estructura del ácido giberélico (GA<sub>3</sub>)

El GA<sub>3</sub> ha sido obtenido a partir de diferentes tejidos vegetales utilizando principalmente métodos de extracción sólido-líquido, procesos en los cuales se extraen uno o varios solutos de un sólido mediante la utilización de un disolvente líquido. Ambas fases entran en contacto íntimo y el soluto o los solutos pueden difundirse desde la matriz sólida a la fase líquida, lo cual produce la separación de los componentes constitutivos de la muestra (5). Para llevar a cabo la lixiviación se han utilizado diferentes tipos de disolventes tales como el metanol frío (6–9), el metanol acuoso (80% v/v) (10, 11), el metanol acuoso acidificado con ácido fórmico (0,05% v/v) (12), el acetato de etilo (13, 14), el acetonitrilo acidulado con ácido fórmico (5% v/v) (15, 16) y mezclas de isopropanol-ácido acético (17, 18). El período de extracción ha sido variable debido a que se han empleado tiempos cortos, una o dos horas (6, 16, 19, 20), hasta períodos prolongados, 24 o 48 h (21–23).

Otro método moderno de extracción sólido-líquido es la extracción dinámica con disolvente asistida por sonicación (DSASE). En este proceso la muestra es depositada en una celda por la cual hay paso continuo de solvente fresco y al mismo tiempo se aplican vibraciones acústicas con frecuencias por encima de 20 kHz, que promueven la transferencia de analitos desde la matriz en estudio hasta el disolvente. Esta técnica emplea los mismos solventes que la lixiviación, pero los tiempos de extracción y las cantidades de muestra son inferiores (24). La técnica de DSASE se ha empleado en la extracción de analitos como ésteres organofosforados, blanqueadores, colorantes y polifenoles, empleando flujos de solvente desde los 0,2 hasta 1,0 mL/min, con porcentajes de recuperación que se encuentran por encima del 85% (25–27).

Por otro lado, la cromatografía se encuentra entre las técnicas más empleadas para la identificación y la cuantificación del GA<sub>3</sub>, que tiene como ventajas mayor eficiencia en la separación y alta especificidad (11, 13, 28). La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) es preferida sobre la cromatografía de gases ya que esta última requiere la derivatización previa del analito, lo cual aumenta el grado de complejidad del análisis (29–31).

Ahora bien, el GA<sub>3</sub> ha sido evaluado por su importancia en la germinación y desarrollo de las plantas en diferentes especies vegetales como *Arabidopsis* (15), fresno blanco (21) y arroz (32). Sin embargo, no se han encontrado reportes de esta fitohormona en cereales como el maíz, el segundo cultivo más importante del mundo después del trigo (33). El maíz se cultiva en más de 140 millones de hectáreas con una producción anual de más de 580 millones de toneladas métricas. Toda la planta puede ser aprovechada y las aplicaciones posibles de este cereal incluyen alimento, forraje o materia prima para diferentes industrias (34). Adicionalmente, es de gran utilidad investigativa debido a su corto tiempo de germinación, lo que permite hacer diversidad de ensayos en los que se miden múltiples variables permitiendo alcanzar conclusiones de diferente índole (33).

El objetivo de este trabajo fue comparar los métodos de extracción por lixiviación y la extracción dinámica con disolvente asistida por ultrasonido (DSASE), con el fin de determinar el protocolo más eficiente para la obtención del ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) a partir de semillas germinadas de maíz (*Zea mays* L.).

## Materiales y métodos

### Reactivos químicos

El estándar del ácido giberélico empleado fue Sigma Aldrich (Sigma, USA); el acetonitrilo y el metanol fueron grado cromatográfico (Fisher Scientific, USA); el acetato de etilo y el ácido fórmico fueron grado analítico (Scharlau, España). El agua fue purificada empleando un sistema Direct-Q (Millipore, USA).

### Muestra de estudio

Se usaron semillas de maíz (*Zea mays* L.) variedad ICA-V305 tipo comercial producidas por la empresa Semillas del Pacífico (Cartago, Colombia). Se seleccionaron semillas sin daños visibles y con forma uniforme, con masa promedio de 0,3878 g ± 0,0002 g y volumen promedio de 0,356 cm<sup>3</sup> ± 0,008 cm<sup>3</sup>.

### Preparación de la muestra

Las semillas de maíz previamente seleccionadas se sembraron en cajas Petri (100 x 15 mm), con papel absorbente como soporte. A cada caja se le adicionaron 12,0 mL de agua destilada y se colocaron en una incubadora Incucell de 222 L sin luz, a una temperatura de 30,1 °C ± 0,1 °C. La humedad del sistema fue de 59,00% ± 3,39%. Después de 48 h, las semillas se sacaron de la incubadora y fueron trituradas con ayuda de un molino eléctrico hasta obtener un material muy fino que se guardó en bolsa con sello hermético y en nevera a -20 °C para su posterior extracción (35).

### Método de extracción sólido-líquido (lixiviación)

Para la extracción del GA<sub>3</sub> mediante lixiviación se emplearon tres solventes diferentes: solvente B, acetonitrilo-ácido fórmico 5% (80:20) (15); solvente C, metanol-ácido fórmico 5% (80:20) (13); solvente D, acetato de etilo (32). Se emplearon dos tiempos de extracción (1 y 2 h) y dos métodos extractivos diferentes, como se presenta a continuación.

**Método I: agitación orbital**

La extracción se realizó utilizando el procedimiento planteado por Stirk y colaboradores (16), con algunas modificaciones. Se adicionaron 20,0 mL del solvente de extracción (solvente B, C o D) a 10,000 g de la muestra molida y se ésta se puso en un agitador orbital durante una o dos horas. Al cabo del respectivo tiempo, el material se decantó obteniéndose un sobrenadante y un pellet; el primero se retiró y se conservó, mientras que al segundo se le adicionó una nueva porción del respectivo solvente fresco y se reextrajo dos veces más. Los sobrenadantes obtenidos se mezclaron y se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min, obteniéndose un nuevo sobrenadante el cual fue secado en rotaevaporador a 40 °C. El extracto sólido final se reconstituyó con acetonitrilo hasta un volumen de 5,0 mL previo a su análisis.

**Método II: Ultrasonido**

Se adicionaron 20,0 mL del solvente de extracción (solvente B, C o D) a 10,000 g de la muestra molida y la mezcla se puso en un equipo de ultrasonido durante una o dos horas. En el transcurso de la extracción, la temperatura del agua en el baño nunca fue superior a 35 °C. Al cabo del respectivo tiempo, el material se decantó obteniéndose un sobrenadante y un pellet; el primero se retiró y se conservó, mientras que al segundo se le adicionó una nueva porción del respectivo solvente fresco y se reextrajo dos veces más. Los sobrenadantes obtenidos se unieron y se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min, obteniéndose un nuevo sobrenadante el cual fue secado en rotaevaporador a 40 °C. El extracto sólido final se reconstituyó con acetonitrilo hasta un volumen de 5,0 mL previo a su análisis.

**Método de extracción DSASE**

El procedimiento de extracción DSASE se basó en el trabajo previo de López y colaboradores (36) y se realizó con dos solventes diferentes: solvente B, acetonitrilo-ácido fórmico 5% (80:20) (15); solvente C, metanol-ácido fórmico 5% (80:20) (13). Se empleó una celda de extracción de acero inoxidable de 3,0 mL que se llenó con 0,8000 g de muestra y se colocó en el interior de un baño ultrasonido; se controló la temperatura del agua para que nunca fuera superior a 35 °C. Posteriormente, el sistema se conectó a una bomba peristáltica que controló el flujo del solvente: (B o C) = 0,2 mL/min o 0,4 mL/min a través de la celda; la extracción se realizó por 12,5 min o 25,0 min. Al final de este periodo, se obtuvo el volumen de extracto deseado para cada una de las combinaciones de solvente y flujo.

**Condiciones cromatográficas**

Para el análisis del GA<sub>3</sub>, se utilizó un cromatógrafo líquido de alta eficiencia Shimadzu Prominence (USA), equipado con un desgasificador DGU 205 (USA), un detector de arreglo de diodos (DAD) prominente SPD-M20A (USA), un horno Shimadzu CTO-10AS VP (USA) y un automuestreador Shimadzu SIL-10AF (USA). El software empleado para el análisis de los datos fue LCsolution Shimadzu (USA).

Para la identificación y la cuantificación, se empleó la técnica de HPLC con modificaciones de la metodología planteada por Bhalla y colaboradores (13). Se utilizó una columna Supelcosil™ LC-18-DB 5,0 μm (150 x 4,6 mm). La fase móvil fue acetonitrilo-ácido fórmico 0,01% con gradiente lineal como se detalla a continuación: acetonitrilo-ácido fórmico 0,01% (10:90) 5,0 min; (70:30) 40,0 min; (10:90) 10,0 min a un flujo de 0,5 mL/min. Una alícuota de 10 μL de cada solución que contenían las giberelinas se inyectó en el cromatógrafo y fueron detectadas a una longitud de onda de 195 nm. Previo al análisis cromatográfico, todas las muestras fueron filtradas a través de membranas (QLS) de 0,2 μm de poro.

**Recta de calibración**

La recta de calibrado fue elaborada con un estándar del GA<sub>3</sub>, empleando siete niveles con concentraciones de 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 y 50,0 mg/kg. Las soluciones fueron preparadas al disolver el estándar con acetonitrilo.

**Análisis estadístico**

La optimización de los métodos de extracción por lixiviación y por DSASE se realizó mediante un ANOVA multifactorial, previa verificación de los supuestos (normalidad, homocedasticidad e independencia). Las diferencias estadísticas presentadas entre los tratamientos se analizaron mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey. La comparación entre los métodos óptimos de extracción se realizó mediante la prueba t para diferencia de medias independientes con varianzas iguales, previa verificación de tal igualdad por el test F. Los análisis fueron realizados empleando el software Statgraphics centurión XI en modo demo.

**Resultados y discusión****Recta de calibración**

El modelo obtenido a partir de la recta de calibración explica el 99,51% de la variabilidad en las áreas calculadas en función de la concentración. El límite de detección (LOD) se determinó experimentalmente eligiendo la menor concentración del analito que presentó una señal cromatográfica integrable y el límite de cuantificación (LOQ) se calculó aplicando la expresión  $LOQ = 10/3 LOD$ . Los resultados de la recta de calibración se muestran en la Tabla 1.

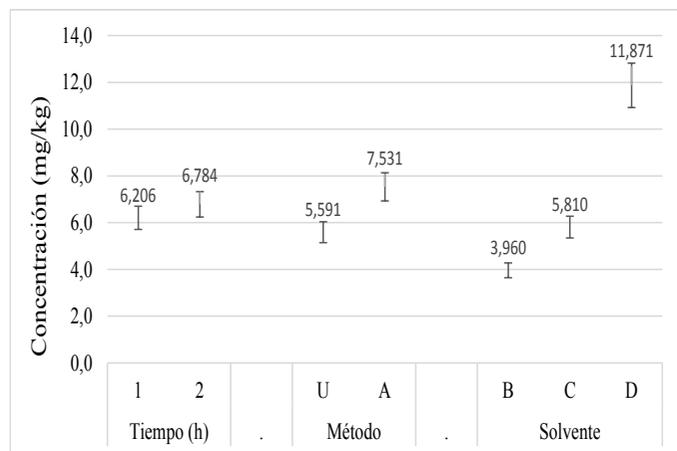
**Tabla 1.** Parámetros de la recta de calibración

Analito	Acido giberélico
$\beta_0$	0,00022
SD ( $\beta_0$ )	8,1543
$\beta_1$	21,2131
SD ( $\beta_1$ )	0,3051
R <sup>2</sup>	0,9951
LOD (mg/kg)	0,30
LOQ (mg/kg)	1,00

$\beta_0$  = Intercepto;  $\beta_1$  = Pendiente  
SD  $\beta_0$  = Desviación estándar del intercepto  
SD  $\beta_1$  = Desviación estándar de la pendiente.

## Evaluación de las condiciones de la extracción sólido-líquido

En el proceso de lixiviación para la obtención del GA<sub>3</sub> a partir de semillas germinadas de maíz, se determinó que los factores método y solvente de extracción tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre la concentración del analito en estudio. Por el contrario, el tiempo de extracción (1 y 2 h) no mostró diferencias en la obtención del GA<sub>3</sub>. Los resultados obtenidos se presentan con una significancia del 5% (Figura 2).



**Figura 2.** Resultado de los factores empleados en la extracción por lixiviación [U: ultrasonido; A: agitación; D: acetato de etilo; C: metanol-ácido fórmico 5% (80:20); B: acetoni-trilo-ácido fórmico 5% (80:20)]

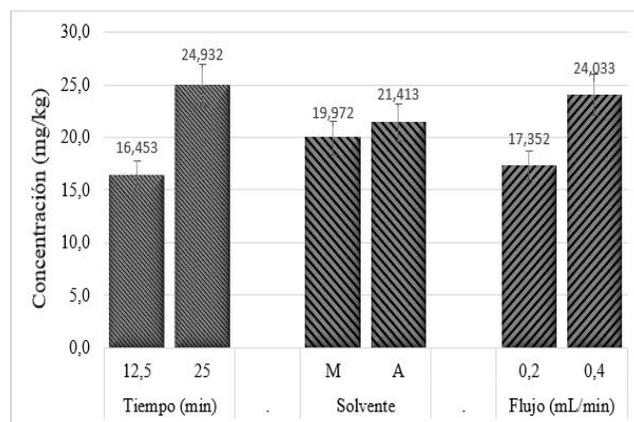
El solvente con el cual se obtuvo la mayor extracción del GA<sub>3</sub> fue acetoni-trilo-ácido fórmico 5% (80:20), obteniéndose una concentración de 11,871 mg/kg para el GA<sub>3</sub> (Figura 2). Esto concuerda con los resultados obtenidos por Urbanová y colaboradores (15), quienes realizaron extracción del GA<sub>3</sub> en *Arabidopsis thaliana* empleando diferentes combinaciones de solvente y obtuvieron como mejor resultado la mezcla de acetoni-trilo-ácido fórmico 5%. Vale la pena resaltar que el GA<sub>3</sub> es un analito de alta polaridad debido a la presencia de grupos funcionales como carboxilos, hidroxilos y lactonas en su estructura (Figura 1), por lo cual es más afín con solventes con índices de polaridad alta como el acetoni-trilo y el metanol (37). Sin embargo, se podría decir que el acetoni-trilo fue mejor en la extracción del GA<sub>3</sub>, debido a que este solvente es buen aceptor de protones, por lo cual interactúa fácilmente con solutos hidroxilados tales como el GA<sub>3</sub>, mientras que el metanol es un donador de protones e interactúa mayormente con solutos básicos (38). También es una ventaja la alta polaridad del acetoni-trilo, dado que evita la extracción de compuestos lipídicos que pueden interferir en el proceso de cuantificación (39).

De los trabajados, el mejor método físico fue la agitación, pues se obtuvo una concentración de 7,531 mg/kg (Figura 2). Este resultado podría estar relacionado con la ausencia de ondas en el solvente extractor que pueden producir la degradación del analito y, por ende, conllevar a una disminución en la concentración del GA<sub>3</sub> extraído (40). De igual manera, el método de agitación no conduce a la disociación de las moléculas de agua por lo cual no se generan radicales hidroxilos que, eventualmente, podrían reaccionar con el analito en estudio (41).

En resumen, las mejores condiciones evaluadas para extraer el GA<sub>3</sub> por medio del método de lixiviación fueron: agitación como método físico, acetoni-trilo-ácido fórmico 5% (80:20) como solvente y una hora como tiempo de extracción. Este tiempo fue el elegido dado que permite extraer la misma cantidad de GA<sub>3</sub> que al emplear dos horas y, por tanto, fue el tratamiento más eficiente.

## Evaluación de las condiciones de la extracción DSASE

Para la extracción por DSASE, los factores flujo y tiempo tuvieron diferencias estadísticamente significativas, mientras que con el factor solvente no se presentaron diferencias estadísticamente considerables, con una significancia del 5% (Figura 3).



**Figura 3.** Resultado de los factores empleados en la extracción por DSASE [C: metanol-ácido fórmico 5% (80:20); B: acetoni-trilo-ácido fórmico 5% (80:20)]

El mejor flujo dentro de los dos niveles evaluados fue 0,4 mL/min, pues permitió una desorción rápida del analito presente en la matriz. Lo anterior debido a que, posiblemente, al haber solvente fresco en tiempos cortos, las interacciones solvente-matriz repetidas veces conllevaron a un equilibrio químico, lo que facilita la obtención de una mayor cantidad de analito extraído (24, 26). Finalmente, y dado que el factor tiempo presentó diferencias significativas, siendo 25,0 min el tiempo que permitió una mayor extracción con una concentración del GA<sub>3</sub> de 24,93 mg/kg, se escogió este valor como el óptimo para la extracción por DSASE (Figura 3).

Lo anterior permitió determinar que las mejores condiciones evaluadas para la extracción del GA<sub>3</sub> por el método de DSASE fueron: acetoni-trilo-ácido fórmico 5% (80:20) con 0,4 mL/min de velocidad de flujo y un tiempo de extracción de 25,0 min.

Al comparar los procedimientos de extracción por lixiviación y DSASE, se encontró que las concentraciones medias obtenidas por los dos métodos empleados fueron diferentes con un nivel de confianza del 95%. Estos valores, así como sus desviaciones estándar, se muestran en la Tabla 2.

En la Tabla 2 se observa que la extracción por DSASE fue la más eficiente, reportándose una concentración del GA<sub>3</sub> de 30,012 mg/kg. Esta técnica tiene varias ventajas sobre la extracción por lixiviación dado que presenta bajo consumo de solvente, emplea menor cantidad de muestra, disminuye drásticamente los tiempos de extracción y es menos laboriosa al momento de implementarse (25).

**Tabla 2.** Concentración de GA<sub>3</sub> obtenida con los métodos de extracción empleados Medias ± desviación estándar

Método de extracción	Concentración GA <sub>3</sub> (mg/kg)
Lixiviación	15,062 ± 3,431
DSASE	30,012 ± 4,121

Además, al ser un sistema dinámico la muestra está continuamente expuesta al disolvente fresco, lo cual promueve la transferencia de analitos desde la matriz hasta el disolvente (24). Todo esto confirma la bondad de esta técnica por lo cual es usada en la actualidad para la obtención de diferentes biomoléculas.

## Conclusiones

Se evaluaron las mejores condiciones para la extracción del ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) en semillas de maíz (*Zea mays* L.) por lixiviación y por DSASE. Para la primera metodología los parámetros óptimos fueron agitación, con acetonitrilo-ácido fórmico 5% (80:20) y una hora. Para el segundo proceso las condiciones óptimas fueron acetonitrilo-ácido fórmico 5% (80:20), a un flujo de 0,4 mL/min y 25,0 min.

Se compararon los procedimientos de extracción por lixiviación y por DSASE, siendo este último el mejor método, debido a su alta eficiencia y correspondiéndose con las tendencias de la química verde al utilizar las mínimas cantidades de disolvente y muestra.

Se aplicó por primera vez una metodología de extracción por DSASE para la obtención del GA<sub>3</sub> en semillas de maíz, obteniéndose una concentración del analito de 30,012 mg/kg. Este resultado abre el camino para usar esta técnica en estudios posteriores en el campo de los productos naturales.

## Agradecimientos

A la vicerrectoría de investigaciones y posgrados de la Universidad de Caldas, por el financiamiento del proyecto 0455216.

## Referencias

- Azcon-Bieto, J.; Talón, M. *Fundamentos de fisiología vegetal*, 2th ed. McGraw-Hill- Interamericana: Barcelona, 2013; pp 399-408.
- Davies, P. J. *Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, 1<sup>st</sup> Edit. Springer – Science: New York, 1995; pp 66-80.
- Ge, L.; Peh, C. Y. C.; Yong, J. W. H.; Tan, S. N.; Hua, L.; Ong, E. S. Analyses of gibberellins by capillary electrophoresis-mass spectrometry combined with solidphase extraction. *J. Chromatogr. A*. **2007**, *1159*, 242-249. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.05.041>.
- Salisbury, F. B.; Ross, C. *Fisiología Vegetal*, 1<sup>ra</sup> Ed. Grupo Editorial Iberoamericano: Mexico, 1994.
- Marcilla, A. *Introducción a las operaciones de separación*. Espagrafic: España, 1998; pp 20-27.
- Doumas, P.; Imbault, N.; Moritz, T.; Odén, P. C. Detection and identification of gibberellins in Douglas fir (*Pseudotsuga menziesu*) shoots. *Physiol Plant*. **1992**, *85*, 489-494. DOI: <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1992.850312.x>.
- Moritz, T. The use of combined capillary liquid chromatography/mass spectrometry for the identification of a gibberellin glucosyl conjugate. *Phytochem Anal*. **1992**, *3*, 32-37. DOI: <https://doi.org/10.1002/pca.2800030106>.
- Hasan, O.; Ridoutt, B. G.; Davies, N. W.; Reid, J. B. Identification and quantification of endogenous gibberellins in apical buds and the cambial region of *Eucalyptus*. *Physiol Plant*. **1994**, *90*, 475-480. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1994.tb08804.x>.
- Moritz, T. Biological activity, identification and quantification of gibberellins in seedlings of Norway spruce (*Picea abies*) grown under different photoperiods. *Physiol Plant*. **1995**, *95*, 67-72. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1995.tb00809.x>.
- Huanpu, M.; Blake, P. S.; Browning, G.; Taylor, J. M. Metabolism of gibberellins A<sub>1</sub> and A<sub>3</sub> in fruits and shoots of *Prunus avium*. *Phytochemistry*. **2001**, *56*, 67-76. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00354-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00354-X).
- Macias, J. M.; Pournavab, R. F.; Reyes, M. H.; Benavides, A. Development of a Rapid and Efficient Liquid Chromatography Method for Determination of Gibberellin A<sub>4</sub> in Plant Tissue, with Solid Phase Extraction for Purification and Quantification. *Am J Plant Sci*. **2014**, *5*, 573-583. DOI: <https://doi.org/10.4236/ajps.2014.55072>.
- Kojima, M.; Kamada, T.; Komatsu, H.; Takei, K.; Kuroha, T. Mizutani M, et al. Highly Sensitive and High-Throughput Analysis of Plant Hormones Using MS Probe Modification and Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry : An Application for Hormone Profiling in *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol*. **2009**, *50*, 1201-1214. DOI: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp057>.
- Bhalla, K.; Singh, S. B.; Agarwal, R. Quantitative determination of gibberellins by high performance liquid chromatography from various gibberellins producing *Fusarium strains*. *Environ Monit Assess*. **2010**, *167*, 515-520. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10661-009-1068-5>.
- Castillo, G.; Ortega, G.; Carabeo, V.; Delgado, G.; Michelena, G. Determinación cualitativa de giberelinas y auxinas por cromatografía de capa fina. ICIDCA Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. **2007**, *XLI*, 12-17.
- Urbanová, T.; Tarkowská, D.; Novák, O.; Hedden, P.; Strnad, M. Analysis of gibberellins as free acids by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*. **2013**, *112*, 85-94. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.03.068>.
- Stirk, W.; A.; Tarkowská, D.; Turečová, V.; Strnad, M.; Van Staden, J. Abscisic acid, gibberellins and brassinosteroids in Kelpak, a commercial seaweed extract made from *Ecklonia maxima*. *J Appl Phycol*. **2014**, *26*, 561-567. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0062-z>.
- Manzi, M.; Gómez, A.; Arbona, V. Rapid and reproducible determination of active gibberellins in citrus tissues by UPLC/ESI-MS/MS. *Plant Physiol Biochem*. **2015**, *94*, 1-9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.04.015>.
- Müller, M.; Munné, S. Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Plant Methods*. **2011**, *7* (1), 1-11. DOI: <https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-37>.

19. Moritz, T.; Odén, P. C. Metabolism of tritiated and deuterated gibberellin A<sub>9</sub> in Norway spruce (*Picea abies*) shoots during the period of cone-bud differentiation. *Physiol Plant.* **1990**, *79*, 242-249. DOI: <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1990.790205.x>.
20. Moritz, T.; Philipson, J. J.; Oden, P. C. Detection and identification of gibberellins in Sitka spruce (*Picea sitchensis*) of different ages and coning ability by bioassay, radioimmunoassay and gas chromatography - mass spectrometry. *Physiol Plant.* **1989**, *75*, 325-332. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1989.tb04634.x>.
21. Stinemetz, C. L.; Roberts, B. R. An Analysis of the Gibberellic and Abscisic acid content of white ash seeds. *J Arboric.* **1984**, *10* (10), 283-285.
22. Soriano, M. D.; Bottini, R. Gibberellin A<sub>3</sub> levels in bark and flower buds of peach (*Prunus persica* L.) before leaf fall. *Agriscientia.* **1992**, *IX*, 3-8.
23. Schneider, G.; Schaller, B.; Jensen, E. Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatographic Separation of Permethylated Free and Glucosylated Gibberellins: a Method for the Analysis of Gibberellin Metabolites. *Physiol Plant.* **1994**, *5*, 111-115. DOI: <https://doi.org/10.1002/pca.2800050305>
24. Sanchez, C.; Ericsson, M.; Carlsson, H.; Colmsjo, A.; Dyremark, E. Dynamic sonication-assisted solvent extraction of organophosphate esters in air samples. *J Chromatogr A.* **2002**, *957*, 227-234. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(02\)00318-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(02)00318-7).
25. Sanchez, C.; Ericsson, M.; Carlsson, H.; Colmsjo, A. Determination of organophosphate esters in air samples by dynamic sonication-assisted solvent extraction coupled on-line with large-volume injection gas chromatography utilizing a programmed-temperature vaporizer. *J Chromatogr A.* **2003**, *993*, 103-110. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(03\)00355-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(03)00355-8).
26. De Los Santos, M.; Batlle, R.; Salafranca, J.; Nerín, C. Subcritical water and dynamic sonication-assisted solvent extraction of fluorescent whitening agents and azo dyes in paper samples. *J Chromatogr A.* **2005**, *1064*, 135-141. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.12.072>.
27. Gu, X.; Cai, J.; Zhu, X.; Su, Q. Dynamic ultrasound-assisted extraction of polyphenols in tobacco. *J Sep Sci.* **2005**, *28*, 2477-2481. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.200500064>.
28. Sackett, P. H. High-Performance Thin-Layer Chromatography of Gibberellins in Fermentation Broths. *Anal Chem ACS.* **1984**, *56*, 1600-1603. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac00273a014>.
29. Huntley, R. P.; Jones, L. H.; Hanke, D. E. Cytokinins and gibberellins in sap exudate of the oil palm. *Phytochemistry.* **2002**, *60*, 117-127. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00099-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00099-7).
30. Hamayun, M.; Khan, S. A.; Khan, A. L.; Ahmad, N.; Nawaz, Y.; Sher, H.; et al. Gibberellin producing *Neosartorya* sp. CC8 reprograms Chinese cabbage to higher growth. *Sci Hortic.* **2011**, *129* (3), 347-352. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.03.046>.
31. Kang, S. M.; Radhakrishnan, R.; Latif, A.; Kim, M. J.; Park, J. M.; Kim, B. R.; et al. Gibberellin secreting rhizobacterium, *Pseudomonas putida* H-2-3 modulates the hormonal and stress physiology of soybean to improve the plant growth under saline and drought conditions. *Plant Physiol Biochem.* **2014**, *84*, 115-124. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.09.001>.
32. Wu, Q.; Wu, D.; Duan, C.; Shen, Z.; Guan, Y. Hollow fiber-based liquid-liquid-liquid micro-extraction with osmosis: II. Application to quantification of endogenous gibberellins in rice plant. *J Chromatogr A.* **2012**, *1265*, 17-23. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.09.066>.
33. Asturias, M. Á. Maíz de alimento sagrado a negocio del hambre. Acción Ecológica, Quito, 2004; pp 9-20.
34. FAO. *El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Las políticas de recursos hídricos y la agricultura*, Roma, 1993, pp 8-10.
35. Correa, Y. M.; Buriticá, L. M.; Rivera, J. D.; Penagos, J. P.; Torres, J. I. Optimización del protocolo para la extracción y la cuantificación de proteínas totales en semillas germinadas de maíz (*Zea mays* L.). *Rev Ciencias Basicas - UMNG.* **2017**, *13* (1), 60-64. DOI: <http://dx.doi.org/10.18359/rfcb.2756>.
36. López, Á. M.; Alvarez E.; Cortés, C.; Rosero, M.; Tabora, G.; Garzón, W.; et al. Implementación de una extracción dinámica con disolvente asistida por sonicación (DSASE) en matrices de hoja de *Erythroxylum coca* para el posterior análisis de cocaína por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID). *Sci Chromatogr.* **2016**, *8*, 119-124. DOI: <https://doi.org/10.4322/sc.2016.022>.
37. Xie, W.; Han, C.; Zheng, Z.; Chen, X.; Qian, Y.; Ding, H.; et al. Determination of Gibberellin A<sub>3</sub> residue in fruit samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **2011**, *127*, 890-892. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.018>.
38. Urbanová, T.; Tarkowská, D.; Strnad, M.; Hedden, P. Gibberellins – terpenoid plant hormones: Biological importance and chemical analysis. *Collect Czech Chem Commun.* **2011**, *76*, 1669-1686. DOI: <https://doi.org/10.1135/cccc2011098>.
39. Robards, K.; Haddad, P. R.; Jackson, P. E. *Principles and practice of modern chromatographic methods*. Academic Press, San Diego, 1994; pp 326-329.
40. Özbek, B.; Ülgen, K. O. The stability of enzymes after sonication. *Process Biochem.* **2000**, *35*, 1037-1043. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00141-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00141-2).
41. Mason, T. J.; Cordemans, E. D. Ultrasonic intensification of chemical processing and related operations: A Review. *Chem Eng Res Des.* **1996**, *74*, 511-516.

**Article citation:**

Rivera, J. D.; Correa, Y. M.; Penagos, J. P. Evaluación de métodos de extracción para la obtención del ácido giberélico en semillas germinadas de maíz (*Zea mays* L.). *Rev. Colomb. Quim.* **2017**, *46* (2), 45-50. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v46n2.63015>