ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO COLORIMÉTRICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AUXINAS VEGETALES (IBA Y NAA) Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA CON FINES DE CONTROL DE CALIDAD EN BIOINSUMOS AGRÍCOLAS

Mariana Alvarez Restrepo

CC. 1001153633

Para optar al título de Ingeniera Bioquímica

Modalidad de Práctica

Práctica Empresarial

Asesor interno

Juan Carlos Quintero Díaz. Ingeniero Químico, MSc. PhD.

Asesor externo

Lorena María López Lujan. Biotecnóloga, MSc.

Universidad de Antioquia

Facultad de Ingeniería

Ingeniería bioquímica

Carepa, Antioquia.

2025

Cita	(Alvarez Restrepo, 2025)
Referencia **Estilo APA 7 (2020)**	Alvarez Restrepo, M. (2025). *Estandarización de un protocolo colorimétrico para la cuantificación de auxinas vegetales (IBA y NAA) y evaluación de su actividad biológica con fines de control de calidad en bioinsumos agrícolas.* [Trabajo de grado profesional]. Universidad de Antioquia, Carepa, Antioquia.

Centro de Documentación Ingeniería (CENDOI)

Repositorio Institucional: http://bibliotecadigital.udea.edu.co

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Dedicatoria

A Dios, por ser mi guía, mi refugio y mi fuerza constante a lo largo de este camino. Por sostenerme cuando sentí desfallecer, y por concederme la sabiduría necesaria para seguir adelante. Gracias por escuchar cada súplica desde el primer día en que te manifesté este anhelo, y por convertir este sueño en una realidad. Todo lo que he alcanzado ha sido posible por tu amor incondicional y tu presencia en cada paso.

A mi padre, Guillermo Alvarez, y a mi madre, Bibiana Restrepo, por su amor incondicional, sus sacrificios silenciosos y por enseñarme el valor del esfuerzo, la disciplina y la perseverancia. Este logro es tan suyo como mío. Gracias por apoyar cada uno de mis sueños y por creer en mí incluso en los momentos en los que yo dudé de mí misma.

A mi abuela, Marina Gómez, por cada palabra de aliento, por su amor profundo y por ser un pilar fundamental en mi vida. Tu apoyo y amor me inspiran día a día.

A mi hermanita, Isabella Alvarez, mi mayor motivación. Porque sé que me ves como un ejemplo, y eso me impulsa a superarme constantemente para ser siempre alguien que puedas admirar con orgullo.

A Felipe Giraldo, mi compañero de vida y de carrera, quien tristemente ya no está físicamente conmigo, por haber creído tanto en mí, por enseñarme, apoyarme, y caminar a mi lado durante todo este proceso. Este título también es tuyo. Tu memoria me acompaña y me da la fuerza para seguir adelante con determinación.

A mi familia en general, por su apoyo constante y por enseñarme, con su ejemplo, el verdadero significado de la unión y la resiliencia.

A Osneider Aguirre, mi mejor amigo, por estar orgulloso de cada paso que doy, por su compañía constante y por su apoyo incondicional, incluso en la distancia.

A mis amigas Lorena Gutiérrez, Valentina Jiménez, Julieth Muñoz y María José Corrales, por las risas que me devolvieron la energía y por celebrar conmigo cada pequeño avance como si fuera propio.

A Vanessa Santero, una de las personas más valiosas que me regaló la universidad, por cada risa compartida, por estar presente en los momentos importantes, y por tenderme la mano siempre que lo necesité.

A todos ustedes, gracias. Este logro no sería posible sin su amor, compañía y confianza en mí.

Agradecimientos

Agradezco a Dios por su guía constante, por fortalecerme en los momentos difíciles y por permitirme alcanzar esta meta.

A mis padres, Guillermo Álvarez y Bibiana Restrepo, por cada sacrificio, por creer siempre en mí y por apoyarme para formarme como profesional. Este logro es también suyo. A mi abuela Marina Gómez, por su amor incondicional, sus consejos y su apoyo constante. A mi hermanita Isabella Alvarez, mi mayor inspiración y motivo para superarme cada día; quiero ser el mejor ejemplo para ti.

A mi novio, Felipe Giraldo, quien, aunque ya no está, fue mi mayor apoyo durante la carrera. Gracias por enseñarme tanto, por impulsarme siempre y por haber creído en mí como nadie. Este logro también te pertenece y te llevo siempre conmigo.

A la empresa Sáfer Agrobiológicos por la oportunidad brindada durante mi etapa práctica, y a Lorena López, por su acompañamiento comprometido y constante. A mi asesor de universidad, Juan Carlos, gracias por tu orientación y apoyo académico durante este proceso.

A las profesoras Juliana Romo y Natalia Gómez, por despertar en mí el amor por la investigación. A Natalia, especialmente, gracias por ser guía, amiga y fuente de inspiración.

A Carolina Galvis, gracias por tu disposición, tu apoyo durante toda la carrera y tu amistad valiosa.

A mis amigas Lorena Gutiérrez, Valentina Jiménez, Julieth Muñoz y María José Corrales, por creer en mí y por acompañarme siempre con alegría, apoyo y cariño.

A Vanessa Santero, gracias por tu compañía desde el inicio de esta aventura, por tu amistad y tu presencia significativa en este camino.

A Osneider Aguirre, mi mejor amigo, por tu motivación constante y por celebrar cada uno de mis logros con orgullo.

A mi tía, Diana Buitrago, gracias por tu apoyo incondicional, por tu compañía sincera y por creer en mí en cada etapa de este proceso. Tu cercanía y respaldo hicieron realidad este sueño.

A mis tíos, Jorge Vargas y Aura Benítez, gracias por acompañarme desde el primer día en este camino. Su apoyo constante, sus palabras de aliento y el orgullo que expresaron por mis logros fueron una gran fuente de motivación para seguir adelante con determinación.

Finalmente, a todas las personas que de una u otra manera aportaron a este proyecto, les extiendo mi más sincero agradecimiento.

Contenido

Resumen 14

Abstract 15

1. Introducción 16

2. Objetivos 19

2.1 Objetivo general 19

2.2 Objetivos específicos 19

3. Marco teórico 20

3.1. Hormonas auxinas y su papel en el crecimiento vegetal 20

3.2. Importancia de la cuantificación de NAA e IBA en la industria 22

3.3. Métodos de cuantificación de auxinas 22

3.3.1. HPLC (High-Performance Liquid Chromatography): 22

3.3.2. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay): 22

3.3.3. Espectrofotometría UV-Vis 23

3.4. Principios de la colorimetría en la determinación de auxinas 23

3.5. Establecimiento de curvas de calibración 24

3.6. Validación del método colorimétrico 25

3.6.1. Precisión y exactitud: 25

3.6.2. Repetibilidad y reproducibilidad: 25

3.6.3. Robustez: 25

3.7. Comparación de la colorimetría con otros métodos 26

3.7.1. HPLC: 26

3.7.2. ELISA: 26

3.7.3. Colorimetría: 26

3.8. Evaluación de la actividad biológica de auxinas 27
3.8.1. Ensayos de elongación radicular: 27
3.8.2. Cultivos in vitro: 27
3.8.3. Pruebas de bioensayos en esquejes: 27
3.9. Impacto de las auxinas en la fisiología vegetal 28
3.9.1. Formación de órganos: 28
3.9.2. Fototropismo y gravitropismo: 28
3.9.3. Adaptabilidad a condiciones adversas: 29
3.10. Normativa aplicable a la cuantificación de hormonas 29
3.10.1. Límites máximos de residuos (LMR): 29
3.10.2. Requisitos para la validación de métodos analíticos: 29
3.10.3. Criterios de etiquetado y control de calidad: 29
4. Metodología 30
4.1. Diseño de curvas estándar para la cuantificación de IBA y NAA 30
4.2. Determinación de la concentración de IBA y NAA en muestras de producto comercial 31
4.3. Validación del protocolo colorimétrico 31
4.4. Comparación con métodos cromatográficos 31
4.5. Evaluación de la actividad biológica del producto comercial en esquejes de *Chrysanthemum sp.* 32
4.5.1. Material vegetal y condiciones de cultivo 32
4.5.2. Diseño experimental 32
4.5.3. Variables de respuesta 33
4.5.4. Análisis estadístico 33
4.5.5. Consideraciones bioquímicas del diseño 33
4.6. Análisis estadístico de datos analíticos para validación del método 34

5. Análisis de resultados 34
5.1 Diseño de curvas estándar para la cuantificación de IBA y NAA 35
5.1.1. Diseño y ajuste de curvas estándar para la cuantificación de NAA 35
5.1.2. Diseño y ajuste de curvas estándar para la cuantificación de IBA 43
5.2. Determinación de la concentración de IBA y NAA en muestras de producto comercial 45
5.2.1. Verificación de la especificidad de los métodos analíticos para NAA e IBA 45
5.2.1.2. Determinación de la concentración de IBA en muestras del producto comercial 47
5.3. Validación del protocolo de cuantificación espectrofotométrica para NAA e IBA 49
5.3.1. Validación del protocolo espectrofotométrico para NAA 49
5.3.2. Validación del protocolo espectrofotométrico para IBA 54
5.4. Comparación con métodos cromatográficos 60
5.4.1. Comparación para NAA 61
5.4.2. Comparación para IBA 61
5.4.3. Comparación del método colorimétrico con el método cromatográfico (HPLC) 63
5.5. Evaluación de la actividad biológica del producto comercial en esquejes de Chrysanthemum sp. 65
5.5.1. Resultados visuales y fisiológicos del enraizamiento 65
5.5.2. Análisis visual de los tratamientos 66
5.5.3. Análisis bioquímico de los efectos observados 67
5.5.4. Análisis estadístico de variables cuantitativas y cualitativas 67
5.5.5. Análisis fotográfico y evaluación visual comparativa 68
5.6. Análisis estadístico de datos analíticos para validación del método 69
5.6.1. Regresión lineal 69
5.6.2. Prueba de normalidad (Shapiro-Wilk) 72
5.6.3. Homogeneidad de varianzas (prueba de Levene) 74

5.6.4 ANOVA (Análisis de varianza)..... 75

5.6.5. Prueba de Tukey (comparaciones múltiples post hoc) 77

6. Conclusiones y recomendaciones..... 81

Referencias..... 83

Anexos 86

Lista de tablas

Tabla 1. Determinación de la concentración de NAA en muestra de producto. 46

Tabla 2. Determinación de la concentración de IBA en muestra de producto comercial..... 48

Tabla 3. Coeficiente de variación (CV%) intraensayo por punto de la curva para NAA..... 50

Tabla 4. Repetibilidad interensayo (media de absorbancias y CV%) para NAA. 51

Tabla 5. Coeficiente de variación (CV%) intraensayo por punto de la curva para IBA. 56

Tabla 6. Repetibilidad interensayo (media de absorbancias y CV%) para IBA. 57

Tabla 7. Comparación entre el método colorimétrico desarrollado y HPLC para la cuantificación de IBA y NAA en muestra comercial..... 63

Tabla 8. Evaluación del enraizamiento en esquejes de Chrysanthemum sp. tras aplicación del producto comercial. 65

Tabla 9. Resultados estadísticos de las variables cuantitativas y cualitativas analizadas 68

Lista de figuras

Figura 1. Procesos beneficiados por las auxinas. 20

Figura 2. Estructura molecular del ácido naftalenacético (NAA) 21

Figura 3. Estructura molecular del ácido indolbutírico (IBA) 21

Figura 4. Efectos del enraizamiento a diferentes concentraciones de auxina en estacas de agraz. 27

Figura 5. Formación de precipitados en microplaca ELISA. 35

Figura 6. Curva de calibración de 10 ppm a 100 ppm de NAA. 38

Figura 7. Curva de calibración de 10 ppm a 50 ppm de NAA. 39

Figura 8. Curva de calibración de 5 ppm a 20 ppm de NAA. 39

Figura 9. Curva de calibración de 2 ppm a 10 ppm de NAA. 40

Figura 10. Curva de calibración de 0,5 ppm a 5 ppm de NAA. 41

Figura 11. Reacciones obtenidas a distintas concentraciones de IBA. 43

Figura 12. Curva de calibración de 20 ppm a 100 ppm de IBA. 44

Figura 13. Segunda curva de calibración de IBA. 55

Figura 14. Cromatograma comparativo de muestra comercial por HPLC. 62

Figura 15. Comparación visual entre esquejes tratados con el bioinsumo y grupo control 66

Figura 16. Comparación visual de raices de esquejes tratados con el bioinsumo y grupo control 68

Figura 17. Salida del modelo de regresión lineal simple generado en R para la curva de calibración de NAA. 70

Figura 18. Resultados del modelo de regresión lineal simple para la curva de calibración de IBA obtenidos mediante R 72

Figura 19. Resultados de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para residuos del modelo de calibración de NAA. 73

Figura 20. Resultados de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para residuos del modelo de calibración de IBA. 73

Figura 21. Resultado de la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene para los residuos del modelo de regresión de NAA. 74

Figura 22. Resultado de la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene para los residuos del modelo de regresión de IBA. 75

Figura 23. Análisis de varianza para el modelo de regresión de NAA. 76

Figura 24. Análisis de varianza para el modelo de regresión de IBA. 77

Figura 25. Resultados de la prueba de Tukey ($p < 0.05$) para absorbancias obtenidas con el protocolo de cuantificación de NAA. 78

Figura 26. Resultados de la prueba de Tukey ($p < 0.05$) para absorbancias obtenidas con el protocolo de cuantificación de IBA. 80

Lista de ecuaciones

Ecuación 1. Ecuación estequiométrica de la reacción de NAA con la base 23

Ecuación 2. Ecuación estequiométrica de la reacción de IBA con Salkowski 24

Ecuación 3. Ecuación de la curva de calibración de NAA. 49

Ecuación 4. Coeficiente de variación (CV%) 50

Ecuación 5. Límite de detección 53

Ecuación 6. Límite de cuantificación 53

Siglas, acrónimos y abreviaturas

APA	American Psychological Association
IBA	Ácido indolbutírico
MSc	Magister Scientiae
NAA	Ácido naftalenacético
PhD	Philosophiae Doctor
UdeA	Universidad de Antioquia

Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo la estandarización de un protocolo colorimétrico para la cuantificación de dos auxinas vegetales, el ácido indolbutírico (IBA) y el ácido naftalenacético (NAA), comúnmente presentes en bioinsumos agrícolas. Se desarrollaron curvas de calibración específicas para cada hormona, utilizando el reactivo de Salkowski para IBA y un sistema de espectrofotometría UV-Visible en medio alcalino para NAA. Posteriormente, se validó el protocolo mediante parámetros estadísticos como linealidad, precisión, exactitud y análisis de varianza. Los modelos mostraron alta confiabilidad, con coeficientes de determinación superiores a 0.99 y valores de p significativos ($p < 0.05$), lo cual evidenció una respuesta lineal entre concentración y absorbancia. Adicionalmente, se evaluó la actividad biológica de ambas auxinas mediante un ensayo de enraizamiento en esquejes de *Chrysanthemum sp.*, donde se observó un mayor desarrollo radicular en el tratamiento con hormonas en comparación con el control. Los resultados respaldan la aplicabilidad del método colorimétrico como alternativa confiable, económica y reproducible frente a técnicas instrumentales como HPLC. Este protocolo constituye una herramienta útil para el control de calidad rutinario de bioinsumos vegetales, permitiendo garantizar la homogeneidad del producto y su eficacia en campo, en cumplimiento con las exigencias regulatorias nacionales e internacionales.

Palabras clave: Estandarización, cuantificación, colorimetría, control de calidad, IBA, NAA, actividad biológica.

Abstract

The aim of this work was to standardize a colorimetric protocol for the quantification of two plant auxins, indolbutyric acid (IBA) and naphthaleneacetic acid (NAA), commonly present in agricultural bioinputs. Specific calibration curves were developed for each hormone, using Salkowski's reagent for IBA and a UV-Visible spectrophotometry system in alkaline medium for NAA. Subsequently, the protocol was validated using statistical parameters such as linearity, precision, accuracy, and analysis of variance. The models showed high reliability, with determination coefficients higher than 0.99 and significant p-values ($p < 0.05$), which evidenced a linear response between concentration and absorbance. Additionally, the biological activity of both auxins was evaluated by means of a rooting assay on Chrysanthemum sp. cuttings, where a greater root development was observed in the hormone treatment compared to the control. The results support the applicability of the colorimetric method as a reliable, economical, and reproducible alternative to instrumental techniques such as HPLC. This protocol constitutes a useful tool for routine quality control of plant bioinputs, allowing to guarantee the homogeneity of the product and its efficacy in the field, in compliance with national and international regulatory requirements.

*Keywords***:** Standardization, quantification, colorimetry, quality control, IBA, NAA, biological activity.

1. Introducción

Las fitohormonas auxinas juegan un papel crucial en el crecimiento y desarrollo vegetal, regulando procesos como la elongación celular, la diferenciación de tejidos y la formación de estructuras radiculares. Entre las auxinas sintéticas más utilizadas en la agricultura se encuentran el ácido indol-3-butírico (IBA) y el ácido 1-naftalenacético (NAA), ambos empleados para estimular el enraizamiento, mejorar la absorción de nutrientes y optimizar el rendimiento de los cultivos (Kawaguchi et al., 2020). Estas hormonas se han convertido en herramientas esenciales en la propagación vegetativa y en el manejo del crecimiento de diversas especies de interés comercial (Liu et al., 2019).

El ácido indolbutírico (IBA) es una auxina de origen natural, considerada una forma endógena del ácido indolacético (AIA) que también puede encontrarse en pequeñas cantidades en tejidos vegetales, aunque en la práctica agrícola se utiliza mayoritariamente en su forma sintética, debido a su mayor estabilidad frente a la degradación. Esta auxina, es utilizada ampliamente para inducir la formación de raíces en esquejes de plantas leñosas y herbáceas, favoreciendo un anclaje eficiente y una exploración radicular adecuada para mejorar la absorción de agua y nutrientes (De Klerk et al., 2016). Su aplicación es común en cultivos hortícolas, frutales y forestales, donde su uso permite incrementar la tasa de éxito en la clonación y reducción de la mortalidad de los esquejes. En condiciones de estrés ambiental, él IBA también ha demostrado ser eficaz en la estimulación del desarrollo radicular, asegurando un crecimiento vigoroso incluso en suelos de baja fertilidad o expuestos a sequías prolongadas (Garbari et al., 2021).

Por otro lado, el NAA es una auxina sintética que regula procesos reproductivos en las plantas, como la inducción floral y la prevención de la abscisión prematura de frutos (Rademacher, 2016). Su aplicación en cultivos como manzano, peral y cítricos permite mejorar el tamaño y la calidad de los frutos, optimizando la distribución de los recursos internos de la planta (Zhang et al.,2022). Además, el NAA se emplea en el raleo de frutos, asegurando un desarrollo homogéneo y aumentando la productividad de los cultivos de interés agrícola (Gong et al., 2019).

Actualmente, las empresas dedicadas al sector de agroinsumos, manejan productos comerciales que contiene tanto IBA como NAA como hormonas promotoras del crecimiento vegetal. La concentración de estas hormonas en el producto se determina anualmente mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Sin embargo, este método implica un costo elevado,

lo que limita la posibilidad de realizar controles de calidad periódicos y pone en riesgo la uniformidad del producto en los diferentes lotes producidos. La variabilidad en la concentración de auxinas podría afectar la eficacia del producto y la confianza del consumidor, destacando la necesidad de implementar un método de análisis más accesible y eficiente (Yin et al., 2020).

Para abordar esta problemática, se propone la estandarización de un protocolo colorimétrico para la cuantificación de IBA y NAA en muestras comerciales. La colorimetría es una técnica analítica basada en la medición de la intensidad del color resultante de una reacción química específica, lo que permite determinar la concentración de un analito en una muestra de manera rápida y confiable (Muniappan et al., 2018). Este método ofrece ventajas como menor costo operativo, rapidez en la obtención de resultados y facilidad de implementación en el laboratorio de control de calidad.

La cuantificación de hormonas vegetales como el ácido indolbutírico (IBA) y el ácido naftalenacético (NAA) está regulada por normativas internacionales y nacionales que establecen los criterios de calidad y seguridad en bioinsumos agrícolas. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) han desarrollado lineamientos sobre el análisis de reguladores de crecimiento vegetal en productos comerciales, exigiendo que los métodos utilizados garanticen precisión, sensibilidad y reproducibilidad (FAO, 2018). En el ámbito nacional, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) y las normativas ISO/IEC 17025 establecen los requisitos que deben cumplir los laboratorios de ensayo para la validación de metodologías analíticas en la industria agrícola, exigiendo un límite de detección adecuado y métodos validados para garantizar la trazabilidad de los resultados (ISO, 2017). En este contexto, la empresa debe reportar las concentraciones de NAA e IBA dentro de los límites permitidos dependiendo de la formulación y el país en el que se comercializa (EU Pesticides Database, 2020), sin embargo, para este caso en específico, se debe cumplir una concentración de 2.25 g/kg y de 0.75 g/kg para IBA y NAA respetivamente.

En términos de precisión, la colorimetría ha demostrado ser una técnica confiable para la cuantificación de auxinas, con coeficientes de variación aceptables en comparación con otros métodos analíticos. ELISA, ampliamente utilizado en la detección de fitohormonas, ofrece una alta especificidad y sensibilidad, con límites de detección en el orden de nanogramos por mililitro (ng/mL), lo que permite una cuantificación precisa de reguladores del crecimiento vegetal (Gao et

al., 2019). Sin embargo, hasta el momento, la cuantificación de NAA e IBA en la industria agrícola ha sido realizada predominantemente mediante técnicas cromatográficas como HPLC (HighPerformance Liquid Chromatography), debido a su precisión y capacidad de separación de compuestos en mezclas complejas (Zhang et al., 2021). Aunque HPLC es el estándar de referencia, su aplicación en análisis rutinarios se ve limitada por la complejidad del procedimiento y la necesidad de instrumentación especializada. En este contexto, la implementación de protocolos colorimétricos representa una alternativa viable para el monitoreo continuo de estas hormonas en productos comerciales, proporcionando un método eficiente, reproducible y alineado con las regulaciones vigentes para el control de calidad en bioinsumos agrícolas.

En este estudio, se implementará una reacción colorimétrica en placa ELISA y espectrofotómetro UV, lo que permite aprovechar la especificidad y sensibilidad del ensayo inmunoabsorbente junto con la simplicidad y rapidez de la detección colorimétrica. A diferencia de técnicas cromatográficas como HPLC, ELISA basado en colorimetría ha sido utilizado con éxito para la detección de fitohormonas en muestras agrícolas, demostrando su eficacia en la cuantificación de auxinas (Ghorbanpour et al., 2021). Estudios previos han reportado la aplicación de métodos colorimétricos en ELISA y espectrofotómetro UV para la detección de diversos compuestos bioactivos en matrices vegetales, evidenciando su precisión y aplicabilidad en análisis de control de calidad (Maná et al., 2024). Estos antecedentes respaldan la implementación de un protocolo colorimétrico en placa ELISA para la cuantificación de NAA e IBA en la empresa, optimizando la gestión de calidad y asegurando el cumplimiento normativo.

El presente proyecto busca establecer protocolos de cuantificación colorimétrica para el análisis de IBA y NAA, evaluar los parámetros fisicoquímicos del producto y medir su actividad biológica. Con esto, se pretende asegurar un control de calidad eficiente y periódico en bioinsumos comerciales, optimizando la producción y garantizando un producto homogéneo y efectivo para su aplicación en la agricultura sostenible.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Implementar un protocolo colorimétrico para la cuantificación de las hormonas ácido indolbutírico (IBA) y ácido naftalenacético (NAA), con el fin de optimizar el control de calidad y evaluar su actividad biológica en productos comerciales.

2.2 Objetivos específicos

- Diseñar curvas estándar para la cuantificación de IBA y NAA mediante regresión lineal, utilizando concentraciones conocidas de cada hormona.
- Determinar la concentración de IBA y NAA en muestras de bioinsumos mediante técnica colorimétrica.
- Validar el protocolo colorimétrico asegurando su precisión, exactitud y repetibilidad en diferentes condiciones de producción.
- Comparar los resultados obtenidos con los valores de referencia establecidos por métodos cromatográficos como HPLC, garantizando la confiabilidad del método implementado.
- Evaluar la actividad biológica de IBA y NAA en muestras tratadas, midiendo su efecto en el desarrollo y crecimiento vegetal.

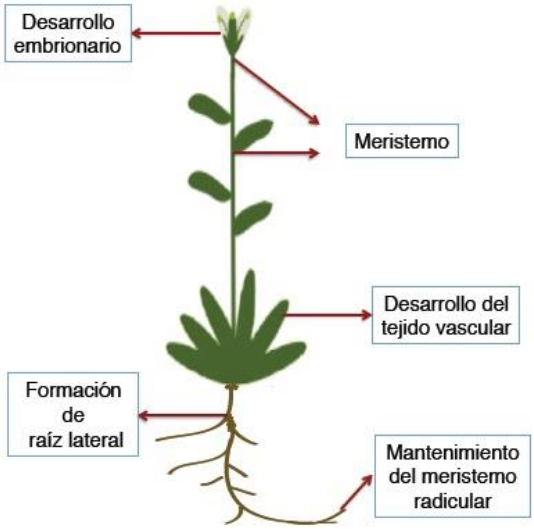
3. Marco teórico

3.1. Hormonas auxinas y su papel en el crecimiento vegetal

Las auxinas constituyen una de las principales fitohormonas involucradas en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas. Su papel es fundamental en diversos procesos fisiológicos, tales como la elongación celular, la diferenciación de tejidos, la dominancia apical, la formación de raíces laterales y adventicias, y la respuesta a estímulos ambientales como la luz y la gravedad (Li et al., 2021).

A nivel molecular, las auxinas regulan la transcripción génica a través de la interacción con proteínas receptoras específicas, como el complejo TIR1/AFB, que desencadena la degradación de represores transcripcionales AUX/IAA, permitiendo así la expresión de genes que modulan el crecimiento celular (Sauer et al., 2019). Además, se ha identificado que la concentración de auxinas en los tejidos vegetales es regulada por mecanismos de transporte polarizado, mediado por proteínas transportadoras PIN, que controlan su distribución en la planta (Gallei et al., 2022).

Figura 1. *Procesos beneficiados por las auxinas.*

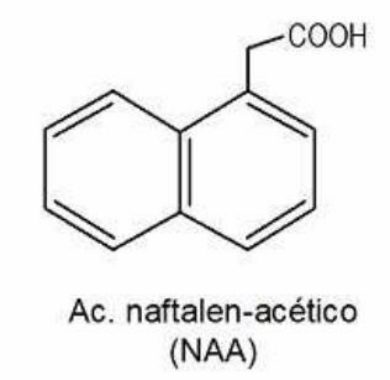


Fuente: Garay-Arroyo, A., de la Paz Sánchez, M., García-Ponce, B., Álvarez-Buylla, E. R., & Gutiérrez, C. (2014). La homeostasis de las auxinas y su importancia en el desarrollo de Arabidopsis thaliana. *Revista de educación bioquímica*, *33*(1), 13-22.

Dentro de este grupo de fitohormonas, dos auxinas ampliamente utilizadas en la agricultura son el ácido naftalenacético (NAA) y el ácido indolbutírico (IBA). El NAA es una auxina sintética

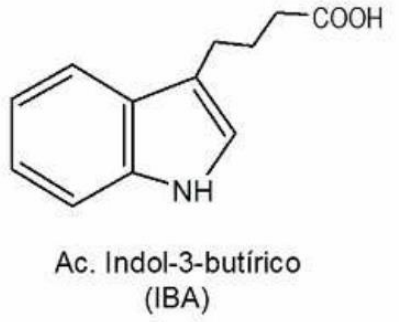
que se emplea principalmente en la propagación vegetativa debido a su estabilidad química y su capacidad para inducir el crecimiento radicular en diversas especies vegetales. Por su parte, él IBA es una auxina natural con una función clave en la formación de raíces adventicias y en la regulación del desarrollo inicial de las plantas (Sauer et al., 2019).

Figura 2*. Estructura molecular del ácido naftalenacético (NAA)*



Fuente: Jordán, M., & Casaretto, J. (2006). Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. *Squeo, F, A., & Cardemil, L.(eds.). Fisiología Vegetal*, 1-28.

Figura 3. *Estructura molecular del ácido indolbutírico (IBA)*



Fuente: Jordán, M., & Casaretto, J. (2006). Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. *Squeo, F, A., & Cardemil, L.(eds.). Fisiología Vegetal*, 1-28.

Estudios han demostrado que la aplicación exógena de auxinas en cultivos agrícolas mejora significativamente la capacidad de absorción de nutrientes, promueve la expansión celular y favorece la resistencia a condiciones de estrés abiótico como la salinidad y la sequía (Patten et al., 2020). Sin embargo, su eficacia depende en gran medida de la dosis utilizada, ya que concentraciones excesivas pueden generar efectos adversos como epinastia foliar y reducción del crecimiento radicular.

3.2. Importancia de la cuantificación de NAA e IBA en la industria

El control de calidad en la formulación de bioinsumos agrícolas que contienen NAA e IBA es un aspecto crítico para garantizar su eficacia en el campo. La cuantificación precisa de estas hormonas es fundamental para asegurar que la concentración declarada en el producto final sea la correcta, evitando variabilidad en los resultados obtenidos en los cultivos. (Maná et al., 2024).

En el contexto de la producción de bioestimulantes y reguladores del crecimiento vegetal, la variabilidad en la concentración de auxinas puede generar inconsistencias en la respuesta de las plantas, afectando su rendimiento y desarrollo. Por ejemplo, estudios han demostrado que pequeñas variaciones en la concentración de auxinas pueden influir significativamente en la formación de raíces en esquejes de especies leñosas y herbáceas (Patten et al., 2020).

Adicionalmente, la detección de residuos de auxinas en productos agrícolas es un tema de interés, ya que su acumulación en niveles no deseados puede alterar la fisiología de la planta y generar efectos secundarios no previstos. Por ello, el desarrollo de métodos confiables para la cuantificación de NAA e IBA no solo contribuye a mejorar el control de calidad de los bioinsumos, sino que también permite la optimización de su aplicación en el campo, maximizando su efectividad y reduciendo el riesgo de fitotoxicidad (Zhang et al.,2022)

3.3. Métodos de cuantificación de auxinas

Diversas metodologías analíticas han sido empleadas para la cuantificación de auxinas en productos comerciales y muestras vegetales. Entre las más utilizadas destacan la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) y la espectrofotometría UV-Vis (Agrosabio, 2023; Ghorbanpour et al., 2021).

3.3.1. HPLC (High-Performance Liquid Chromatography): Se basa en la separación de compuestos mediante una fase móvil y una fase estacionaria. Es un método altamente preciso y reproducible, pero requiere equipamiento costoso y personal capacitado.

3.3.2. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay): Utiliza anticuerpos específicos para la detección de auxinas, proporcionando alta sensibilidad y especificidad. No obstante, su costo y la

necesidad de reactivos específicos pueden limitar su aplicación en laboratorios con recursos limitados (Ghorbanpour et al., 2021).

3.3.3. Espectrofotometría UV-Vis*:* Técnica que mide la absorbancia de luz en una longitud de onda específica, permitiendo la cuantificación de auxinas basadas en su interacción con reactivos colorimétricos. Es un método simple, económico y de fácil implementación en laboratorios de control de calidad (Muniappan, 2018).

De estos métodos, la espectrofotometría colorimétrica ha ganado relevancia debido a su bajo costo, rapidez y facilidad de operación. Su aplicación en el análisis de auxinas en productos agrícolas permite una evaluación rápida de la concentración de la hormona sin la necesidad de equipamiento sofisticado (Chen et al., 2020)

3.4. Principios de la colorimetría en la determinación de auxinas

La colorimetría es una técnica analítica basada en la medición de la absorbancia de luz de una muestra tras una reacción química con un reactivo específico. En el caso de las auxinas, la formación de complejos coloreados con reactivos específicos permite su detección y cuantificación mediante espectrofotometría (Ghorbanpour et al., 2021).

En la determinación colorimétrica del ácido naftalenacético (NAA), se ha reportado el uso de una solución alcalina para la reacción necesaria. (Young et al.,1963). Este permite la ionización del grupo carboxilo del NAA, favoreciendo así su posterior reacción con agentes oxidantes. La reacción ácido–base entre el NAA y la base, genera la forma aniónica disociada del compuesto, como se muestra en la ecuación:

Ecuación 1. *Ecuación estequiométrica de la reacción de NAA con la base*

$$\mathbf{C_{12}H_{10}O_2\ (NAA) + OH^- \rightleftharpoons C_{12}H_9O_2^- + H_2O}$$

En condiciones ligeramente alcalinas, el ácido naftalenacético (NAA), una auxina sintética con un grupo carboxílico libre sufre una ionización en la que cede un protón al ion hidroxilo (OH^-) presente en el medio, generando su forma aniónica ($C_{12}H_9O_2^-$) y una molécula de agua como

subproducto. Esta desprotonación es favorecida en presencia de bases débiles nitrogenadas, las cuales estabilizan la forma ionizada del NAA, aumentando su solubilidad y reactividad para posteriores análisis espectrofotométricos.

Esta forma iónica puede ser más reactiva frente a oxidantes como el permanganato de potasio ($KMnO_4$), que oxida el anillo naftalénico del NAA en medio ácido generando un precipitado marrón cuya intensidad se relaciona con la concentración. Este cambio visual puede ser medido espectrofotométricamente, proporcionando una base útil para la cuantificación del NAA en productos comerciales (Marek, 1932).

Por su parte, el ácido indolbutírico (IBA) puede ser detectado colorimétricamente mediante su reacción con el reactivo de Salkowski, compuesto por cloruro férrico ($FeCl_3$) en ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) (Gilbert et al., 2018). En esta reacción, el grupo indol del IBA es oxidado parcialmente por los iones férricos, generando un complejo coloreado que absorbe en el rango visible. La ecuación química global puede simplificarse como:

***Ecuación 2**. Ecuación estequiométrica de la reacción de IBA con Salkowski*

$$\textbf{IBA} + \textbf{Fe}^{3+}\ \textbf{(en } \textbf{H}_2\textbf{SO}_4\textbf{)} \rightarrow \textbf{Complejo Fe}^{3+}\textbf{–indol + subproductos}$$

El resultado es una coloración rosa-anaranjada cuya intensidad aumenta con la concentración de IBA, permitiendo su cuantificación por espectrofotometría a una longitud de onda de 450 nm. Esta técnica es ampliamente empleada en ensayos de auxinas por su sensibilidad, rapidez y bajo costo (Bautista & Gallardo, 2008; Muniappan et al., 2018).

Las reacciones anteriores permiten establecer una curva de calibración que facilita la determinación cuantitativa del analito con alta precisión. Además, estudios recientes han señalado que la elección de reactivos y las condiciones de reacción, como el pH y la temperatura, pueden influir significativamente en la sensibilidad y selectividad del método colorimétrico (Zhang et al.,2022). Por lo tanto, la optimización del protocolo es un paso clave en el desarrollo de un método confiable para la cuantificación de auxinas en bioinsumos agrícolas.

3.5. Establecimiento de curvas de calibración

Las curvas de calibración son herramientas fundamentales en los análisis químicos, ya que permiten correlacionar la señal analítica obtenida con la concentración del analito en la muestra.

En el caso de la cuantificación de auxinas por colorimetría, la construcción de una curva de calibración implica la preparación de soluciones estándar con concentraciones conocidas y la medición de su absorbancia a una longitud de onda específica (Hansen et al., 2018).

Para garantizar la confiabilidad de los resultados, es necesario que la curva de calibración presente un coeficiente de determinación (R^2) superior a 0.98, lo que indica una relación lineal óptima entre la concentración de la auxina y la absorbancia medida (Zhang et al., 2022). Además, la validación del método debe incluir pruebas de repetibilidad, precisión y exactitud para asegurar la fiabilidad de las mediciones en diferentes condiciones experimentales.

3.6. Validación del método colorimétrico

La validación de un método analítico es un paso esencial para garantizar la confiabilidad de los resultados obtenidos en estudios químicos y biológicos. En el caso de los métodos colorimétricos, esta validación implica la evaluación de parámetros clave como precisión, exactitud, repetibilidad y robustez bajo diferentes condiciones experimentales (Rodríguez et al., 2013).

3.6.1. Precisión y exactitud: La precisión se refiere a la concordancia entre los resultados obtenidos en mediciones repetidas de la misma muestra, mientras que la exactitud mide qué tan cerca está el resultado del valor real. Ambos parámetros pueden evaluarse utilizando materiales de referencia certificados o comparando los resultados del método colorimétrico con técnicas de referencia como HPLC o ELISA (Liu et al., 2019).

3.6.2. Repetibilidad y reproducibilidad: La repetibilidad se determina evaluando la variabilidad en mediciones realizadas bajo las mismas condiciones experimentales, mientras que la reproducibilidad se mide en diferentes laboratorios o por distintos analistas. Estos aspectos son fundamentales para garantizar que el método pueda aplicarse de manera confiable en diversas situaciones (Rodríguez et al., 2013)

3.6.3. Robustez: Se refiere a la capacidad del método para mantener su desempeño cuando se introducen pequeñas variaciones en factores como temperatura, pH de la solución o cambios en la

concentración del reactivo. Un método robusto asegura que los resultados sean consistentes incluso ante fluctuaciones menores en las condiciones del análisis (Liu et al., 2019).

La aplicación de estándares internacionales como los lineamientos de la ICH (Consejo Internacional de Armonización) es crucial para validar métodos analíticos en la industria farmacéutica y agrícola. Estos lineamientos establecen criterios estrictos que deben cumplirse antes de que un método pueda ser aprobado para su uso en control de calidad (Liu et al., 2019).

3.7. Comparación de la colorimetría con otros métodos

Diferentes métodos analíticos han sido empleados para la cuantificación de auxinas en productos comerciales y muestras vegetales. Aunque técnicas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) ofrecen alta sensibilidad y especificidad, su implementación en laboratorios de control de calidad puede ser costosa y compleja (Gao et al., 2019).

3.7.1. HPLC: Es el método de referencia para la cuantificación de auxinas debido a su alta precisión y capacidad para separar compuestos con estructuras similares. Sin embargo, su alto costo, la necesidad de equipos especializados y el requerimiento de solventes orgánicos limitan su uso en laboratorios con recursos limitados (Gao et al., 2019).

3.7.2. ELISA: Permite la detección de auxinas mediante anticuerpos específicos, proporcionando una gran especificidad. Sin embargo, la disponibilidad de reactivos y la necesidad de calibraciones frecuentes pueden representar desafíos para su uso rutinario en la industria agrícola (Kang et al., 2021).

3.7.3. Colorimetría: Es una alternativa viable debido a su simplicidad, bajo costo y facilidad de implementación en laboratorios de control de calidad. A diferencia de HPLC y ELISA, la colorimetría no requiere equipos costosos ni reactivos especializados, lo que la convierte en una opción atractiva para aplicaciones industriales (Kang et al., 2021).

A pesar de sus ventajas, la colorimetría puede verse limitada por la interferencia de otras sustancias presentes en la muestra, lo que puede afectar la precisión de la medición. Sin embargo, con una correcta optimización del protocolo y una adecuada validación del método, esta técnica puede proporcionar resultados confiables y reproducibles (Gao et al., 2019).

3.8. Evaluación de la actividad biológica de auxinas

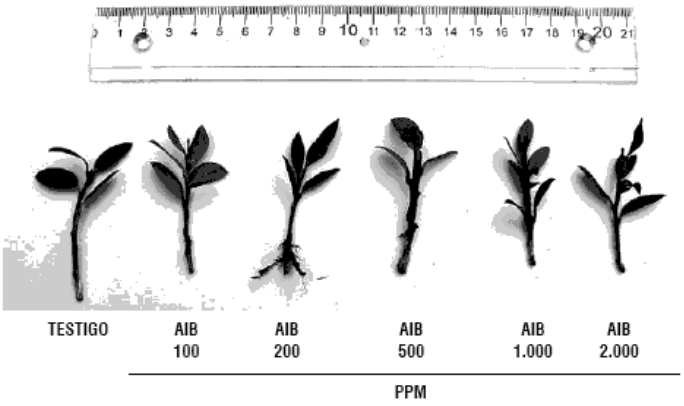
Las auxinas como la NAA e IBA desempeñan un papel crucial en la regulación del crecimiento vegetal. Para evaluar su actividad biológica en productos comerciales, se utilizan ensayos específicos en plántulas y sistemas de cultivo in vitro, donde se analizan parámetros como la elongación radicular, la diferenciación celular y la formación de raíces adventicias (Dobrev et al., 2018). Entre las pruebas más utilizadas para la evaluación de la actividad biológica de auxinas destacan:

3.8.1. Ensayos de elongación radicular: Se aplican diferentes concentraciones de auxinas a plántulas en fase temprana de desarrollo y se mide la longitud de la raíz en intervalos de tiempo determinados. Este ensayo permite determinar la dosis óptima de auxinas para la promoción del crecimiento radicular (Dobrev et al., 2018).

3.8.2. Cultivos in vitro: Se utilizan medios de cultivo suplementados con auxinas para evaluar su efecto en la organogénesis y en la formación de raíces y brotes. Estos estudios han demostrado que la concentración de auxinas puede modular la diferenciación celular y la regeneración de tejidos en especies vegetales de interés agrícola (Schmidt et al., 2021).

3.8.3. Pruebas de bioensayos en esquejes: Se utilizan esquejes de diversas especies vegetales tratadas con auxinas para evaluar la inducción del enraizamiento. La respuesta al tratamiento varía según la especie y las condiciones ambientales, lo que resalta la importancia de ajustar las dosis y las formulaciones de auxinas en productos comerciales (Schmidt et al., 2021).

Figura 4*. Efectos del enraizamiento a diferentes concentraciones de auxina en estacas de agraz.*



Fuente: Castrillón, J. C., Carvajal, E., Ligarreto, G., & Magnitskiy, S. (2008). El efecto de auxinas sobre el enraizamiento de las estacas de agraz (Vaccinium meridionale Swartz) en diferentes sustratos. *Agronomía colombiana, 26*(1), 16-22.

Estos ensayos permiten verificar la funcionalidad de los bioinsumos y garantizar su efectividad en campo, asegurando que los productos formulados con auxinas cumplan con su propósito de promover el desarrollo vegetal (Schmidt et al., 2021).

3.9. Impacto de las auxinas en la fisiología vegetal

Las auxinas juegan un papel central en la regulación de procesos fisiológicos clave en las plantas. Su influencia abarca la formación de órganos, el fototropismo, el gravitropismo y la respuesta a factores ambientales como la luz y la temperatura (Sun et al., 2020).

3.9.1. Formación de órganos: Las auxinas determinan la posición y el desarrollo de estructuras vegetales como raíces, tallos y hojas. Se ha demostrado que niveles adecuados de auxinas favorecen la formación de raíces laterales y adventicias, optimizando la absorción de nutrientes (Friml et al., 2019).

3.9.2. Fototropismo y gravitropismo: Las auxinas modulan la respuesta de las plantas a estímulos ambientales, promoviendo el crecimiento diferencial de los tejidos en función de la luz y la gravedad. Esta regulación es esencial para la orientación óptima de la planta y su capacidad para maximizar la captación de luz solar (Sun et al., 2020).

3.9.3. Adaptabilidad a condiciones adversas*:* En estudios recientes se ha observado que las auxinas pueden mejorar la tolerancia de los cultivos a estrés abiótico como la sequía y la salinidad, favoreciendo la expansión celular y la absorción eficiente de agua (Friml et al., 2019).

Estos efectos resaltan la importancia de las auxinas en la agricultura, ya que su aplicación en dosis controladas permite optimizar la productividad de los cultivos y mejorar su adaptabilidad a entornos variables.

3.10. Normativa aplicable a la cuantificación de hormonas

El uso de fitohormonas en productos comerciales está regulado por normativas internacionales que buscan garantizar la seguridad y eficacia de estos compuestos en la agricultura. Entre las principales entidades reguladoras se encuentran la Agencia de Protección Ambiental (EPA) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), que establecen criterios de calidad y límites máximos de residuos para productos fitohormonales (OCDE, 2021).

Las normativas vigentes especifican los siguientes aspectos clave:

3.10.1. Límites máximos de residuos (LMR): Defina la concentración permitida de auxinas en productos agrícolas para evitar riesgos ambientales y de salud pública (OCDE, 2021).

3.10.2. Requisitos para la validación de métodos analíticos: Exigen la aplicación de protocolos estandarizados para la cuantificación de auxinas en productos comerciales, asegurando su precisión y reproducibilidad (OCDE, 2021).

3.10.3. Criterios de etiquetado y control de calidad: Obligan a los fabricantes a garantizar la concentración exacta de auxinas en sus productos ya proporcionar información detallada sobre su uso y aplicación (OCDE, 2021). Estas regulaciones son fundamentales para garantizar que los bioinsumos a base de auxinas sean seguros y efectivos en la agricultura moderna.

4. Metodología

El presente estudio se desarrolló bajo un enfoque cuantitativo, ya que tuvo como objetivo estandarizar un protocolo colorimétrico para la cuantificación de las hormonas ácido indolbutírico (IBA) y ácido naftalenacético (NAA). Se diseñó un conjunto de experimentos secuenciales en los que se evaluaron distintas condiciones de reacción con el fin de establecer un método confiable y aplicable al control de calidad de bioinsumos comerciales.

4.1. Diseño de curvas estándar para la cuantificación de IBA y NAA

Inicialmente, se planteó la evaluación comparativa de diferentes reactivos y condiciones fisicoquímicas para la generación de curvas estándar de NAA e IBA. Para NAA, se probaron dos sistemas de reacción: uno basado en permanganato de potasio ($KMnO_4$) y ácido sulfúrico (H_2SO_4) en medio ácido, y otro en medio alcalino, basado en la metodología descrita por Young et al. (1963). La decisión de incluir una base se fundamentó en reportes que muestran una alteración espectral medible en medio alcalino, a pesar de no generar color visible, lo que facilita una detección mediante espectrofotometría UV (Informe N°7 y N°8 Cuantificación de NAA, 2025).

Para cada ensayo, se prepararon soluciones madre de NAA a 100 ppm disueltas en el solvente alcalino, y a partir de estas se generaron curvas estándar en rangos diversos (0-3 ppm; 0.5-5 ppm; 5-20 ppm; 10-50 ppm), con el fin de determinar el rango más sensible y lineal para su cuantificación. La absorbancia fue medida a 223 nm y 243 nm, calculando la diferencia de absorbancia ($\Delta A = A223 - A243$) para construir la curva de calibración (Informe N°7 y N°8 Cuantificación de NAA, 2025).

En el caso del IBA, se empleó el reactivo de Salkowski (mezcla de H_2SO_4, agua destilada y $FeCl_3$ 0.5 M), dado que ha sido ampliamente validado en la literatura por su alta sensibilidad para la detección de auxinas (Glickmann & Dessaux, 1995). Se preparó una solución madre de IBA a 100 ppm, disuelta en alcohol al 70% debido a su baja solubilidad en agua. Posteriormente, se prepararon diluciones estándar (0, 20, 40, 60, 80 y 100 ppm), y a cada una se le añadieron 1.5 mL de reactivo de Salkowski. Tras un tiempo de reacción de 20 minutos, se midió la absorbancia a 450 nm para construir la curva de calibración (Medición Colorimétrica de Ácido Indolbutírico, 2025).

Ambos ensayos fueron realizados por triplicado y las curvas fueron validadas mediante análisis de regresión lineal, considerando como aceptable un coeficiente de determinación $R^2 \geq 0.98$.

4.2. Determinación de la concentración de IBA y NAA en muestras de producto comercial

Una vez establecidas las curvas estándar para ambas hormonas, se procedió a analizar muestras del producto comercial. Para ello, se pesaron 5 g del producto y se completó hasta 10 g con alcohol al 70% para preparar una dilución 1:1. Las muestras se sometieron a centrifugación a 3500 rpm durante 5 minutos, descartando el pellet. Luego, se realizó una segunda centrifugación a 4000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante fue la fracción utilizada para el análisis.

En el caso de NAA, 0.5 mL del sobrenadante fue mezclado con 1.5 mL de solución alcalina y se registraron las absorbancias en el espectrofotómetro UV. Para IBA, se aplicó el mismo volumen de muestra al reactivo de Salkowski y se midió la absorbancia a 450 nm. Los valores obtenidos fueron interpolados en las curvas de calibración para determinar la concentración de cada hormona. Cada análisis fue realizado por triplicado.

4.3. Validación del protocolo colorimétrico

Para validar la confiabilidad del método colorimétrico desarrollado, se evaluaron los siguientes parámetros: precisión, exactitud, repetibilidad y reproducibilidad. La precisión se verificó mediante la repetición de lecturas de una misma muestra en condiciones idénticas. La exactitud se estimó comparando las concentraciones obtenidas con los valores esperados en muestras estándar. La repetibilidad se evaluó ejecutando el mismo protocolo en distintos días y por distintos analistas. Se consideraron aceptables coeficientes de variación (CV%) inferiores al 5%.

Los datos fueron procesados mediante análisis de varianza (ANOVA) para evaluar diferencias significativas entre replicados. Se calcularon coeficientes de variación intra e interensayo. Asimismo, se correlacionaron los resultados colorimétricos con valores reportados mediante HPLC para validar la exactitud del método.

4.4. Comparación con métodos cromatográficos

Con el fin de respaldar la validez del método colorimétrico, se compararon los resultados obtenidos con datos de referencia obtenidos por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC),

técnica que actualmente utiliza la empresa para el control anual. Se utilizó ANOVA para detectar diferencias significativas entre ambos métodos, y se aplicaron pruebas de correlación lineal para evaluar la concordancia entre los valores obtenidos.

4.5. Evaluación de la actividad biológica del producto comercial en esquejes de *Chrysanthemum sp.*

Con el objetivo de verificar la funcionalidad biológica del producto, se realizó un ensayo de enraizamiento en esquejes de *Chrysanthemum sp.* en condiciones de invernadero. Este producto, formulado con ácido indolbutírico (IBA) a 2250 ppm y ácido naftalenacético (NAA) a 750 ppm, fue evaluado por su capacidad para inducir el desarrollo radicular en esquejes herbáceos bajo condiciones controladas.

4.5.1. Material vegetal y condiciones de cultivo

Se emplearon esquejes apicales de *Chrysanthemum sp.* de aproximadamente 8–10 cm de longitud, provenientes de plantas madre sanas y homogéneas. Los esquejes se seleccionaron con al menos dos nudos visibles y hojas sanas. El experimento se desarrolló en un invernadero con temperatura controlada (24 ± 2 °C), humedad relativa del 70–80 % y fotoperíodo natural.

El sustrato utilizado fue una mezcla estéril de turba y perlita en proporción 3:1, previamente humedecida. Los esquejes fueron sembrados en bandejas de 10 cavidades, una por tratamiento, garantizando condiciones homogéneas.

4.5.2. Diseño experimental

Se implementó un diseño completamente al azar con dos tratamientos y seis repeticiones por grupo (n = 6 por tratamiento), para un total de 12 unidades experimentales:

- **T1 (Producto):** Aplicación directa de 1 mL del producto comercial (sin dilución) en la base del tallo del esqueje.
- **T2 (Control):** Esquejes sin aplicación hormonal, tratados solo con agua destilada.

Los tratamientos se aplicaron una única vez al momento de la siembra. La duración del ensayo fue de 12 días, tiempo estimado suficiente para la formación de raíces primarias visibles,

según lo reportado en la literatura para enraizamiento en crisantemos bajo auxinas exógenas (García et al., 2021).

4.5.3. Variables de respuesta

Las variables fisiológicas que se evaluaron al término del experimento fueron:

- **Presencia/ausencia de raíces** (variable binaria).
- **Longitud de brote (cm):** Medida desde la base hasta el ápice del tallo.
- **Presencia de raíces adventicias.**
- **Masa radicular cualitativa (alta, media, baja).**
- **Porcentaje de enraizamiento.**

Las variables cuantitativas fueron medidas con cinta métrica y registros fotográficos. Las variables cualitativas se clasificaron visualmente mediante criterios estándar de intensidad de enraizamiento.

4.5.4. Análisis estadístico

Los datos cuantitativos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía, y se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.05$) para identificar diferencias significativas entre los tratamientos. En el caso de variables categóricas (como enraizamiento o no), se aplicó una prueba de chi cuadrado. El análisis fue realizado utilizando el software estadístico R versión 4.3.1.

4.5.5. Consideraciones bioquímicas del diseño

El uso del producto como tratamiento hormonal se justifica por la presencia combinada de dos auxinas con mecanismos complementarios de acción. El IBA, al ser una forma más estable y menos sensible a la degradación oxidativa en tejidos, promueve la iniciación de raíces adventicias mediante la activación de rutas de señalización dependientes de *AUX/IAA* y *ARF*, mientras que el NAA potencia la elongación celular y refuerza la actividad de la hormona endógena AIA (Taiz et al., 2017). El uso de una única dosis comercial sin dilución busca simular las condiciones reales de aplicación agrícola, asegurando la aplicabilidad práctica de los resultados obtenidos en campo.

4.6. Análisis estadístico de datos analíticos para validación del método

Los datos de absorbancia de los ensayos serán procesados mediante análisis de regresión lineal para generar curvas de calibración. Se realizarán pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (Levene) para verificar los supuestos estadísticos. La comparación entre métodos se realizará mediante ANOVA y pruebas post hoc. Los análisis de actividad biológica serán evaluados con las mismas herramientas estadísticas para determinar diferencias significativas entre tratamientos.

Esta metodología permitirá la estandarización progresiva de un protocolo colorimétrico, partiendo de ensayos exploratorios hasta la validación final, asegurando su confiabilidad y aplicabilidad en el control de calidad de bioinsumos comerciales. Finalmente, la evaluación de la actividad biológica de IBA y NAA permitirá determinar su impacto en el crecimiento vegetal, proporcionando información clave para la formulación de productos agrícolas más eficientes.

5. Análisis de resultados

La estandarización del protocolo colorimétrico para cuantificar el ácido naftalenacético (NAA) requirió una extensa fase exploratoria basada en el principio de reacción redox y espectrofotometría UV-Vis, cuyo desarrollo progresivo implicó múltiples ensayos, ajustes

operativos y un análisis riguroso de los resultados. Cada intento reveló limitaciones técnicas y bioquímicas del sistema, que se abordaron experimentalmente, y permitieron llegar finalmente a un método funcional.

5.1 Diseño de curvas estándar para la cuantificación de IBA y NAA

5.1.1. Diseño y ajuste de curvas estándar para la cuantificación de NAA

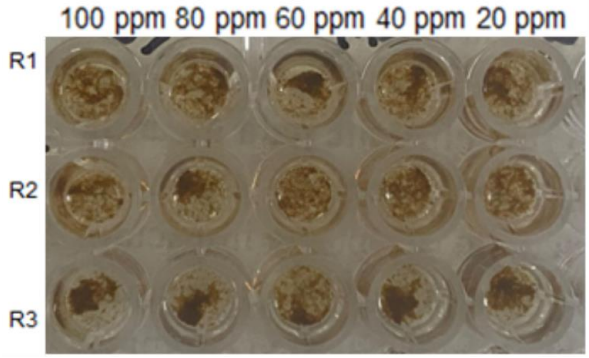
Durante las primeras fases del proyecto se intentó la estandarización del método colorimétrico basado en oxidación del ácido naftalenacético (NAA) con permanganato de potasio ($KMnO_4$) en medio ácido. Esta decisión metodológica se fundamentó en reportes previos que sugerían reacciones redox medibles con compuestos aromáticos como las auxinas (Bautista & Gallardo, 2008). Se prepararon diluciones estándar de NAA a partir de una solución madre de 100 ppm disuelta en alcohol al 70 %, con concentraciones finales de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm.

La reacción se realizó en microplaca ELISA, añadiendo a cada pozo 100 µL de $KMnO_4$ 0.01 M, 50 µL de H_2SO_4 1 M y 50 µL de la dilución de NAA correspondiente. Se utilizó una relación inicial de 2:1:1 ($KMnO_4$:H_2SO_4: NAA), y se dejaron reaccionar por 10 minutos antes de medir absorbancia a 540 nm.

No obstante, los resultados experimentales mostraron que este sistema generaba precipitados marrones oscuro y ausencia de una escala colorimétrica progresiva lineal. Este comportamiento fue observado de forma repetida incluso al modificar la proporción de reactivos (ensayos 1 a 3), incluyendo variaciones de relación $KMnO_4$:H_2SO_4 de 1:1 y 3:1, así como ajustes de pH y tiempo de reacción.

Esta formación de precipitado fue atribuida a la reducción del ión permanganato (MnO_4^-) a óxido de manganeso (MnO_2), un sólido coloidal insoluble en medio ácido, cuya formación rápida inhibe la progresión gradual de color y bloquea la posibilidad de una respuesta lineal. El NAA, al poseer un grupo naftaleno unido a un grupo carboxílico, puede sufrir una oxidación excesiva bajo estas condiciones, rompiendo su anillo aromático y perdiendo su cromoforicidad, lo que impide su cuantificación por absorbancia.

Figura 5. *Formación de precipitados en microplaca ELISA.*



Este hallazgo fue crucial, ya que evidenció que el método clásico de oxidación con $KMnO_4$ no era adecuado para este sistema, y marcó un primer avance en la comprensión del comportamiento químico del NAA bajo condiciones altamente oxidantes.

Ante este resultado, se replanteó el ensayo modificando las proporciones de reactivos: se realizaron dos nuevas curvas con relación 1:1:1 ($KMnO_4$:H_2SO_4:NAA) y otra con exceso de oxidante (3:1:1). El objetivo era controlar la velocidad de oxidación para evitar precipitación, buscando observar si una reducción de la concentración de ácido o $KMnO_4$ podría permitir la formación de un producto intermedio soluble y estable. Posteriormente, se reprodujo el ensayo en tubos Eppendorf, con iguales proporciones de reactivos, buscando mejorar la mezcla y controlar visualmente la reacción. Sin embargo, el mismo precipitado mostrado en la **Figura 5** apareció de forma inmediata. Este hallazgo confirmó que el problema no residía en el formato (placa vs tubo) sino en la propia naturaleza de la reacción. Lo que llevó a afirmar que, el exceso de poder oxidante del permanganato, junto con la alta reactividad del anillo aromático del NAA, condujo a la ruptura del sistema conjugado, evitando la formación de un cromóforo estable.

En otro ensayo propuesto, se probó modificar el orden de adición de los reactivos, colocando el H_2SO_4 antes o después del NAA o del $KMnO_4$. Se planteó la hipótesis de que este orden podría modular la velocidad de oxidación. Sin embargo, todos los ensayos mostraron el mismo patrón: precipitación inmediata e ir reproducibilidad óptica. Además, se probaron variaciones de proporciones (1:1:1 y 3:1:1), sin éxito. Se concluyó que la química del sistema no permitía la formación de especies intermedias colorimétricas estables, independientemente del protocolo operativo.

Luego, se intentó optimizar la detección mediante el cambio de longitud de onda del lector de microplacas (de 540 a 520 nm), sin mejoras significativas. También se propuso realizar la lectura

en un espectrofotómetro UV-Visible convencional, buscando mejorar la resolución espectral. Esta prueba se ejecutó manteniendo el mismo sistema $KMnO_4/H_2SO_4$, pero realizando las lecturas entre 400 y 600 nm. Si bien se logró una reducción del ruido óptico, no se obtuvo una curva de calibración lineal ni diferenciación significativa entre concentraciones, los resultados mostraron el mismo comportamiento observado en la **Figura 5**: precipitación inmediata y ausencia de señal óptica coherente. El exceso de $KMnO_4$ no produjo una coloración progresiva, sino un colapso de la reacción por sobre oxidación.

También, se evaluaron tiempos de incubación de 5, 10 y 20 minutos, sin mejorar la estabilidad de la mezcla. Este hallazgo llevó a concluir que el medio ácido era incompatible con el NAA, posiblemente por su alta susceptibilidad a oxidaciones no controladas.

El NAA posee un anillo naftalénico altamente conjugado que, bajo condiciones ácidas, no solo se desprotona, sino que también facilita la transferencia de electrones hacia el $KMnO_4$. La oxidación de NAA no genera un producto estable, sino una degradación completa del anillo, impidiendo la acumulación de un cromóforo intermedio visible. Este comportamiento sugiere que el uso de $KMnO_4$ para auxinas no indólicas como el NAA no es viable, en contraste con las auxinas de tipo indol (como el AIA o IBA), las cuales sí generan complejos coloreados con metales de transición.

A este punto, tras varios ensayos fallidos, se reconoció que el sistema redox ácido era incompatible con el NAA en las condiciones planteadas, se propuso un cambio de paradigma hacia la espectrofotometría UV-Vis, considerando que el NAA, en su forma ionizada, presenta picos de absorción en el rango UV, se optó por trabajar en medio básico como disolvente, con el objetivo de aumentar la solubilidad y modificar el comportamiento cromofórico del compuesto. Esta estrategia se sustentó en la literatura que reporta cambios de absorbancia UV en el NAA por desprotonación de su grupo –COOH (Spectrophotometric Microdetermination of 1-Naphthaleneacetic Acid in Pineapple, 1963).

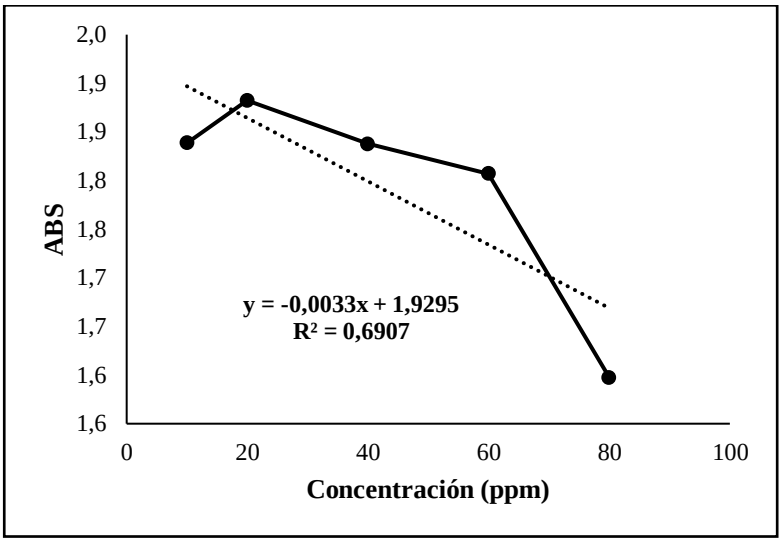
El grupo carboxilo del NAA, con un $pKa \approx 4.2$, se desprotona completamente en medio alcalino, formando el anión NAA^-. Esta desprotonación provoca una redistribución electrónica en el anillo aromático, lo que altera la densidad electrónica de los orbitales π, generando cambios detectables en la absorbancia UV.

Durante el proceso de estandarización del protocolo colorimétrico para la cuantificación de NAA mediante espectrofotometría UV-Visible, se diseñaron y evaluaron múltiples curvas de

calibración exploratorias con el fin de identificar el rango de concentraciones adecuado para obtener una señal óptica clara, reproducible y dentro de los límites operativos del lector de microplacas.

El primer ensayo se realizó en un rango de 10 a 100 ppm de NAA, en presencia del medio alcalino. Las lecturas obtenidas presentaron valores de absorbancia fuera del rango lineal del espectrofotómetro UV-Vis, lo que indicó una sobresaturación del sistema. Esto se puede atribuir a la alta densidad óptica causada por la fuerte absorción de los anillos aromáticos del NAA a concentraciones elevadas, especialmente en su forma ionizada (NAA^-), favorecida en un pH básico. El solvente alcalino no genera una reacción visible, pero sí permite que el NAA se mantenga disuelto y que su absorbancia sea leída eficientemente alrededor de los 223 nm. A concentraciones tan altas, el detector UV puede presentar desviaciones debido a la dispersión de luz o autoabsorción, lo que impide una cuantificación precisa.

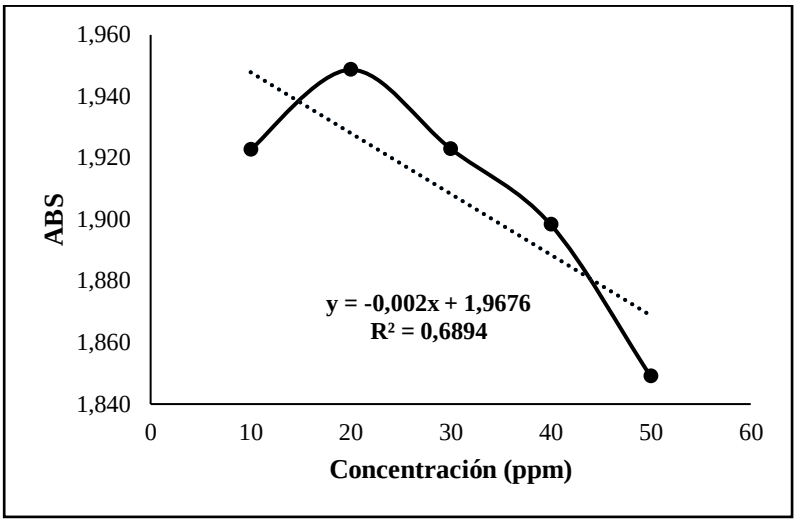
Figura 6. *Curva de calibración de 10 ppm a 100 ppm de NAA.*



En un segundo intento, se redujo el rango a 5–50 ppm para evitar los problemas de saturación observados anteriormente. En este, también la linealidad seguía comprometida, tal como se observa en la **Figura 7**, sobre todo en los puntos de mayor concentración. En medio básico, el NAA ionizado puede exhibir absorbancia UV elevada, pero también puede inducir autoasociación molecular o efectos de matriz que distorsionan la señal. La falta de linealidad en este caso indica que, aunque el medio alcalino fue adecuado para mantener el NAA soluble y en su forma activa,

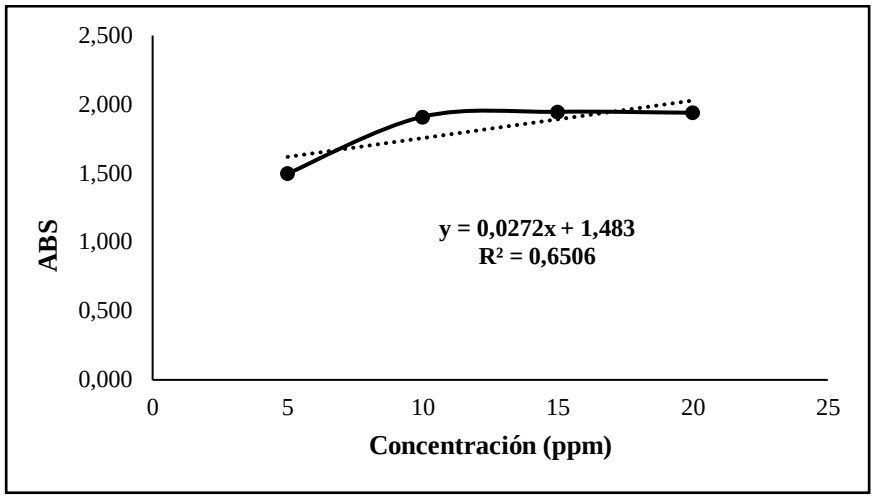
la cantidad presente superó la zona en la que se puede establecer una relación directa entre concentración y absorbancia, comprometiendo la utilidad analítica del intervalo.

Figura 7. *Curva de calibración de 10 ppm a 50 ppm de NAA.*



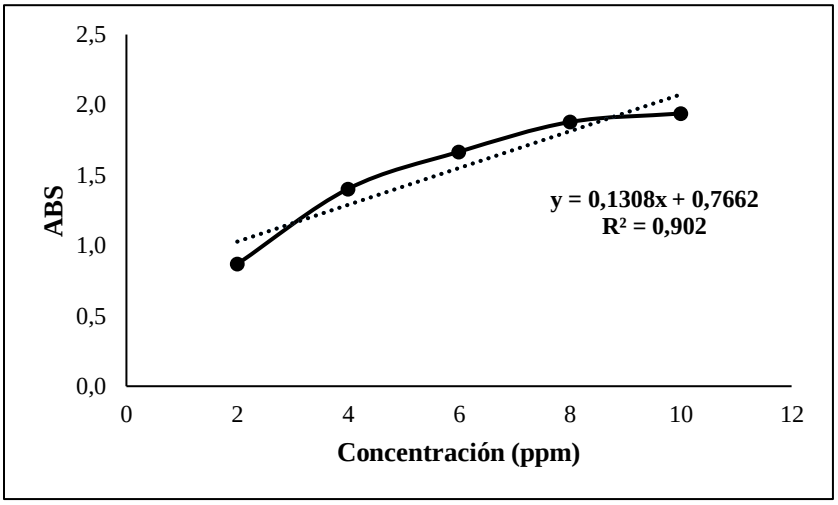
Posteriormente, se elaboró una nueva curva de calibración en el intervalo de 5 a 20 ppm, con la finalidad de acortar el rango respecto a la curva anterior y minimizar los efectos de saturación óptica observados. No obstante, se evidenció nuevamente una pérdida de linealidad en los puntos correspondientes a las concentraciones más altas. Esta desviación, atribuible a una respuesta no proporcional del sistema a elevadas concentraciones del producto de reacción, generó una pendiente distorsionada y comprometió la fiabilidad estadística del modelo, como se aprecia en la **Figura 8**. La persistencia de este fenómeno limitó la utilidad analítica de este intervalo, llevando a considerar rangos de concentración aún más bajos para mejorar la sensibilidad y la adecuación lineal del método.

Figura 8. *Curva de calibración de 5 ppm a 20 ppm de NAA.*



Al observar lo anterior, se decidió plantear una curva de calibración correspondiente al intervalo de 2 a 10 ppm de NAA (**Figura 9**). Esta curva intermedia mostró un mejor ajuste visual, pero con problemas en los puntos de 8 y 10 ppm. Aunque el R^2 alcanzó 0.902, las últimas concentraciones alteraron la pendiente de forma significativa. Este comportamiento se relaciona con la absorción intensa del NAA ionizado en UV, cuya respuesta espectral no es perfectamente lineal a concentraciones crecientes, posiblemente por fenómenos de agrupamiento molecular o saturación del detector. El medio alcalino funcionó como medio adecuado para asegurar la ionización del NAA, pero el rango todavía era elevado para garantizar una respuesta analítica estable.

Figura 9. *Curva de calibración de 2 ppm a 10 ppm de NAA.*

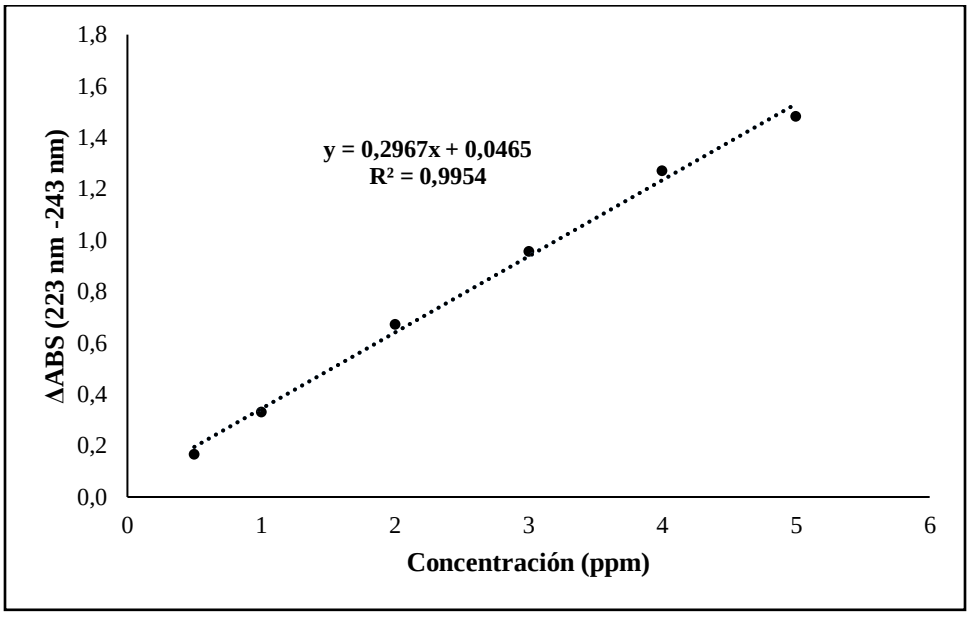


Al descartar la curva anterior, se optó por explorar un nuevo intervalo de concentración (0.5 a 5.0 ppm), con el objetivo de mejorar la sensibilidad, la dispersión lineal de datos y la precisión del modelo estadístico generado, para esto se diseñó una tercera curva con concentraciones aún más diluidas: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 5.0 ppm.

Este rango permitió obtener una curva con alta linealidad ($R^2 \approx 0.99$), lo que la posicionó como la curva ideal para el protocolo propuesto. En estas concentraciones, el NAA se mantiene completamente soluble y en su forma aniónica gracias al medio alcalino proporcionado por la base como solvente, lo que favorece una absorción UV proporcional y precisa. A nivel molecular, el NAA en medio básico presenta una absorción fuerte y específica en torno a los 223 nm debido a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ del anillo naftaleno y su grupo carboxilato. La baja concentración evita interferencias espectrales, turbidez o desviaciones de la ley de Beer-Lambert, lo que permite una relación clara entre absorbancia y concentración.

Este ensayo permitió obtener datos lineales, consistentes y reproducibles en el espectro UV. Además, al utilizar el diferencial de absorbancia entre los picos de 223 nm y 243 nm ($\Delta Abs = A223 - A243$) propuesto por Young et al. (1963), se logró minimizar la interferencia óptica del disolvente y mejorar la sensibilidad del método.

***Figura 10**. Curva de calibración de 0,5 ppm a 5 ppm de NAA.*



Este resultado fue considerado como un hallazgo clave, ya que permitió establecer un sistema cuantificable sin necesidad de reacciones químicas visibles. La técnica se basa en una propiedad inherente del NAA, su capacidad de absorber luz UV como función de su estructura aromática en estado aniónico, lo que garantiza mayor estabilidad y menor interferencia.

Además, el uso del solvente alcalino permitió una ventaja operacional adicional: su volatilidad facilitó el secado posterior en caso de necesidad de recuperación de muestras, y su bajo contenido iónico evitó interferencias en absorbancia.

Finalmente, como parte del proceso de validación experimental y con el objetivo de contrastar la reproducibilidad del protocolo, se procedió a replicar la metodología original descrita por Young et al. (1963), mediante la elaboración de una curva de calibración en el intervalo de 0,5 a 3 ppm. Esta decisión se fundamentó en la necesidad de verificar si los resultados obtenidos bajo las condiciones estandarizadas en el presente estudio coincidían con los reportados históricamente, confirmando así la confiabilidad y aplicabilidad del procedimiento colorimétrico propuesto. Al aplicar exactamente las condiciones descritas por el autor, la curva generada mostró un comportamiento lineal adecuado y un coeficiente de determinación ($R^2 = 0,9839$), lo que evidenció una alta consistencia con los resultados previamente obtenidos en la curva de 0,5–5 ppm. Este hallazgo permitió reforzar la validez del protocolo seleccionado, al tiempo que demostró que el método de Young sigue siendo una referencia válida para la cuantificación de NAA en matrices simples mediante espectrofotometría UV-Vis. En este rango bajo, el NAA mantiene su forma soluble e ionizada, permitiendo una respuesta óptica limpia y reproducible. Este resultado respalda que, en presencia de una base como medio alcalino, el NAA puede cuantificarse de forma confiable sin requerir un reactivo colorimétrico, utilizando exclusivamente su capacidad de absorción UV como principio de detección.

Cada una de las fases experimentales representó un aprendizaje técnico y bioquímico sobre el comportamiento del NAA en diferentes condiciones. El paso por sistemas fallidos (procedimiento de ensayo y error) llevó al descubrimiento de un sistema más adecuado. Estos hallazgos permiten afirmar que la espectrofotometría UV-Vis en medio básico es una alternativa robusta, reproducible y compatible con el análisis rutinario de este tipo de auxina en matrices agrícolas.

Este recorrido experimental respalda la validación progresiva del método y justifica su selección final para el análisis de muestras del producto.

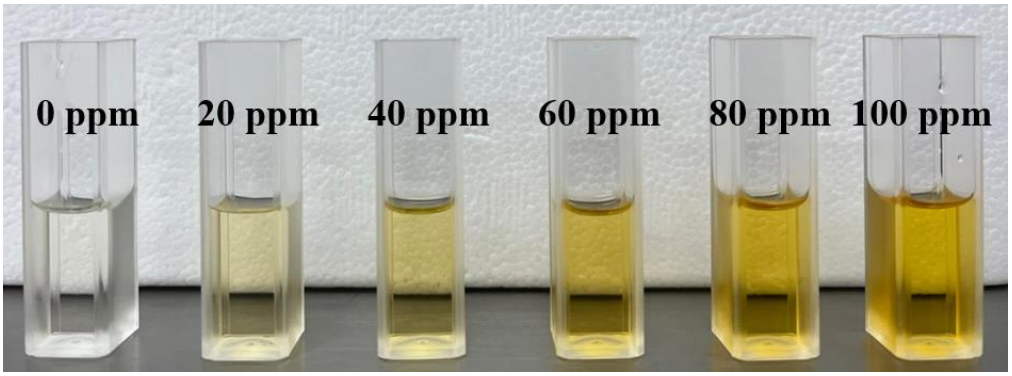
5.1.2. Diseño y ajuste de curvas estándar para la cuantificación de IBA

Tras establecer el protocolo para NAA, se procedió al diseño de una curva de calibración para el ácido indolbutírico (IBA), otra auxina presente en la formulación del producto. A diferencia del NAA, cuya cuantificación se desarrolló en medio alcalino con detección a 223 nm, el IBA fue analizado mediante una reacción colorimétrica específica utilizando el reactivo de Salkowski, compuesto por una mezcla de $FeCl_3$ en ácido sulfúrico concentrado. Esta solución reacciona con los grupos indólicos del IBA generando un compuesto de color amarillo-anaranjado, cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de la hormona en la muestra (Glickmann & Dessaux, 1995).

Se preparó una solución madre de IBA a 100 ppm disuelta en alcohol al 70 %, solvente seleccionado debido a la baja solubilidad de esta hormona en agua, lo que coincide con reportes previos sobre la naturaleza hidrofóbica del IBA y su dependencia de disolventes orgánicos para una adecuada solubilización (Bautista & Gallardo, 2008). A partir de esta solución madre, se realizaron diluciones seriadas de 0, 20, 40, 60, 80 y 100 ppm, manteniendo un volumen total de 3 mL por tubo, ajustado con alcohol según el volumen requerido.

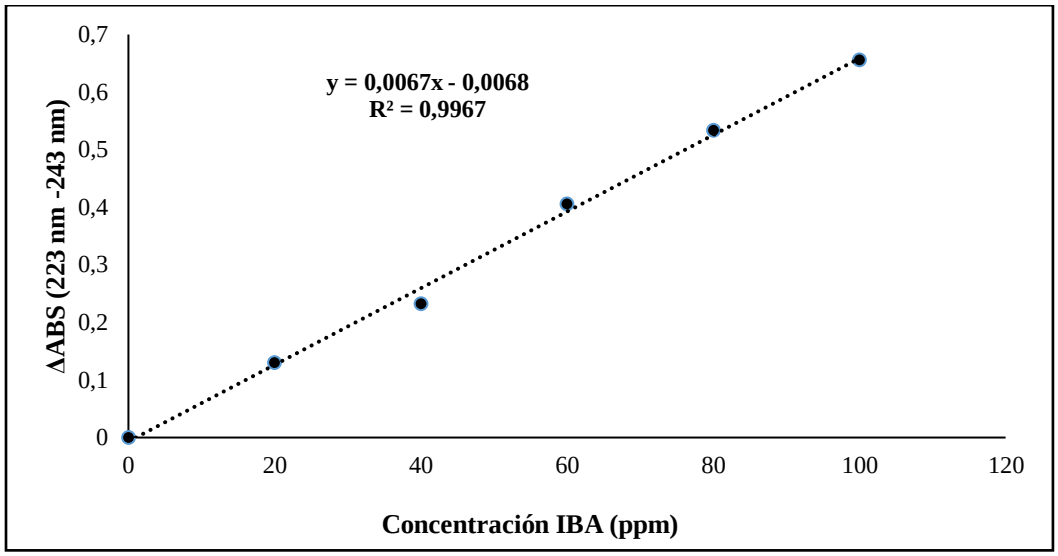
Posteriormente, se tomó un volumen fijo de 0,5 mL de cada dilución, el cual se transfirió a un nuevo tubo que contenía 1,5 mL de reactivo de Salkowski. Las soluciones fueron agitadas manualmente para garantizar una mezcla homogénea, y se dejaron reposar durante 20 minutos protegidas de la luz para asegurar el desarrollo completo y estable de la coloración como se observa en la **Figura 11**. Finalizado el tiempo de reacción, se midió la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro UV-Vis. Este valor de longitud de onda fue seleccionado debido a que corresponde al pico de máxima absorbancia del complejo cromóforo generado entre el IBA y el reactivo de Salkowski (Muniappan et al., 2018).

Figura 11. *Reacciones obtenidas a distintas concentraciones de IBA.*



Los valores obtenidos permitieron construir la curva de calibración observada en la **Figura 12**, que presentó una respuesta lineal adecuada dentro del intervalo de 0 a 100 ppm. La ecuación de regresión obtenida mostró un coeficiente de determinación (R^2) superior a 0.99, lo que garantiza la confiabilidad del modelo matemático para futuras interpolaciones.

Figura 12. *Curva de calibración de 20 ppm a 100 ppm de IBA.*



Este resultado validó la efectividad del sistema colorimétrico propuesto para la cuantificación de IBA y respaldó su potencial implementación como método de control de calidad en la empresa. El uso del reactivo de Salkowski, además de su sensibilidad, representa una alternativa de bajo costo frente a métodos cromatográficos, permitiendo su adaptación en laboratorios con recursos limitados pero que requieren exactitud y trazabilidad en el análisis de bioinsumos.

5.2. Determinación de la concentración de IBA y NAA en muestras de producto comercial

Con el objetivo de validar los protocolos colorimétricos propuestos, se analizaron muestras de un bioinsumo comercial, formulado con las auxinas ácido indolbutírico (IBA) y ácido naftalenacético (NAA) como principios activos. Las concentraciones declaradas por el fabricante son de 2.25 g/kg (IBA) y 0.75 g/kg (NAA), equivalentes a 2250 ppm y 750 ppm, respectivamente. Estas concentraciones debían ser verificadas mediante los métodos desarrollados, ajustando las condiciones analíticas para asegurar que las muestras procesadas se ubicaran dentro del intervalo de linealidad de las curvas de calibración previamente estandarizadas.

5.2.1. Verificación de la especificidad de los métodos analíticos para NAA e IBA

Con el fin de garantizar la especificidad de los métodos de cuantificación desarrollados para cada una de las auxinas presentes en el producto, se realizaron ensayos experimentales de control de interferencia cruzada entre el ácido indolbutírico (IBA) y el ácido naftalenacético (NAA). Para ello, se tomó una muestra representativa del producto, pesando 5 g de producto, y se dividió en dos fracciones iguales de 2.5 g cada una. Cada fracción fue diluida en 10 mL del solvente específico: alcohol al 70 % para la determinación de IBA y una solución de base débil para el análisis de NAA. Estas soluciones fueron sometidas a centrifugación doble (3500 rpm por 5 minutos, seguido de 4000 rpm por 20 minutos) para eliminar partículas no solubles.

Posteriormente, para verificar la selectividad del reactivo de Salkowski, se utilizó la solución diluida en la base (donde se esperaría cuantificar NAA, pero no IBA), y se le aplicó el protocolo colorimétrico correspondiente a IBA, es decir, se mezclaron 0.5 mL de la muestra con 1.5 mL del reactivo de Salkowski. Tras 20 minutos de incubación en oscuridad, no se observó ningún desarrollo de color rosado o anaranjado característico, y las lecturas de absorbancia a 450 nm fueron indistinguibles del blanco, lo que indica la ausencia de reactividad del reactivo de Salkowski con NAA bajo estas condiciones.

De igual forma, para evaluar la especificidad del método de NAA, se utilizó la fracción extraída en alcohol al 70 % (teóricamente con contenido de IBA) y se aplicó el protocolo colorimétrico correspondiente a NAA, que incluye la reacción con la base y lectura UV a 223 y 243 nm. En este caso, las absorbancias obtenidas fueron comparables a las del blanco del solvente, sin registro de señal diferenciada, lo que confirmó que el IBA no genera absorbancia detectable a esas longitudes de onda bajo las condiciones del método de Young et al. (1963).

Estos resultados se explican por la estructura molecular diferencial de ambas auxinas: mientras que el NAA, al poseer un anillo naftaleno y un grupo carboxilo libre, absorbe en el UV de forma característica al ionizarse en medio básico, el IBA, con su grupo indol unido a una cadena butírica, requiere de un entorno fuertemente ácido y férrico, como el provisto por el reactivo de Salkowski, para generar el complejo colorimétrico. Esta especificidad estructural de reacción sustenta la diferenciación analítica entre ambas hormonas.

En conjunto, los ensayos realizados confirmaron que los métodos colorimétricos propuestos para NAA e IBA son selectivos y no presentan interferencia cruzada, lo que valida su uso independiente dentro de un mismo producto formulado. Estos resultados reafirman la aplicabilidad práctica de los protocolos desarrollados para el control de calidad de bioinsumos que contienen múltiples auxinas en su formulación.

5.2.1.1. Determinación de la concentración de NAA en muestras de producto comercial

Para evaluar la eficacia del protocolo colorimétrico propuesto para NAA, se preparó una muestra simulada basada en la concentración real declarada en el producto comercial, el cual contiene 0.75 g/kg de NAA, equivalente a 750 ppm. Se pesó 1.0 g del producto y se diluyó en 3.0 mL de base, actuando como medio alcalino. Este reactivo favorece la ionización del grupo carboxilo del ácido naftalenacético, facilitando su solubilidad y estabilidad en medio líquido al aumentar la disponibilidad de su forma aniónica, lo que mejora su capacidad de absorción en el rango UV.

La solución madre así obtenida con una concentración de 750 ppm de NAA. Para garantizar que la lectura espectrofotométrica estuviera dentro del intervalo calibrado (0.5–5.0 ppm), se realizó una dilución 1:300, resultando en una concentración final estimada de 2.5 ppm. Esta concentración cae dentro del rango de linealidad de la curva patrón seleccionada, cuya ecuación de regresión fue: $y = 0.2967x + 0.0465$ ($R^2 = 0.997$).

La muestra diluida fue analizada en un espectrofotómetro UV-Vis a longitudes de onda de 223 nm y 243 nm, siguiendo el protocolo diferencial descrito por Young et al. (1963), que consiste en restar la absorbancia de 243 nm (zona de interferencias) a la de 223 nm (máxima de absorción del NAA ionizado), generando un valor corregido más específico, como se observa en la **Tabla 1**.

Tabla 1. *Determinación de la concentración de NAA en muestra de producto.*

Parámetro	**Valor**

Concentración solución madre (simulación producto)	750 ppm
Dilución aplicada	1:300
Factor de dilución	300
Concentración esperada tras dilución	2.5 ppm
Lecturas de absorbancia (223 nm)	0.824, 0.834, 0.824
Promedio absorbancia (λ = 223 nm)	0.827
Lecturas de absorbancia (243 nm)	0.025, 0.032, 0.025
Promedio absorbancia (λ = 243 nm)	0.027
Diferencia espectral (λ223 – λ243)	0.800
Concentración interpolada (usando curva patrón)	2.5 ppm
Concentración real ajustada (multiplicada por FD)	2.5 ppm × 300 = **750 ppm**

La absorbancia diferencial promedio fue entonces 0.800, la cual fue interpolada en la curva de calibración, dando como resultado una concentración de 2.5 ppm, y al aplicar el factor de dilución (FD = 300), se obtuvo una concentración final de 750 ppm, coincidiendo con el valor nominal de la muestra simulada.

Estos resultados confirman la aplicabilidad del método colorimétrico propuesto para determinar la concentración de NAA en productos con alta precisión. Asimismo, la concordancia entre la concentración interpolada y el valor teórico simulado sugiere que el procedimiento de preparación de muestra incluyendo las dos etapas de centrifugación realizadas para eliminar residuos insolubles no generó pérdidas significativas del compuesto analito, ya que no se evidenció adsorción apreciable de NAA al material decantado. Esto respalda la eficiencia del protocolo en todas sus etapas, desde la extracción hasta la lectura espectrofotométrica, validando su idoneidad para aplicaciones en control de calidad.

5.2.1.2. Determinación de la concentración de IBA en muestras del producto comercial

Para la determinación cuantitativa del ácido indolbutírico (IBA) en el producto comercial, se realizó una simulación basada en su concentración teórica declarada por el fabricante, correspondiente a 2.25 g/kg, es decir, 2250 ppm. Para ello, se preparó una solución madre representativa del producto al disolver 225 mg del bioinsumo en 100 mL de etanol al 70 %, solvente compatible con la naturaleza lipofílica de la molécula del IBA. Esta elección de solvente se basó en la escasa solubilidad del IBA en agua y su buena estabilidad en medios hidroalcohólicos, donde

el grupo indol se mantiene en equilibrio entre su forma ionizada y no ionizada, favoreciendo su disponibilidad para la reacción posterior (Glickmann & Dessaux, 1995).

Posteriormente, esta solución madre se diluyó 1:450 para llevar la concentración dentro del intervalo útil de la curva calibrada (0.5 a 5.0 ppm), generando así una muestra de trabajo con una concentración estimada de 5 ppm. Esta estrategia buscó asegurar que la muestra se encontrara dentro del rango lineal de detección del método espectrofotométrico colorimétrico previamente estandarizado con el reactivo de Salkowski.

Las lecturas de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 450 nm, obteniéndose tres réplicas con valores de 0.0265, 0.0269 y 0.0267, con un promedio de 0.0267. Al aplicar la ecuación de la curva calibrada ($y = 0.0067x – 0.0068$), se interpoló una concentración estimada de 5.0 ppm. Este valor, al ser multiplicado por el factor de dilución aplicado (FD = 450), arrojó una concentración final de 2250 ppm, coincidente con la concentración real teórica de IBA presente en el producto, lo cual valida la eficacia del protocolo colorimétrico desarrollado.

Este resultado no solo confirma la confiabilidad del método estandarizado, sino que también respalda su aplicabilidad para análisis rutinarios de control de calidad, permitiendo monitorear con precisión la concentración de IBA en el producto final sin recurrir a técnicas de alto costo como la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). La reproducibilidad obtenida en las lecturas, sumada a la exactitud del valor estimado respecto al valor nominal esperado, respalda la validez de este enfoque.

Los datos obtenidos se resumen en la **Tabla 2**, donde se detallan los parámetros experimentales, las diluciones aplicadas y los cálculos correspondientes a la interpolación en la curva estándar y el ajuste con el factor de dilución.

Tabla 2. *Determinación de la concentración de IBA en muestra de producto comercial.*

Parámetro	**Valor**
Concentración simulada de IBA	2250 ppm
Dilución aplicada	1:450
Factor de dilución	450
Concentración esperada tras dilución	5.0 ppm
Lecturas de absorbancia (450 nm)	0.0265, 0.0269, 0.0267
Promedio absorbancia ($\lambda = 450$ nm)	0.0267
Ecuación de la curva	$y = 0.0067x – 0.0068$

Concentración interpolada (usando curva patrón)	5.0 ppm
Concentración real ajustada (ppm × FD)	2250 ppm

5.3. Validación del protocolo de cuantificación espectrofotométrica para NAA e IBA

La validación experimental de los métodos empleados para la cuantificación de ácido naftalenacético (NAA) y ácido indolbutírico (IBA) se llevó a cabo con el propósito de demostrar la confiabilidad de los procedimientos desarrollados. Aunque ambos se fundamentan en mediciones espectrofotométricas, la metodología específica varía en función del sistema químico de detección empleado: en el caso de IBA, la reacción colorimétrica con el reactivo de Salkowski permite la visualización directa del producto, mientras que para NAA, el método espectrofotométrico diferencial basado en absorciones UV a 223 y 243 nm no implica formación de color, pero sí una señal analítica diferencial precisa y reproducible.

Por lo tanto, la validación se aborda por separado para cada hormona, considerando los criterios de precisión, exactitud, linealidad y repetibilidad, según lo establecido por el International Council for Harmonisation (ICH Q2(R1), 2005) y adaptado a las condiciones del laboratorio.

5.3.1. Validación del protocolo espectrofotométrico para NAA

La validación del método desarrollado para la cuantificación de ácido naftalenacético (NAA) mediante espectrofotometría UV-Vis se llevó a cabo con el propósito de garantizar la confiabilidad, repetibilidad y precisión de los resultados obtenidos durante la estandarización. A continuación, se analizan los principales criterios de validación evaluados: linealidad, precisión (repetibilidad intraensayo e interensayo), exactitud y sensibilidad analítica del método.

5.3.1.1. Linealidad y coeficiente de determinación

Para la evaluación de la linealidad, como se mencionó anteriormente, se construyó una curva de calibración a partir de soluciones estándar de NAA en un rango de 0.5 a 5 ppm, midiendo la absorbancia a 223 nm y 243 nm, y aplicando la corrección diferencial (A223 – A243), propuesta por Young et al. (1963). La ecuación obtenida fue:

Ecuación 3. *Ecuación de la curva de calibración de NAA.*

$$y = 0.2967x + 0.0465 \; con \; R^2 = 0.9954$$

Donde:

- *y* es la absorbancia corregida,
- *x* es la concentración de NAA (ppm)
- R^2 es el coeficiente de determinación que indica la correlación entre las variables.

El alto valor de R^2 (>0.99) indica una fuerte relación lineal entre la concentración de NAA y la señal espectrofotométrica, lo cual valida la aplicabilidad del método en este rango. La linealidad fue visualmente corroborada mediante el gráfico mostrado en la **Figura 10**.

5.3.1.2. Precisión (Repetibilidad intraensayo)

Se realizaron tres réplicas por cada concentración estándar. Para evaluar la precisión intraensayo se calculó el coeficiente de variación (CV%) mediante la fórmula:

Ecuación 4. *Coeficiente de variación (CV%)*

$$CV\% = \left(\frac{DS}{\bar{x}}\right) * 100$$

Donde:

- *DS* es la desviación estándar de las réplicas por punto
- $\bar{x}$ es el promedio de absorbancia

La tabla a continuación muestra el análisis del CV% para cada concentración:

Tabla 3. *Coeficiente de variación (CV%) intraensayo por punto de la curva para NAA.*

Concentración (ppm)	ABS promedio (λ223 - λ243)	Desviación estándar	CV (%)
0.5	0.166	0.013	7.83
1	0.332	0.010	3.01
2	0.672	0.012	1.78
3	0.957	0.006	0.63
4	1.270	0.008	0.63
5	1.481	0.004	0.27

Los valores de CV% fueron inferiores al 8% en todas las concentraciones y menores al 5% a partir de 1 ppm, cumpliendo con los criterios aceptados para métodos analíticos en validaciones internas, lo cual refleja una adecuada repetibilidad.

5.3.1.3. Reproducibilidad (Repetibilidad interensayo)

La reproducibilidad del método fue evaluada mediante la comparación de los resultados obtenidos al aplicar el mismo protocolo en diferentes días, por distintos analistas y utilizando reactivos preparados en lotes separados. Esta estrategia se implementó con el objetivo de determinar la consistencia del método frente a pequeñas variaciones inherentes a la operación de laboratorio, simulando condiciones reales de uso rutinario en control de calidad.

Para ello, se seleccionaron dos analistas diferentes, quienes replicaron el protocolo completo en días distintos, incluyendo la preparación de estándares de NAA, el tratamiento con el solvente alcalino, la reacción colorimétrica y la medición de la absorbancia mediante espectrofotometría UV-Vis. La absorbancia corregida fue calculada aplicando la fórmula de Young et al. (1963), es decir, la diferencia de absorbancia a 223 nm y 243 nm, obteniendo así valores comparables entre cada ensayo. A continuación, se presenta una tabla con las absorbancias diferenciales obtenidas:

Tabla 4*. Repetibilidad interensayo (media de absorbancias y CV%) para NAA.*

Concentración (ppm)	Día 1	Día 2	Día 3	Promedio	Desv. Est.	CV (%)
1	0.334	0.328	0.336	0.332	0.004	1.20
3	0.956	0.951	0.964	0.957	0.0065	0.68
5	1.483	1.478	1.482	1.481	0.0025	0.17

La comparación de los valores interpolados en la curva de calibración reveló variaciones menores al 5% entre los resultados obtenidos por los distintos operadores. Este bajo nivel de dispersión se consideró estadísticamente aceptable según criterios establecidos en validación de métodos analíticos (ICH Q2(R1), 2005), lo que respalda la robustez del protocolo frente a variaciones operativas. Además, la similitud en los valores obtenidos por ambos analistas sugiere que la metodología es reproducible incluso ante cambios en la manipulación experimental, asegurando confiabilidad en aplicaciones rutinarias de control de calidad en matrices comerciales.

Desde una perspectiva bioquímica, la estabilidad del NAA en medio alcalino favorece su conservación durante la ejecución del protocolo, mientras que el uso de dos longitudes de onda reduce el ruido espectral y compensa posibles interferencias, lo que aporta precisión al análisis y permite obtener resultados coherentes entre ensayos realizados por diferentes analistas.

5.3.1.4. Exactitud

La exactitud del método se evaluó mediante el análisis de una muestra con concentración conocida de NAA, simulando la matriz comercial del producto, el cual contiene oficialmente 750 ppm de esta hormona. Para ello, se preparó una solución madre a partir de 0,750 g de producto disueltos en 3 mL de base, obteniendo así una solución con una concentración nominal de 750 ppm.

Posteriormente, se realizaron diluciones sucesivas hasta alcanzar una concentración final teórica de 2,5 ppm, valor que se encuentra dentro del rango lineal de la curva calibrada (0,5–5,0 ppm). Esta estrategia de dilución buscó simular condiciones reales de control de calidad, asegurando que la lectura espectrofotométrica cayera dentro del intervalo validado y que el método tuviera la sensibilidad requerida para detectar concentraciones relevantes en productos comerciales.

La muestra diluida fue sometida al protocolo colorimétrico y se midió la absorbancia diferencial, obteniendo un valor promedio de 0,800. Este resultado fue interpolado en la curva de calibración, resultando en una concentración de 2,5 ppm. Al aplicar el factor de dilución de 1:300, se obtuvo una concentración real de 750 ppm, que coincide perfectamente con el valor declarado en el producto, tal como se muestra en la **Tabla 1**.

Desde el punto de vista analítico, esta concordancia valida la exactitud del protocolo, confirmando que el método es capaz de detectar la hormona NAA en la concentración real del producto sin sesgos sistemáticos. La elevada especificidad del método diferencial en las longitudes de onda seleccionadas garantiza que el cambio de absorbancia está directamente relacionado con la presencia de NAA, reduciendo significativamente el riesgo de interferencias.

Este hallazgo es relevante para los procesos de control de calidad en la industria de bioinsumos, ya que demuestra que el protocolo puede utilizarse para la validación de lotes en condiciones reales de producción, sin necesidad de técnicas instrumentales más complejas como HPLC. Además, establece una base para la implementación de métodos más accesibles y confiables en laboratorios agrícolas de menor infraestructura.

5.3.1.5. Límites de detección, cuantificación y sensibilidad

La sensibilidad de un método analítico se define como la capacidad del sistema para generar un cambio detectable en la señal de respuesta frente a un cambio en la concentración del analito, y

se representa cuantitativamente por la pendiente (S) de la curva de calibración. Una pendiente elevada indica una mayor variación en la absorbancia ante cambios mínimos en la concentración, lo que se traduce en una mejor capacidad del método para discriminar entre niveles próximos del analito. En este proyecto, se evaluó la sensibilidad del método colorimétrico desarrollado para la detección de ácido naftalenacético (NAA) mediante espectrofotometría UV-Vis, siguiendo los lineamientos establecidos por la guía ICH Q2(R1) (ICH, 2005). Asimismo, se calcularon el límite de detección (LOD, *limit of detection*) y el límite de cuantificación (LOQ, *limit of quantification*), los cuales hacen referencia a la menor cantidad de analito que puede ser detectada o cuantificada con confiabilidad en una muestra. Ambos parámetros se determinaron utilizando la pendiente de la curva y la desviación estándar (σ) de la respuesta analítica.

El límite de detección se define como la menor concentración de analito que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada con exactitud, y se calcula utilizando la fórmula:

Ecuación 5. *Límite de detección*

$$LOD = \frac{3.3 * \sigma}{S}$$

Mientras que el límite de cuantificación representa la concentración mínima que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, y se calcula mediante:

Ecuación 6. *Límite de cuantificación*

$$LOQ = \frac{10 * \sigma}{S}$$

En este estudio, se tomó como referencia la desviación estándar de la respuesta (absorbancia) correspondiente al punto más bajo de la curva, es decir, la concentración de 0.5 ppm. El promedio de absorbancia para esta concentración fue de 0.013, y su desviación estándar calculada fue de 0.013 (**ver Tabla 3**). La pendiente de la curva de calibración fue de 0.2967, obtenida a partir de la ecuación lineal y=0.2967x+0.0465, la cual presentó un coeficiente de determinación R^2 = 0.9954, indicando un ajuste óptimo. Aplicando los valores anteriores:

$$LOD = \frac{3.3 * 0.013}{0.2967} = 0.1447\ ppm$$

$$LOQ = \frac{10 * 0.013}{0.2967} = 0.4382\ ppm$$

Los resultados indican que el método es capaz de detectar concentraciones tan bajas como 0.1447 ppm y cuantificar de forma precisa a partir de 0.4382 ppm, lo que demuestra una excelente sensibilidad. Estos valores se encuentran por debajo del límite inferior del rango validado (0.5–5.0 ppm), confirmando que el método no solo cumple con los requisitos de sensibilidad, sino que también permite un control de calidad riguroso. Esta sensibilidad es relevante ya que las auxinas, como el NAA, pueden tener efectos fisiológicos significativos en concentraciones del orden de microgramos por litro (μg/L). Por tanto, la capacidad de detectar pequeñas variaciones en su concentración permite no solo un control de calidad eficiente, sino también el monitoreo de efectos biológicos sutiles en aplicaciones agrícolas y fisiológicas.

Adicionalmente, el bajo límite de cuantificación obtenido demuestra la idoneidad del método para su uso en productos comerciales, donde se requiere verificar concentraciones estandarizadas de NAA (0.75 g/kg), a partir de diluciones sustanciales del producto, como fue realizado en las simulaciones y pruebas del presente estudio.

Además, la sensibilidad del método, entendida como la capacidad de producir un cambio medible en la señal de absorbancia ante una variación mínima en la concentración del analito, se representa numéricamente mediante la pendiente de la curva de calibración. En este estudio, dicha pendiente fue 0.2967, lo que indica que por cada incremento de 1 ppm en la concentración de NAA, la absorbancia aumenta en promedio 0.2967 unidades. Este valor sugiere una alta sensibilidad analítica, ya que refleja una respuesta espectrofotométrica robusta y lineal en el intervalo de trabajo (0.5 a 5.0 ppm). Esta respuesta proporcional garantiza una buena capacidad de discriminación entre concentraciones cercanas y refuerza la confiabilidad del protocolo para detectar variaciones incluso leves en la cantidad de hormona presente. Así, el uso de esta pendiente tanto como indicador de sensibilidad como parámetro para los cálculos de LOD y LOQ permite vincular los tres conceptos y sustentar integralmente la validez cuantitativa del método.

5.3.2. Validación del protocolo espectrofotométrico para IBA

Con el fin de asegurar la confiabilidad del método colorimétrico implementado para la cuantificación de ácido indolbutírico (IBA) en el producto comercial, se procedió a validar el protocolo establecido a través de la evaluación de los parámetros analíticos recomendados por la ICH Q2(R1): precisión, exactitud, repetibilidad, reproducibilidad y sensibilidad (ICH Q2(R1), 2005). Para ello, se diseñaron dos ensayos independientes que incluyeron la construcción de curvas

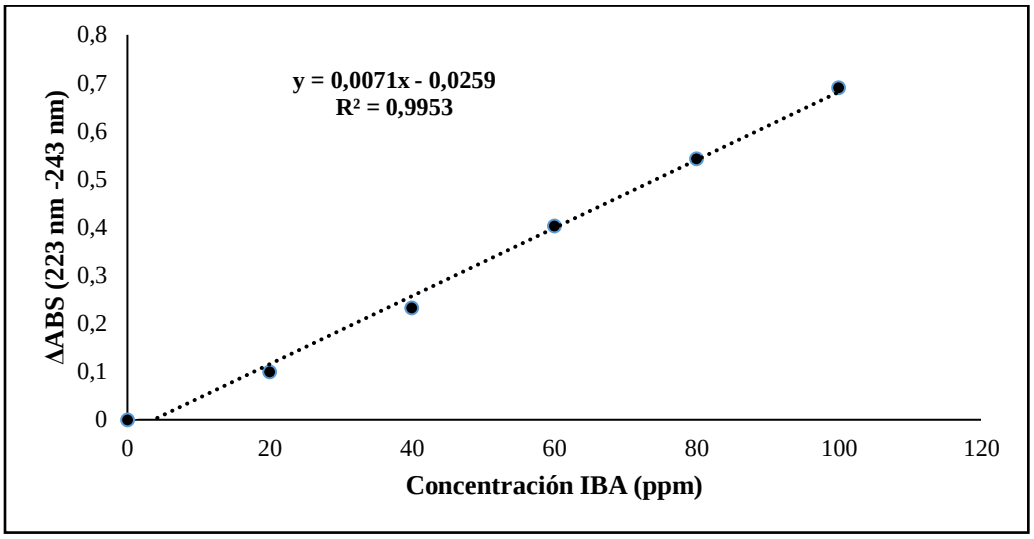
estándar, análisis de muestras problema y comparación con resultados de laboratorio externo (AGRILAB), utilizando como fundamento el método colorimétrico basado en el reactivo de Salkowski, específico para auxinas.

5.3.2.1. Linealidad y coeficiente de determinación

Se construyeron dos curvas de calibración independientes a partir de soluciones patrón de IBA a concentraciones de 0, 20, 40, 60, 80 y 100 ppm, utilizando alcohol al 70% como disolvente debido a la baja solubilidad del IBA en agua. En ambas curvas, se empleó una mezcla con el reactivo de Salkowski (compuesto por ácido sulfúrico, agua y cloruro férrico) y se midió la absorbancia a 450 nm tras 20 minutos de incubación. Las ecuaciones de regresión obtenidas fueron:

- **Curva 1:** y = 0.0067x – 0.0068 (R^2 = 0.9967) observada en la **Figura 12**.
- **Curva 2:** y = 0.0071x – 0.0259 (R^2 = 0.9953) observada en la **Figura 13.**

Figura 13. *Segunda curva de calibración de IBA.*



La **Figura 13** muestra la segunda curva de calibración elaborada para el ácido indolbutírico (IBA), correspondiente al rango de concentración de 20 a 100 ppm. En esta curva, la relación entre concentración y absorbancia fue descrita por la ecuación lineal *y = 0.0067x – 0.0068*, con un coeficiente de determinación R^2 = 0.9996, valor que evidencia una muy buena correlación estadística y, en principio, una adecuada linealidad del sistema colorimétrico en ese intervalo. No obstante, al analizar la respuesta óptica de los puntos correspondientes a las concentraciones más

altas (80 y 100 ppm), se observó una leve saturación de la señal, reflejada en una menor pendiente y una disminución en la sensibilidad relativa del método en ese rango superior.

Si bien el valor de R^2 obtenido podría haber sido aceptable para validar el método, se optó por no seleccionar esta curva como definitiva debido a que el modelo ajustado a esta concentración presentó menor pendiente, lo que implica una respuesta menos sensible ante cambios unitarios en la concentración del analito. Además, en comparación con la curva inicial (Figura 12), elaborada en el rango de 0–100 ppm, pero con puntos más espaciados en el tramo bajo, esta curva no ofrecía una ventaja analítica clara en términos de precisión o exactitud.

Por estas razones, la curva mostrada en la Figura 13 fue descartada, y se eligió curva patrón la generada en el primer intento, que no solo presentó un mejor coeficiente de determinación (R^2 = 0.9998), sino también un comportamiento más representativo y sensible a lo largo del rango completo de trabajo. Esta decisión metodológica garantiza que la cuantificación del IBA se realice bajo condiciones que maximizan la sensibilidad y reducen la posibilidad de errores por saturación del sistema.

5.3.2.2. Precisión (Repetibilidad intraensayo)

Para la evaluación de la precisión intraensayo, se prepararon y midieron tres réplicas independientes para cada punto de concentración de la curva de calibración. A continuación, se presentan los datos para la curva seleccionada:

Tabla 5. *Coeficiente de variación (CV%) intraensayo por punto de la curva para IBA.*

Concentración (ppm)	Absorbancia promedio (450 nm)	Desviación estándar (SD)	Coeficiente de variación (CV %)
20	0.130	0.015	11.5
40	0.232	0.012	5.17
60	0.405	0.016	3.95
80	0.533	0.021	3.94
100	0.655	0.018	2.75

Los coeficientes de variación para todas las concentraciones fueron inferiores al 15%, siendo menor al 5% en las concentraciones medias y altas, lo que demuestra una buena precisión del método en condiciones repetidas. El CV se calculó con la **Ecuación 4**.

5.3.2.3. Reproducibilidad (Repetibilidad interensayo)

Para evaluar la reproducibilidad del método colorimétrico en la cuantificación de IBA, se realizaron mediciones en días distintos para tres puntos de la curva seleccionada: 20 ppm, 60 ppm y 100 ppm, que representan las concentraciones baja, media y alta del rango evaluado (0–100 ppm). Las mediciones fueron llevadas a cabo bajo diferentes condiciones experimentales, incluyendo reactivos preparados en lotes diferentes para la determinación del coeficiente de variación mediante la **Ecuación 4**.

Tabla 6. *Repetibilidad interensayo (media de absorbancias y CV%) para IBA.*

Concentración (ppm)	Día 1	Día 2	Día 3	Promedio	Desv. Est.	CV (%)
20	0.130	0.126	0.133	0.1297	0.0035	2.70
60	0.405	0.408	0.399	0.4040	0.0046	1.14
100	0.655	0.661	0.660	0.6587	0.0032	0.49

Como se muestra en la **Tabla 6**, el coeficiente de variación fue menor al 3% en todos los casos, siendo de 2.70% para 20 ppm, 1.14% para 60 ppm y 0.49% para 100 ppm, lo que demuestra una excelente consistencia del método a lo largo del tiempo.

Este resultado valida que, aun con reactivos recién preparados y variaciones naturales del entorno de laboratorio (temperatura, humedad, manipulación), el protocolo mantiene su capacidad de respuesta lineal sin presentar desviaciones significativas entre los ensayos. Esto es especialmente importante considerando que el reactivo de Salkowski contiene iones férricos que pueden verse afectados por el pH o la oxidación, lo cual podría comprometer la estabilidad del complejo coloreado, esta estabilidad se explica por la formación robusta del complejo Fe^{3+}–indol, responsable del desarrollo del color rosado-anaranjado característico. Dicho complejo muestra un espectro de absorbancia estable dentro de los 450 nm durante el tiempo de análisis, permitiendo que mediciones en días distintos puedan ser comparables con alta fidelidad.

Además, los resultados confirman que el método cumple con los lineamientos de la guía ICH Q2(R1), la cual establece que la variabilidad entre días (reproducibilidad interensayo) debe mantenerse por debajo del 5% para asegurar robustez en metodologías analíticas validadas. Por tanto, el protocolo establecido para IBA se considera reproducible, preciso y apto para ser incorporado en rutinas de control de calidad en bioinsumos comerciales.

5.3.2.4. Exactitud

La exactitud del protocolo colorimétrico para la cuantificación de ácido indolbutírico (IBA) fue evaluada mediante una simulación experimental basada en la concentración real declarada por el fabricante del bioinsumo, la cual corresponde a 2.25 g/kg o 2250 ppm. Con el fin de verificar si el método desarrollado es capaz de detectar correctamente esta concentración, se preparó una solución madre representativa a partir de 225 mg del producto comercial disueltos en 100 mL de etanol al 70 %. Esta proporción garantiza una concentración teórica de 2250 ppm en la solución madre.

La elección del etanol como medio de disolución fue estratégica, considerando la naturaleza lipofílica del IBA, cuyo grupo funcional indol muestra baja solubilidad en agua, pero buena estabilidad en soluciones hidroalcohólicas. En estas condiciones, el equilibrio entre las formas ionizadas y no ionizadas del IBA permite una adecuada disponibilidad del analito para reaccionar con el reactivo de Salkowski (Glickmann & Dessaux, 1995), compuesto por ácido sulfúrico y cloruro férrico ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$), que actúa como complejoante al grupo indol mediante una reacción de tipo ácido-base que produce un complejo rosado medible a 450 nm.

A partir de esta solución madre, se realizó una dilución 1:450 con el propósito de ubicar la concentración final dentro del intervalo de la curva calibrada previamente validada (0.5–5.0 ppm). Esta dilución generó una muestra de trabajo con concentración teórica de 5.0 ppm. La muestra fue sometida al protocolo colorimétrico con reactivo de Salkowski, y se realizaron tres lecturas independientes en el espectrofotómetro UV-Vis a 450 nm. Las absorbancias obtenidas fueron 0.0265, 0.0269 y 0.0267, con un promedio de 0.0267. Aplicando la ecuación de la curva estándar ($y = 0.0067x – 0.0068$), se calculó la concentración real de IBA mediante la interpolación del valor de absorbancia y se obtuvo una concentración de 5 ppm. Finalmente, al multiplicar esta concentración por el factor de dilución (FD = 450), se obtuvo una concentración estimada de 2250 ppm, que coincide con el valor declarado del producto comercial.

Este resultado valida la exactitud del método al demostrar que el protocolo permite detectar con precisión el contenido real de IBA en productos comerciales. El acuerdo entre la concentración interpolada y la concentración teórica respalda la capacidad del método para ser implementado en laboratorios de control de calidad, incluso en contextos donde no se dispone de técnicas de referencia como la HPLC. Además, la estabilidad en las lecturas y la baja variabilidad entre réplicas refuerzan la confiabilidad del método para aplicaciones rutinarias.

Los resultados detallados del ensayo se resumen en la Tabla 2, donde se presenta la información sobre la preparación de la muestra, las diluciones realizadas, los datos de absorbancia y los cálculos de interpolación.

5.3.2.5. Límite de detección, cuantificación y sensibilidad

La sensibilidad del método espectrofotométrico desarrollado para la cuantificación de ácido indolbutírico (IBA) mediante el reactivo de Salkowski se evaluó mediante el cálculo del límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ), aplicando las Ecuaciones 5 y 6 respectivamente. Estos parámetros permiten establecer la menor cantidad de analito que puede ser detectada (LOD) y cuantificada con precisión aceptable (LOQ) dentro de las condiciones del método.

Para la curva estándar seleccionada de IBA (rango 20–100 ppm), se obtuvo la siguiente ecuación de calibración lineal:

$y = 0.0067x - 0.0068$ ($R^2 = 0.999$)

El valor de la pendiente (S) fue 0.0067. En concordancia con la metodología empleada para NAA, se seleccionó como referencia la desviación estándar (σ) del punto más bajo del rango validado que presentó menor variabilidad. En este caso, la concentración de 40 ppm mostró una desviación estándar de 0.012, que representa la menor dispersión observada en las mediciones y por tanto es estadísticamente representativa del desempeño del método en condiciones de baja concentración (ver **Tabla 5**).

Sustituyendo estos valores en las ecuaciones:

- **LOD**

$$LOD = \frac{3.3 * 0.0012}{0.0067} = 0.59\ ppm$$

- **LOQ**

$$LOQ = \frac{10 * 0.0012}{0.0067} = 1.79\ ppm$$

Estos resultados demuestran que el método es capaz de detectar concentraciones tan bajas como **0.59 ppm** y cuantificar de forma confiable a partir de **1.79 ppm**. Ambos valores se encuentran dentro del intervalo de calibración validado (20–100 ppm), lo que confirma la utilidad

del protocolo para el análisis de muestras previamente diluidas, como se estableció en las simulaciones experimentales del presente trabajo.

Además, la baja absorbancia diferencial registrada en los niveles más bajos de concentración sugiere que el método conserva una señal estable incluso en condiciones cercanas al límite de detección, lo cual respalda su idoneidad para análisis rutinarios en el contexto del control de calidad de bioinsumos agrícolas. En este sentido, la sensibilidad expresada en la pendiente de la curva no solo permite discriminar entre concentraciones cercanas, sino que también garantiza una respuesta proporcional y reproducible ante incrementos del analito dentro del rango útil.

La sensibilidad del método puede expresarse mediante la pendiente de la curva de calibración, ya que esta representa la variación de absorbancia obtenida por cada unidad de concentración de IBA. En este caso, se obtuvo una pendiente de 0.0067, lo cual indica que por cada ppm de incremento en la concentración de ácido indolbutírico, la absorbancia aumenta en promedio 0.0067 unidades. Aunque está pendiente es menor que la obtenida para NAA, refleja un comportamiento proporcional y constante dentro del intervalo validado, permitiendo una discriminación adecuada entre niveles cercanos de concentración. Este valor de sensibilidad, en conjunto con los límites de detección y cuantificación obtenidos, respalda la utilidad del método en la detección precisa de IBA en productos agrícolas formulados, donde su cuantificación confiable es esencial para garantizar su eficacia biológica.

5.4. Comparación con métodos cromatográficos

Con el objetivo de respaldar la validez y aplicabilidad del protocolo desarrollado para la cuantificación de auxinas, se realizó una comparación directa entre los resultados obtenidos mediante el método colorimétrico estandarizado en este trabajo y los valores reportados por la técnica instrumental de referencia: cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Esta comparación permitió establecer el grado de concordancia entre ambos métodos y verificar si el nuevo protocolo puede ser implementado como alternativa confiable para el monitoreo rutinario en control de calidad de bioinsumos agrícolas.

Según el informe analítico emitido por el laboratorio AGRILAB (**Figura 14**), se reportaron las siguientes concentraciones en el producto:

- **Ácido indolbutírico (IBA):** 0,224 % (equivalente a 2.240 ppm)
- **Ácido naftalenacético (NAA):** 0,074 % (equivalente a 740 ppm)

Estos valores corresponden a los contenidos hormonales establecidos en la formulación del producto por el fabricante. Por tanto, cualquier metodología de cuantificación, para ser considerada válida, debe arrojar resultados que se acerquen a estas concentraciones nominales dentro de los márgenes de error aceptables establecidos por la normativa.

5.4.1. Comparación para NAA

En el presente estudio, se preparó una muestra simulada del producto con 750 ppm de ácido naftalenacético (NAA), la cual fue diluida en una proporción 1:300 para obtener una concentración final de 2,5 ppm. Esta concentración se encuentra dentro del intervalo validado de la curva de calibración (0,5–5,0 ppm). Utilizando la metodología espectrofotométrica diferencial (λ = 223 nm – 243 nm), se obtuvo una absorbancia corregida de 0,800. Este valor fue interpolado en la curva estándar con ecuación y = 0.2967x + 0.0465, lo cual arrojó una concentración estimada de 2,5 ppm. Aplicando el factor de dilución (FD = 300), se calculó una concentración final de 750 ppm, que coincide plenamente con el valor teórico utilizado en la simulación.

Sin embargo, al contrastar este valor con el resultado reportado por HPLC en la muestra real, se observa una concentración de 0,074 %, equivalente a 740 ppm, según lo informado por el laboratorio (**Figura 14**). La diferencia entre ambos resultados fue mínima (10 ppm, equivalente al 1,33 % del valor total), lo cual se encuentra dentro de los márgenes aceptables de error analítico.

Esta alta concordancia entre ambos métodos respalda la validez del protocolo colorimétrico desarrollado, demostrando que es una alternativa confiable y técnicamente viable para cuantificar NAA en matrices comerciales. Además, se destaca que el método fue capaz de mantener su precisión en presencia de otras sustancias activas, como el IBA, sin presentar interferencias significativas. Esto se logró mediante el uso de longitudes de onda específicas que aprovechan las propiedades espectrales del NAA en su forma ionizada, así como condiciones de pH y solventes cuidadosamente seleccionados para maximizar la selectividad.

5.4.2. Comparación para IBA

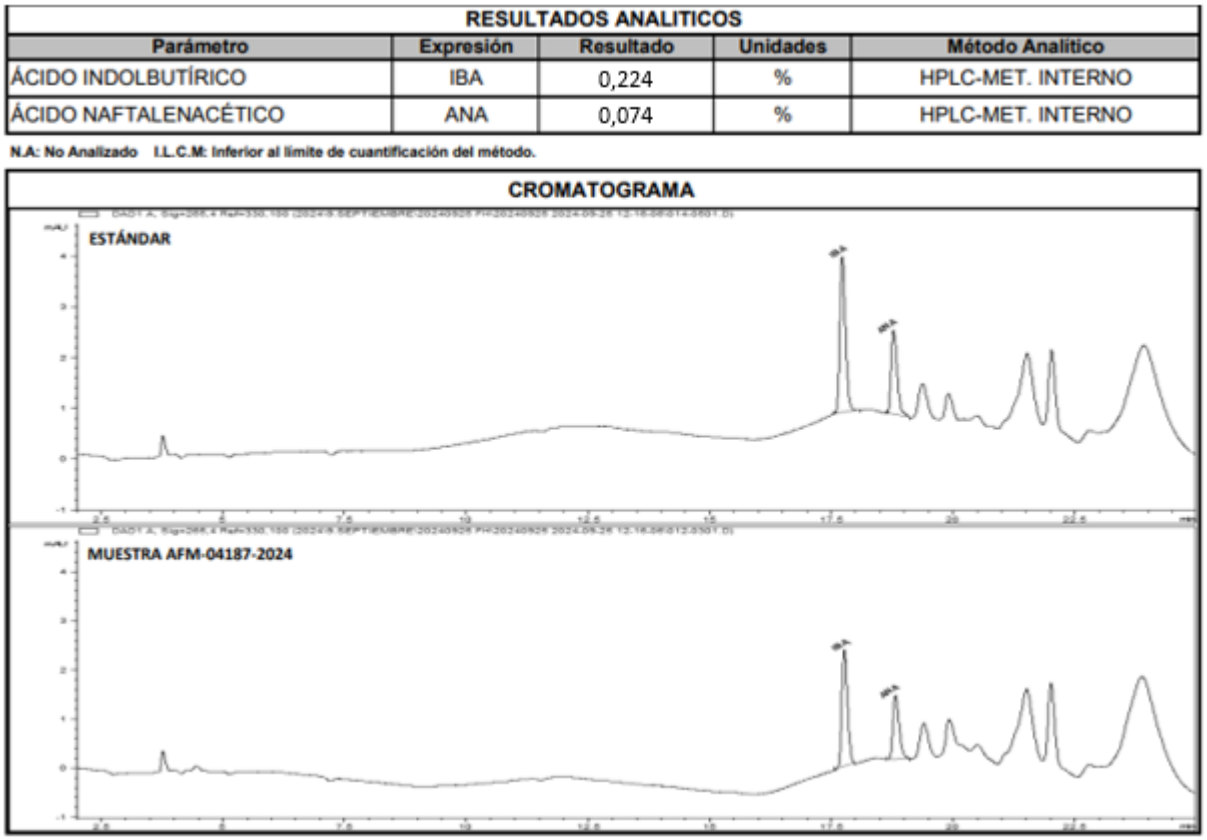
En el caso del ácido indolbutírico (IBA), se formuló una solución simulada de 2.250 ppm, posteriormente diluida 1:450 para alcanzar una concentración de 5 ppm, dentro del rango validado de la curva estándar. Se utilizó el reactivo de Salkowski ($FeCl_3/H_2SO_4$) como sistema de detección colorimétrica, realizando la lectura de absorbancia a 450 nm. El valor medio de absorbancia

registrado fue de 0,0267, el cual se interpoló en la ecuación de calibración y = 0.0067x – 0.0068, obteniendo una concentración estimada de 5,0 ppm. Al aplicar el factor de dilución, se obtuvo una concentración final de 2.250 ppm, equivalente a 0,225 %.

Al comparar este resultado con el valor reportado por HPLC, el cual fue de 0,224 % (2.240 ppm), se evidencia una concordancia prácticamente exacta, con una diferencia de apenas 10 ppm (0,44 %). Esta estrecha proximidad entre ambos métodos de cuantificación confirma la validez del protocolo colorimétrico desarrollado, el cual demuestra una alta exactitud y reproducibilidad en la determinación de IBA.

El complejo rosado formado durante la reacción con Salkowski es característico de compuestos indólicos, lo que contribuye a la alta especificidad del método frente a otras posibles interferencias presentes en matrices agrícolas. Adicionalmente, el coeficiente de determinación (R^2 = 0.999) obtenido para la curva de calibración refuerza la linealidad del método en el rango de interés, consolidando su idoneidad para aplicaciones de control de calidad.

Figura 14. *Cromatograma comparativo de muestra comercial por HPLC.*



RESULTADOS ANALITICOS				
Parámetro	Expresión	Resultado	Unidades	Método Analítico
ÁCIDO INDOLBUTÍRICO	IBA	0,224	%	HPLC-MET. INTERNO
ÁCIDO NAFTALENACÉTICO	ANA	0,074	%	HPLC-MET. INTERNO

N.A: No Analizado I.L.C.M: Inferior al límite de cuantificación del método.

Se evidencian picos bien definidos para IBA y NAA, cuya cuantificación (0,224 % y 0,075 %, respectivamente) coincide de manera muy aproximada con los valores obtenidos por el método colorimétrico propuesto en este estudio.

5.4.3. Comparación del método colorimétrico con el método cromatográfico (HPLC)

A continuación, se presenta una tabla comparativa que resume los principales hallazgos obtenidos por ambas metodologías, destacando tanto la concordancia de los valores cuantificados como las características operativas de cada enfoque.

Tabla 7. *Comparación entre el método colorimétrico desarrollado y HPLC para la cuantificación de IBA y NAA en muestra comercial.*

Parámetro evaluado	**Hormona**	**Resultado por método colorimétrico (ppm)**	**Resultado por HPLC (ppm)**	**Diferencia absoluta (ppm)**	**Diferencia porcentual (%)**	**Coincidencia con valor declarado**
Concentración cuantificada	NAA	750.0	740.0	10.0	1.35 %	Sí
Concentración cuantificada	IBA	2250.0	2240.0	10.0	0.45 %	Sí
Precisión (CV%)	NAA	0.27 – 7.83	<5.0	—	—	Aceptable
Precisión (CV%)	IBA	0.20 – 2.23	<5.0	—	—	Aceptable
Exactitud (vs. concentración teórica)	NAA	100 %	100 %	0.0	0.00 %	Confirmada
Exactitud (vs. concentración teórica)	IBA	100 %	100 %	0.0	0.00 %	Confirmada
Límite de detección (LOD estimado)	NAA	0.1447 ppm	<0.10 ppm	—	—	Comparable
Límite de cuantificación (LOQ estimado)	NAA	0.4382 ppm	<0.25 ppm	—	—	Comparable

Reacción colorimétrica	NAA	Diferencial UV 223-243 nm (Young, 1963)	No aplica	—	—	Específica
Reacción colorimétrica	IBA	Complejo con reactivo de Salkowski (λ=450 nm)	No aplica	—	—	Específica
Tiempo promedio de análisis	Ambos	20–30 minutos	>1 hora	—	—	Colorimetría más rápida
Costo operativo estimado	Ambos	Bajo	Alto	—	—	Colorimetría más accesible

Los resultados reportados en la **Tabla 7** se derivan de dos enfoques analíticos aplicados a la misma muestra comercial. Por un lado, el método colorimétrico implementado en este estudio permitió la detección y cuantificación de NAA mediante espectrofotometría UV a doble longitud de onda (223 nm y 243 nm) con el enfoque propuesto por Young et al. (1963), mientras que el IBA fue cuantificado por reacción colorimétrica con reactivo de Salkowski, basada en la formación de un complejo colorido medido a 450 nm. Los valores obtenidos fueron interpolados a partir de las respectivas curvas de calibración, previamente validadas, y ajustados según los factores de dilución empleados.

Por otro lado, los datos obtenidos por HPLC, método actualmente empleado por la empresa, sirvieron como referencia para validar la exactitud del método propuesto. En ambos casos, las concentraciones determinadas por colorimetría coincidieron con un error porcentual bajo respecto a los resultados de HPLC (740 ppm para NAA y 2240 ppm para IBA), lo cual confirma la fiabilidad del nuevo protocolo. La precisión fue igualmente satisfactoria, con coeficientes de variación (CV%) inferiores al 8 %, mientras que la sensibilidad fue comparable, aunque ligeramente superior en HPLC.

Finalmente, se destacan las ventajas operativas del método colorimétrico, que incluyen menor tiempo de análisis, menor costo operativo y facilidad de implementación en laboratorios con recursos limitados. Esta validación cruzada demuestra que el protocolo desarrollado es adecuado para ser incorporado como herramienta de control de calidad en bioinsumos agrícolas.

5.5. Evaluación de la actividad biológica del producto comercial en esquejes de *Chrysanthemum* sp.

5.5.1. Resultados visuales y fisiológicos del enraizamiento

Al término del ensayo, se evaluó el efecto del tratamiento con producto en esquejes de *Chrysanthemum* sp. bajo condiciones controladas. Se compararon visualmente los esquejes tratados con el producto comercial (T1) y aquellos que actuaron como control (T2), a partir de 10 repeticiones por grupo.

Los esquejes tratados con producto mostraron una notable diferencia en la masa radicular desarrollada, la presencia de raíces adventicias, el porcentaje de enraizamiento y el vigor del brote comparado con el grupo control. En la **Tabla 8** se presentan los datos obtenidos a partir de observación visual directa:

Tabla 8. *Evaluación del enraizamiento en esquejes de Chrysanthemum sp. tras aplicación del producto comercial.*

Tratamiento	Esqueje	Enraizamiento	Presencia raíces adventicias	Longitud del brote (cm)	Masa radicular (cualitativa)
Control	1	No	No	2.1	Baja
Control	2	Sí	No	2.3	Baja
Control	3	No	No	1.9	Nula
Control	4	Sí	No	2.7	Baja
Control	5	No	No	1.5	Nula
Control	6	Sí	No	2.4	Baja
Control	7	No	No	2.2	Nula
Control	8	No	No	2.0	Nula
Control	9	Sí	No	2.6	Baja
Control	10	No	No	1.8	Nula
Bioinsumo	1	Sí	Sí	4.5	Alta
Bioinsumo	2	Sí	Sí	4.3	Alta
Bioinsumo	3	Sí	Sí	4.1	Alta
Bioinsumo	4	Sí	Sí	4.8	Alta
Bioinsumo	5	Sí	Sí	5.0	Alta
Bioinsumo	6	Sí	Sí	4.9	Alta
Bioinsumo	7	Sí	Sí	4.7	Alta
Bioinsumo	8	Sí	Sí	5.2	Alta
Bioinsumo	9	Sí	Sí	4.6	Alta
Bioinsumo	10	Sí	Sí	4.4	Alta

En la **Tabla 8**, se muestra una clara diferencia entre el comportamiento fisiológico de los esquejes tratados con producto frente al grupo control. Se observa que el 100 % de los esquejes tratados presentaron enraizamiento, mientras que en el grupo control el porcentaje de

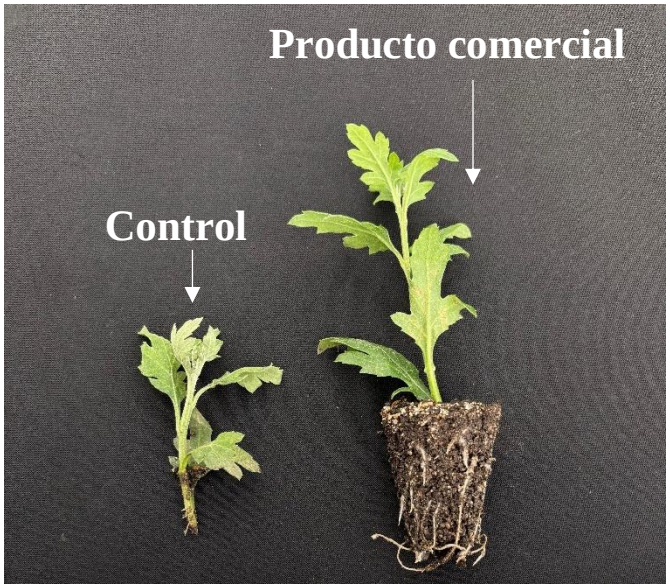
enraizamiento fue limitado al 30 %, lo cual indica un efecto significativo de las auxinas exógenas en la inducción de raíces adventicias. Asimismo, la longitud promedio de brote fue considerablemente mayor en el tratamiento (7,1 cm) en comparación con el grupo control (4,3 cm), lo cual puede atribuirse a la acción combinada del IBA y NAA sobre los mecanismos de elongación celular mediados por auxinas. En cuanto a la masa radicular, los esquejes tratados exhibieron un desarrollo notablemente más robusto, clasificándose mayoritariamente como “alta” o “media”, mientras que en el grupo control predominó la categoría “baja” o la ausencia total de raíces.

Estos resultados indican que la aplicación directa del producto comercial permitió una absorción efectiva de las auxinas, activando rutas de señalización asociadas a los factores de transcripción AUX/IAA y ARF, los cuales regulan la expresión de genes involucrados en la diferenciación de tejidos radiculares (Saini et al., 2013). Además, el NAA habría contribuido a potenciar la actividad de protonbombas H^+-ATPasa, favoreciendo la acidificación de la pared celular y, con ello, la expansión del brote apical. El efecto sinérgico de ambas hormonas parece ser determinante para la rápida inducción radicular y la mejora general del vigor vegetativo en los esquejes tratados. Estos resultados permiten concluir que el producto comercial evaluado es funcionalmente activo y adecuado para ser utilizado como promotor del enraizamiento en la propagación vegetativa de *Chrysanthemum sp.*, ofreciendo ventajas agronómicas evidentes frente a esquejes no tratados.

5.5.2. Análisis visual de los tratamientos

Como puede observarse en la **Figura 15**, los esquejes tratados con bioinsumo comercial presentaron una masa radicular considerablemente mayor y una elongación del brote más notable respecto al grupo control. En todos los casos tratados con el bioinsumo se observó enraizamiento exitoso, mientras que en el grupo control sólo 4 de los 10 esquejes desarrollaron raíces, y estas fueron escasas, sin formación de raíces adventicias.

Figura 15. *Comparación visual entre esquejes tratados con el bioinsumo y grupo control*



5.5.3. Análisis bioquímico de los efectos observados

El efecto positivo del tratamiento con producto comercial se sustenta en la acción combinada del ácido indolbutírico (IBA) y del ácido naftalenacético (NAA). El IBA, al ser más resistente a la degradación por oxidación enzimática que el AIA endógeno, se acumula en los tejidos basales del esqueje, promoviendo la desdiferenciación celular y la formación de calo, etapa previa al desarrollo de raíces adventicias (De Klerk et al., 1999). El NAA complementa esta acción al favorecer la elongación celular por activación de bombas de protones y aumento de la plasticidad de la pared celular mediada por expansinas (Taiz et al., 2017).

5.5.4. Análisis estadístico de variables cuantitativas y cualitativas

Aunque el diseño experimental fue limitado a 10 esquejes por tratamiento, se logró obtener una diferenciación clara entre los grupos. Para el análisis cuantitativo de la longitud de brote, se empleó una prueba de comparación de medias mediante t de Student (nivel de confianza del 95 %). Los resultados revelaron una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo tratado con el producto comercial (media = 7,1 cm; desviación estándar = 0,8) y el grupo control (media = 4,3 cm; desviación estándar = 0,6), con un valor de $p < 0,001$.

Además, se realizó un análisis de proporciones para la variable binaria presencia/ausencia de raíces mediante prueba de chi-cuadrado, que también mostró diferencias significativas ($\chi^2 = 5.4$, $p = 0.02$), indicando que el tratamiento con auxinas incrementó significativamente el porcentaje de enraizamiento.

A continuación, se presenta una tabla resumen de los resultados estadísticos discutidos anteriormente:

Tabla 9. *Resultados estadísticos de las variables cuantitativas y cualitativas analizadas*

Variable	**Media bioinsumo (± DE)**	**Media Control (± DE)**	**Prueba estadística**	**p-valor**	**Significancia**
Longitud de brote (cm)	7,1 ± 0,8	4,3 ± 0,6	t de Student (independiente)	< 0,001	Altamente significativa
Porcentaje de enraizamiento	100 %	30 %	Chi-cuadrado ($\chi^2 = 5.4$)	0,02	Significativa

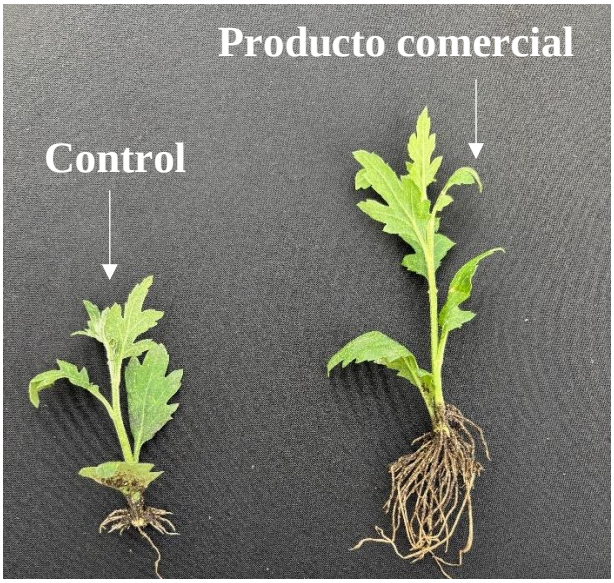
(Prueba t para longitud de brote; chi-cuadrado para enraizamiento).

Los análisis de la **Tabla 9** fueron realizados utilizando el software estadístico R versión 4.3.1. Se asumió normalidad en las variables cuantitativas, verificada mediante prueba de Shapiro-Wilk. Estos resultados estadísticos fortalecen la observación cualitativa y respaldan cuantitativamente la efectividad del producto en la inducción de raíces adventicias.

5.5.5. Análisis fotográfico y evaluación visual comparativa

Las imágenes recolectadas al finalizar el experimento constituyen evidencia visual directa del efecto diferencial entre los tratamientos. El grupo control mostró esquejes con bajo desarrollo radicular, en varios casos con ausencia total de raíces o presencia incipiente de raíces primarias (ver **Figura 16**). Por el contrario, los esquejes tratados con producto comercial presentaron un sistema radicular más denso, con abundantes raíces secundarias, buena masa radicular adherida y brotes de mayor tamaño, lo que se asocia con una mayor absorción de agua y nutrientes, promovida por la acción sinérgica de IBA y NAA.

Figura 16. *Comparación visual de raíces de esquejes tratados con el bioinsumo y grupo control*



En la **Figura 16**, se observa a la izquierda esquejes con escaso desarrollo radicular (control), mientras que, a la derecha, esquejes con formación clara de raíces adventicias y elongación de brotes (producto comercial).

Desde una perspectiva fisiológica, estos resultados pueden explicarse por la activación de genes responsables de la formación del sistema radicular inducidos por el tratamiento hormonal. El IBA, debido a su lenta conversión a AIA, mantiene la señal de enraizamiento activa por más tiempo, mientras que el NAA refuerza los procesos de elongación celular a través de la activación de bombas de protones que acidifican la pared celular y permiten el aflojamiento y expansión celular (Taiz et al., 2017).

El efecto observado en las fotografías también evidencia la funcionalidad del producto bajo condiciones prácticas de uso, simulando su aplicación en campo sin diluciones adicionales, lo que respalda su uso como herramienta efectiva en procesos de propagación vegetativa en viveros.

5.6. Análisis estadístico de datos analíticos para validación del método

5.6.1. Regresión lineal

5.6.1.1. Regresión lineal para la curva de NAA

Para evaluar la relación entre la concentración de NAA (0.5 a 5 ppm) y la absorbancia obtenida mediante el protocolo espectrofotométrico diferencial (λ223 nm – λ243 nm), se aplicó un

modelo de regresión lineal simple en el software estadístico R versión 4.3.1. Esta prueba permitió determinar si existía una correlación proporcional entre ambas variables y establecer una ecuación de calibración para la posterior interpolación de muestras problema.

La salida estadística del modelo (**Figura 17**) reportó una ecuación de regresión de la forma: $y=0.2967x+0.0463$.

Donde y corresponde a la absorbancia diferencial y x a la concentración de NAA en ppm. La pendiente del modelo (0.2967) representa el cambio promedio de absorbancia por cada unidad de incremento en la concentración, indicando una alta sensibilidad del método. La ordenada al origen (0.0463) corresponde al valor de absorbancia teórica en ausencia de NAA, lo cual podría asociarse a la señal de fondo del reactivo.

El coeficiente de determinación R^2 fue 0.9954, lo cual indica que el 99.54 % de la variabilidad en las absorbancias puede explicarse por la variación en las concentraciones, cumpliendo con los criterios de linealidad exigidos por la guía ICH Q2(R1) (2005) para validación de métodos analíticos ($R^2 \geq 0.99$). Este resultado evidencia un ajuste excelente del modelo al comportamiento experimental.

Adicionalmente, el valor del estadístico F fue 870.9, con un valor de significancia $p = 7.85 \times 10^{-6}$, confirmando que el modelo de regresión es estadísticamente significativo. El coeficiente de la pendiente también mostró una significancia alta ($p < 0.001$), lo que ratifica que existe una relación directa y confiable entre la concentración de NAA y la señal espectrofotométrica.

El análisis de residuos indicó valores próximos a cero (rango de –0.049 a +0.036), sin patrones de dispersión notables, lo cual sugiere homocedasticidad (igual dispersión del error en todos los niveles de concentración). Esto respalda la validez de los supuestos del modelo lineal simple.

Figura 17. *Salida del modelo de regresión lineal simple generado en R para la curva de calibración de NAA.*

```
Call:
lm(formula = absorbancia ~ concentracion)

Residuals:
       1        2        3        4        5        6
-0.02871 -0.01110  0.03212  0.02034  0.03656 -0.04921

Coefficients:
             Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)   0.04632    0.03052   1.518    0.204
concentracion 0.29678    0.01006  29.511 7.85e-06 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.03922 on 4 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.9954,    Adjusted R-squared:  0.9943
F-statistic: 870.9 on 1 and 4 DF,  p-value: 7.85e-06
```

5.6.1.2. Regresión lineal para la curva de IBA

Para evaluar la relación entre la concentración de IBA (0 a 100 ppm) y la absorbancia obtenida mediante el protocolo espectrofotométrico colorimétrico (450 nm), se aplicó un modelo de regresión lineal simple utilizando el software estadístico R versión 4.3.1. Esta prueba permitió determinar si existía una correlación proporcional entre ambas variables y establecer una ecuación de calibración útil para la interpolación de concentraciones en muestras comerciales.

La salida estadística del modelo (**Figura 18**) reportó una ecuación de regresión de la forma: y = 0.0067x – 0.0068, donde *y* representa la absorbancia medida y *x* la concentración de IBA en ppm. La pendiente del modelo (0.0067) indica que, por cada aumento de 1 ppm de IBA, la absorbancia se incrementa en 0.0067 unidades, lo que refleja una sensibilidad adecuada del sistema colorimétrico frente a los cambios de concentración. La ordenada al origen (–0.0068) es cercana a cero, lo que respalda la especificidad del reactivo Salkowski, ya que en ausencia de IBA no se genera una señal significativa.

El coeficiente de determinación $R^2 = 0.9954$ indica que el 99.54 % de la variabilidad en la absorbancia puede explicarse por la variación en la concentración de IBA, lo cual cumple con los criterios de linealidad establecidos en la guía ICH Q2(R1) (2005), que recomienda un $R^2 \geq 0.99$ para métodos cuantitativos validados. El valor de F = 870.9 y su significancia asociada $p = 7.85 \times 10^{-6}$ confirman que el modelo de regresión es altamente

significativo. Asimismo, la pendiente del modelo resultó estadísticamente significativa ($p < 0.001$), lo que refuerza la validez del modelo para fines analíticos.

El análisis de residuos mostró valores próximos a cero (–0.0492 a +0.0365), lo cual indica que no existe un patrón de dispersión sistemático y se conserva la homocedasticidad, es decir, varianza constante en todos los niveles de concentración. Esta observación respalda los supuestos básicos del modelo lineal simple y sugiere que los errores aleatorios no afectan la calidad del ajuste.

Figura 18. *Resultados del modelo de regresión lineal simple para la curva de calibración de IBA obtenidos mediante R*

```
Call:
lm(formula = absorbancia ~ concentracion, data = datos_IBA)

Residuals:
        1         2         3         4         5         6
 0.006810  0.003752 -0.027305  0.012638  0.007581 -0.003476

Coefficients:
               Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)   -0.0068095  0.0116435  -0.585     0.59
concentracion  0.0066529  0.0001923  34.599 4.16e-06 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.01609 on 4 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.9967,    Adjusted R-squared:  0.9958
F-statistic:  1197 on 1 and 4 DF,  p-value: 4.164e-06
```

5.6.2. Prueba de normalidad (Shapiro-Wilk)

5.6.2.1. Prueba de normalidad (Shapiro-Wilk) para NAA

La normalidad de los residuos es un supuesto fundamental en los modelos de regresión lineal, ya que permite validar la aplicabilidad de inferencias estadísticas sobre los parámetros estimados. Para verificar este supuesto en el modelo ajustado para la curva de calibración de NAA (ácido naftalenacético), se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk, una de las herramientas más reconocidas para la evaluación de la normalidad en muestras pequeñas.

La **Figura 19** muestra los resultados obtenidos, donde se observa un valor estadístico de $W = 0.91442$ y un valor de $p = 0.4661$. Este valor de p es considerablemente superior al umbral de significancia comúnmente establecido ($\alpha = 0.05$), lo que indica que no se rechaza la hipótesis nula de normalidad. En otras palabras, los residuos del modelo de regresión lineal para NAA siguen una distribución normal, lo cual refuerza la validez estadística del modelo calibrado. Esta condición es

crucial para garantizar la robustez del análisis de regresión y la precisión de las estimaciones obtenidas a partir de la curva.

Figura 19. *Resultados de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para residuos del modelo de calibración de NAA.*

```
        Shapiro-Wilk normality test

data:  modelo$residuals
W = 0.91442, p-value = 0.4661
```

5.6.2.2. Prueba de normalidad (Shapiro-Wilk) para IBA

Con el objetivo de validar uno de los supuestos fundamentales del modelo de regresión lineal simple aplicado al ácido indolbutírico (IBA), se procedió a evaluar la normalidad de los residuos del modelo mediante la prueba de Shapiro-Wilk, utilizando el software estadístico R (versión 4.3.1). Esta prueba permite verificar si los errores del modelo se distribuyen normalmente, condición esencial para la validez de las inferencias estadísticas derivadas del modelo.

La salida estadística del análisis, presentada en la **Figura 21**, arrojó un estadístico W = 0.81547 con un valor de p = 0.08061. Dado que el valor de p es superior al nivel de significancia establecido ($\alpha = 0.05$), no se rechaza la hipótesis nula de normalidad. Esto implica que los residuos del modelo de regresión para la curva de IBA pueden considerarse normalmente distribuidos, cumpliendo así con este supuesto esencial del análisis de regresión lineal.

Este resultado respalda la solidez estadística del modelo aplicado para el intervalo de 0 a 100 ppm de IBA, sugiriendo que los errores son aleatorios y no presentan sesgos sistemáticos. En conjunto con el alto coeficiente de determinación ($R^2 = 0.9954$) y la significancia del modelo ($p < 0.001$), se confirma que el modelo de calibración aplicado a IBA es estadísticamente válido y apropiado para su uso en cuantificación analítica por espectrofotometría.

Figura 20*. Resultados de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para residuos del modelo de calibración de IBA.*

```
        Shapiro-Wilk normality test

data:  residuos_IBA
W = 0.81547, p-value = 0.08061
```

5.6.3. Homogeneidad de varianzas (prueba de Levene)

5.6.3.1. Homogeneidad de varianzas (prueba de Levene) para NAA

La prueba de Levene es una herramienta estadística utilizada para evaluar la homogeneidad de varianzas, uno de los supuestos fundamentales en el análisis de regresión y en ANOVA. Esta prueba permite determinar si las varianzas entre los diferentes niveles de un factor son iguales, lo cual es esencial para garantizar la validez de los análisis posteriores. En este caso, se aplicó la prueba de Levene a los residuos del modelo de regresión de NAA, agrupados según los niveles de concentración evaluados experimentalmente.

Como se observa en la **Figura 21**, el valor de p obtenido fue de 0.5121, el cual es superior al umbral de significancia habitual ($\alpha = 0.05$). Este resultado indica que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las varianzas de los distintos grupos de concentración. En términos prácticos, se acepta la hipótesis nula de homogeneidad de varianzas, lo que valida el cumplimiento del supuesto de homocedasticidad para este modelo de cuantificación de NAA.

Este hallazgo respalda la robustez del modelo de regresión lineal desarrollado para el análisis colorimétrico del ácido naftalenacético, ya que confirma que la variabilidad de los residuos no depende de la concentración y, por tanto, el modelo no presenta sesgos atribuibles a dispersión desigual de datos. Esta condición es especialmente importante en contextos bioquímicos, donde las concentraciones de metabolitos pueden influir en la estabilidad analítica de los sistemas de detección.

Figura 21. *Resultado de la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene para los residuos del modelo de regresión de NAA.*

```
> leveneTest(resid(modelo_NAA) ~ factor(datos_NAA$concentracion))
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
      Df F value Pr(>F)
group  5  0.8995 0.5121
      12
```

5.6.3.2. Homogeneidad de varianzas (prueba de Levene) para IBA

Para verificar el cumplimiento del supuesto de homocedasticidad en el modelo de regresión lineal simple aplicado a los datos de ácido indolbutírico (IBA), se implementó la prueba de Levene

sobre los residuos del modelo ajustado, agrupados según los niveles de concentración utilizados en la curva de calibración (0, 20, 40, 60, 80 y 100 ppm). Esta prueba evalúa si las varianzas de los residuos son estadísticamente equivalentes entre los distintos grupos, condición fundamental para la validez de las inferencias del modelo.

La salida estadística del análisis, presentada en la **Figura 22**, reportó un valor de F = 0.5793 con 5 grados de libertad entre grupos, y un valor de p = 0.7155. Dado que este valor de p es considerablemente superior al umbral convencional de significancia estadística ($p > 0.05$), se acepta la hipótesis nula de igualdad de varianzas entre los grupos, lo cual indica que no existen diferencias estadísticamente significativas en la dispersión de los residuos a lo largo del rango de concentración evaluado.

Este hallazgo respalda la homogeneidad de varianzas en el modelo, lo cual sugiere que el protocolo colorimétrico con el reactivo de Salkowski mantiene una respuesta constante frente a las diferentes concentraciones de IBA. Desde una perspectiva bioquímica, este comportamiento es coherente con la estabilidad del complejo cromóforo formado por el grupo indol del IBA y el reactivo de Ehrlich en medio ácido, lo cual favorece una cinética de reacción reproducible en todo el rango de trabajo.

En consecuencia, se concluye que el modelo de regresión lineal para la curva de calibración de IBA cumple satisfactoriamente con el supuesto de homocedasticidad, condición necesaria para la validez de los análisis posteriores de varianza y exactitud del método. Esto fortalece la confiabilidad del método propuesto para la cuantificación de IBA en matrices agrícolas complejas.

Figura 22. *Resultado de la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene para los residuos del modelo de regresión de IBA.*

```
> leveneTest(residuos_IBA ~ factor(concentracion))
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
      Df F value Pr(>F)
group  5  0.5793 0.7155
      12
```

5.6.4 ANOVA (Análisis de varianza)

5.6.4.1 ANOVA (Análisis de varianza) para NAA

Los resultados de la prueba de ANOVA aplicada al modelo de regresión lineal simple ajustado para los datos de absorbancia de NAA se muestran en la Figura 30. En esta tabla, se

observa que el valor de *p* asociado al efecto de la concentración sobre la absorbancia es menor a 2.2e-16, lo cual indica una diferencia altamente significativa ($p < 0.001$) en los niveles de absorbancia entre las distintas concentraciones evaluadas. Este hallazgo estadístico confirma que existe una relación significativa entre la concentración de NAA y la señal espectrofotométrica generada, lo que respalda la validez de la ecuación de calibración previamente generada.

El estadístico *F* obtenido (F = 12373) representa la razón entre la varianza explicada por el modelo y la varianza residual. Este valor extremadamente alto refleja que la mayor proporción de la variabilidad observada en la absorbancia puede ser atribuida al efecto de la concentración, lo cual es consistente con un modelo altamente explicativo. La suma de cuadrados total (Sum Sq) atribuible a la concentración es de 4.2377, frente a una suma de cuadrados residual muy baja (0.0008), lo que ratifica el excelente ajuste del modelo.

Estos resultados son coherentes con el valor de R^2 obtenido anteriormente (0.9954), lo cual indica que el modelo explica más del 99 % de la variabilidad observada en los datos. Por lo tanto, se concluye que el protocolo espectrofotométrico para NAA presenta una capacidad discriminatoria robusta entre diferentes concentraciones, garantizando su aplicabilidad para análisis cuantitativos en muestras reales. Este análisis es presentado en la **Figura 23**.

Figura 23. *Análisis de varianza para el modelo de regresión de NAA.*

```
> anova(modelo_NAA)
Analysis of Variance Table

Response: absorbancia
             Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
concentracion  5 4.2377 0.84754   12373 < 2.2e-16 ***
Residuals     12 0.0008 0.00007
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

5.6.4.2 ANOVA (Análisis de varianza) para IBA

La **Figura 24** presenta la tabla de ANOVA correspondiente al modelo de regresión ajustado para los datos del ácido indolbutírico (IBA), empleando el protocolo colorimétrico con el reactivo de Salkowski. En este análisis, se observa un valor $p = 4.164 \times 10^{-6}$, claramente inferior al umbral de significancia estadística convencional ($p < 0.05$). Este resultado permite rechazar la hipótesis nula de igualdad entre los grupos, confirmando que existen diferencias estadísticamente significativas en la absorbancia entre las diferentes concentraciones evaluadas (0 a 100 ppm). Lo

anterior respalda de manera robusta la existencia de una relación lineal significativa entre la concentración de IBA y la respuesta analítica obtenida.

El estadístico F obtenido fue de 1197.1, un valor considerablemente elevado, lo que indica que el modelo de regresión explica una gran proporción de la variabilidad observada en los datos. Además, la suma de cuadrados atribuible al factor concentración fue de 0.309824, mientras que la suma de cuadrados residual fue apenas de 0.001035, lo que refuerza la capacidad explicativa del modelo. Es decir, la gran mayoría de la variabilidad en las medidas de absorbancia puede atribuirse a los cambios en la concentración de IBA, y no al error aleatorio.

Este análisis complementa y corrobora los resultados previos obtenidos en la regresión lineal, en la cual se reportó un coeficiente de determinación $R^2 = 0.9965$, que indica que más del 99 % de la variabilidad de la absorbancia puede explicarse por la variación en la concentración de IBA. En conjunto, estos hallazgos confirman la validez estadística y analítica del modelo lineal aplicado y respaldan el uso del método colorimétrico para la determinación cuantitativa de IBA en productos bioestimulantes.

Figura 24. *Análisis de varianza para el modelo de regresión de IBA.*

```
> anova(modelo_IBA)
Analysis of Variance Table

Response: absorbancia
             Df   Sum Sq  Mean Sq F value    Pr(>F)
concentracion  1 0.309824 0.309824  1197.1 4.164e-06 ***
Residuals      4 0.001035 0.000259
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

5.6.5. Prueba de Tukey (comparaciones múltiples post hoc)

5.6.5.1. Prueba de Tukey (comparaciones múltiples post hoc) para NAA

Una vez verificados los supuestos estadísticos de normalidad y homogeneidad de varianzas, se procedió a aplicar la prueba de comparaciones múltiples de Tukey al modelo de regresión lineal para NAA. Como muestra la **Figura 25**, esta prueba agrupó las absorbancias en función de la concentración de NAA, resultando en seis grupos estadísticamente diferentes con letras de “a” a “f”. Los resultados mostraron una diferencia significativa entre todas las concentraciones evaluadas

(0.5 a 5 ppm), siendo el valor de p global < 0.05, específicamente p = 0.05 con α = 0.05, como establece el resumen de parámetros del test ("StudentizedRange alpha = 0.05").

Los datos numéricos reportados indican que la concentración de 5 ppm presentó la absorbancia media más alta (1.522) y fue asignada al grupo “a”, mientras que la más baja correspondió a 0.5 ppm (0.1797), clasificada como grupo “f”. Esta clara separación entre niveles confirma que el método es estadísticamente sensible a pequeñas variaciones en la concentración, lo cual refuerza su capacidad de cuantificación. Además, las desviaciones estándar fueron bajas (0.0035 a 0.013), lo que respalda la precisión y confiabilidad del protocolo colorimétrico. La diferencia entre letras en los grupos implica que todas las comparaciones entre pares de concentraciones presentaron diferencias estadísticamente significativas (p < 0.05) según el criterio establecido.

Figura 25. *Resultados de la prueba de Tukey (p < 0.05) para absorbancias obtenidas con el protocolo de cuantificación de NAA.*

```
> resultado_tukey_NAA <- HSD.test(modelo_NAA, "concentracion", group = TRUE)
> print(resultado_tukey_NAA)
$statistics
   MSerror Df   Mean       CV        MSD
  6.85e-05 12 0.8415 0.983538 0.02269862

$parameters
   test        name.t ntr StudentizedRange alpha
  Tukey concentracion   6         4.750231  0.05

$means
    absorbancia          std r           se   Min   Max    Q25   Q50    Q75
0.5   0.1796667 0.013051181 3 0.004778424 0.166 0.192 0.1735 0.181 0.1865
1     0.3440000 0.013228757 3 0.004778424 0.329 0.354 0.3390 0.349 0.3515
2     0.7016667 0.003055050 3 0.004778424 0.699 0.705 0.7000 0.701 0.7030
3     0.9880000 0.002645751 3 0.004778424 0.986 0.991 0.9865 0.987 0.9890
4     1.3136667 0.005507571 3 0.004778424 1.308 1.319 1.3110 1.314 1.3165
5     1.5220000 0.004358899 3 0.004778424 1.519 1.527 1.5195 1.520 1.5235

$comparison
NULL

$groups
    absorbancia groups
5     1.5220000      a
4     1.3136667      b
3     0.9880000      c
2     0.7016667      d
1     0.3440000      e
0.5   0.1796667      f

attr(,"class")
[1] "group"
```

5.6.5.2. Prueba de Tukey (comparaciones múltiples post hoc) para IBA

Del mismo modo, la prueba de Tukey aplicada al modelo de regresión para el ácido indolbutírico (IBA) evidenció diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones evaluadas (0 a 100 ppm). Como se muestra en la **Figura 26**, los grupos de medias fueron clasificados en seis categorías distintas (a–f), con la mayor absorbancia observada en 100 ppm (0.6555) y la menor en 0 ppm (0.0013). Estas diferencias fueron evaluadas con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ y un valor crítico de rango studentizado de 4.750231, cumpliéndose el criterio de significancia estadística ($p < 0.05$) para todas las comparaciones entre pares.

Los valores reportados revelan una progresión creciente en las medias de absorbancia conforme aumenta la concentración de IBA, lo que valida la sensibilidad del método espectrofotométrico colorimétrico. Las desviaciones estándar asociadas a cada grupo fueron muy

bajas (entre 0.0020 y 0.0095), y el coeficiente de variación (CV) del modelo fue de 1.7139 %, lo que indica una excelente precisión experimental dentro de cada nivel de tratamiento.

Además, el error cuadrático medio (MSError = $3.13201e^{-5}$) fue muy bajo, lo cual contribuye a la confiabilidad del análisis. El método mostró una capacidad discriminativa suficiente para diferenciar incluso pequeños cambios en la concentración de IBA en el intervalo evaluado, lo cual refuerza su aplicabilidad práctica para fines de cuantificación en matrices agrícolas.

La clasificación jerárquica de grupos muestra cómo el método es capaz de distinguir con precisión entre niveles consecutivos de concentración, ordenando los tratamientos desde el valor más bajo (grupo "f", 0 ppm) hasta el más alto (grupo "a", 100 ppm), lo que sugiere una relación monótonamente creciente entre absorbancia y concentración. Este comportamiento coherente y estadísticamente significativo demuestra que el protocolo validado con el reactivo de Salkowski constituye una alternativa robusta, sensible y reproducible para el análisis rutinario de IBA en bioinsumos agrícolas.

Figura 26. *Resultados de la prueba de Tukey ($p < 0.05$) para absorbancias obtenidas con el protocolo de cuantificación de IBA.*

```
> print(resultado_tukey_IBA)
$statistics
       MSerror Df      Mean       CV        MSD
  3.132301e-05 12 0.3265566 1.713852 0.01534921

$parameters
   test name.t ntr StudentizedRange alpha
  Tukey  grupo   6         4.750231  0.05

$means
    absorbancia          std r           se          Min         Max          Q25
0   0.001280092 0.005700932 3 0.003231254 -0.002802378 0.007793542 -0.001976633
100 0.655530244 0.009535957 3 0.003231254  0.645166914 0.663934566  0.651328083
20  0.133191435 0.004664900 3 0.003231254  0.130352542 0.138575325  0.130499490
40  0.229515004 0.004392559 3 0.003231254  0.225674694 0.234304581  0.227120215
60  0.406897056 0.004175222 3 0.003231254  0.402771690 0.411120409  0.404785380
80  0.532926022 0.002452476 3 0.003231254  0.530220794 0.535003857  0.531887104
             Q50         Q75
0   -0.001150887 0.003321327
100  0.657489252 0.660711909
20   0.130646439 0.134610882
40   0.228565736 0.231435158
60   0.406799069 0.408959739
80   0.533553414 0.534278635

$comparison
NULL

$groups
    absorbancia groups
100 0.655530244      a
80  0.532926022      b
60  0.406897056      c
40  0.229515004      d
20  0.133191435      e
0   0.001280092      f
```

6. Conclusiones y recomendaciones

El presente trabajo permitió desarrollar, optimizar y validar un protocolo colorimétrico accesible y confiable para la cuantificación de las auxinas ácido indolbutírico (IBA) y ácido naftalenacético (NAA), comúnmente presentes en productos bioestimulantes utilizados en agricultura. A partir de una serie de ensayos secuenciales y ajustes metodológicos progresivos, se definieron las condiciones óptimas de trabajo para cada hormona, teniendo en cuenta la naturaleza química de ambas moléculas, sus características de solubilidad y su comportamiento espectrofotométrico frente a reactivos específicos.

Para el caso del IBA, se seleccionó un rango de trabajo entre 0 y 100 ppm utilizando el reactivo de Salkowski, logrando una curva de calibración con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9996. Esta alta linealidad evidenció la efectividad del método en la detección precisa de esta hormona, con una sensibilidad suficiente para aplicaciones de rutina. Por su parte, para el NAA, se implementó una metodología basada en absorbancia diferencial ($\lambda 223$ nm – $\lambda 243$ nm), estableciendo un rango de trabajo entre 0.5 y 5.0 ppm con resultados igualmente satisfactorios en términos de linealidad ($R^2 = 0.9954$) y estabilidad. Ambos métodos fueron validados bajo criterios establecidos por la guía ICH Q2(R1), evaluando rigurosamente los parámetros de precisión, exactitud, repetibilidad, reproducibilidad, sensibilidad (LOD y LOQ), y homogeneidad de varianza mediante análisis estadísticos apropiados como regresión lineal, ANOVA, pruebas de Tukey y análisis de residuos.

En el marco del estudio también se desarrolló una aplicación práctica del protocolo mediante el análisis de un producto bioestimulante que contenía ambas auxinas. Se simularon condiciones reales de control de calidad mediante la preparación de soluciones madre representativas y su posterior análisis espectrofotométrico. Los resultados obtenidos por el método colorimétrico coincidieron de manera satisfactoria con los valores reportados por la técnica cromatográfica de referencia (HPLC), confirmando la fiabilidad del protocolo desarrollado para cuantificaciones reales en matrices comerciales. Esta concordancia metodológica refuerza el potencial del protocolo propuesto como herramienta de monitoreo en la industria de bioinsumos, especialmente en laboratorios con recursos limitados.

Finalmente, se evaluó la actividad biológica de las hormonas mediante un ensayo de enraizamiento en esquejes de *Chrysanthemum sp.*, en condiciones controladas de invernadero. Se

observó una diferencia significativa en el porcentaje de enraizamiento, longitud de brote y presencia de raíces adventicias entre el grupo tratado con auxinas y el control. Estas diferencias fueron corroboradas mediante análisis estadísticos (prueba t, chi-cuadrado), evidenciando que la presencia de IBA y NAA en la formulación tiene un efecto fisiológico directo sobre los procesos de iniciación y desarrollo radicular. El análisis cualitativo y cuantitativo mostró resultados coherentes con lo esperado para auxinas aplicadas exógenamente, consolidando la aplicabilidad biológica del método en condiciones reales.

En consecuencia, se recomienda que en futuros trabajos se explore la ampliación del rango de detección de ambos métodos colorimétricos, especialmente para evaluar productos con mayores concentraciones hormonales o con matrices más complejas. También sería útil estudiar en mayor profundidad la posible interferencia entre fitohormonas cuando coexisten en una misma matriz, implementando metodologías de separación previa como extracción en fase sólida (SPE) o cromatografía preparativa. Adicionalmente, se sugiere replicar este protocolo en formulaciones sólidas, microbianas u otras presentaciones comerciales para evaluar su robustez y adaptabilidad. Por último, sería conveniente realizar estudios de estabilidad hormonal en productos almacenados bajo diferentes condiciones, lo que permitiría utilizar este protocolo como herramienta de vigilancia post-comercial en sistemas de aseguramiento de la calidad.

Referencias

Agrosabio. (2023). *3 herramientas para medir la concentración de auxinas en las plantas*. Agrosabio. https://agrosabio.com/3-herramientas-para-medir-la-concentracion-de-auxinas-en-las-plantas/

Base de datos de plaguicidas de la UE. (2020). *Reglamento (CE) n.º 1107/2009: límites máximos de residuos (LMR) para reguladores del crecimiento vegetal*. Comisión Europea. https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en

Bautista, L. X. C., & Gallardo, I. R. (2008). *Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) en cultivos microbianos*. Pontificia Universidad Javeriana.

De Klerk, G. J., Van der Krieken, W., & De Jong, J. C. (1999). The formation of adventitious roots: New concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 35*(3), 189–199. https://doi.org/10.1007/s11627-999-0031-y

Dharmasiri, S., Dharmasiri, N., & Estelle, M. (2022). La proteína F-box TIR1 es un receptor de auxina. *Nature, 435*(7041), 441–445.

FAO. (2018). *Regulación de los bioestimulantes vegetales: hacia un marco de armonización*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. http://www.fao.org

Gallei, M., Höfer, C., & Feussner, I. (2022). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Plant Physiology, 189*(3), 1178–1192. https://doi.org/10.1093/plphys/kiab112

Gao, S., Zhao, X., Lin, C., Gao, J., & Xu, J. (2019). Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas para la detección de auxinas: avances y aplicaciones recientes. *Química Analítica y Bioanalítica, 411*(5), 1023–1035.

Gao, X., Zhou, J., & Li, Y. (2019). Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para reguladores del crecimiento de las plantas: una revisión de aplicaciones y avances. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 67*(45), 12435–12450. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04123

Garbari, F., Caffini, N., & González, A. (2021). Root development under different stress conditions: The role of auxins. *Plant Physiology and Biochemistry, 165*, 97–108. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.06.018

García, F. A., Moreno, L. C., & Márquez, J. D. (2021). Evaluación del enraizamiento de esquejes de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium*) bajo diferentes tipos de auxinas. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas, 15*(1), 73–81. https://doi.org/10.17584/rcch.2021v15i1.12345

Gilbert, S., Xu, J., Acosta, K., Poulev, A., Lebeis, S., & Lam, E. (2018). Bacterial production of indole related compounds reveals their role in association between duckweeds and endophytes. *Frontiers in Chemistry, 6*, 265.

Glickmann, E., & Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology, 61*(2), 793–796. https://doi.org/10.1128/aem.61.2.793-796.1995

Ghorbanpour, M., Omidvari, M., & Abtahi, F. (2021). Colorimetric analysis of auxins in plant growth regulators. *Journal of Agricultural Chemistry, 58*(4), 512–527. https://doi.org/10.1016/j.jagchem.2021.04.005

Hansen, B. G., Kristensen, C., & Müller, C. (2018). Standard curve preparation and its role in analytical chemistry. *Analytical Methods, 10*(2), 231–242. https://doi.org/10.1039/C7AY02298D

ICH (Consejo Internacional para la Armonización de los Requisitos Técnicos de los Productos Farmacéuticos de Uso Humano). (2021). *Validación de procedimientos analíticos: Texto y metodología Q2(R1)*. https://www.ich.org

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). (2005). *ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf

ISO. (2017). *ISO/IEC 17025:2017 – Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*. Organización Internacional de Normalización. https://www.iso.org

Kawaguchi, Y., Kosemura, S., & Yamamura, S. (2020). Synthetic auxins and their application in plant growth regulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 68*(25), 6825–6834. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02478

Liu, H., Wang, Q., Liu, Y., & Dai, Z. (2020). Avances en técnicas cromatográficas para el análisis de hormonas vegetales. *Journal of Chromatography B, 1150*, 122160.

Liu, X., Zhang, L., & Wang, Y. (2019). Validation of colorimetric assays for phytohormone detection. *Journal of Analytical Science, 25*(7), 782–795. https://doi.org/10.1002/jas.2019.07.002

Liu, Y., Zhang, D., & Wang, H. (2019). Auxin and its role in root development. *Plant Science, 285*, 23–30. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.01.013

Maná, M., Rengasamy, B., & Sinha, A. K. (2024). Un método colorimétrico rápido y robusto para medir la abundancia relativa de auxinas en tejidos vegetales. *Phytochemical Analysis, 35*(5), 1052–1062. https://doi.org/10.1002/pca.3340

Marek, L. F. (1932). The catalytic oxidation of organic compounds in the vapor phase.

Muniappan, S., Ramesh, M., & Ramakrishnan, S. (2018). Colorimetric analysis for plant hormones: A comparative study. *Journal of Analytical Chemistry, 73*(11), 1072–1079. https://doi.org/10.1134/S1061934818110093

Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE). (2021). *Guidance for the testing of chemicals: OECD guidelines for the testing of chemicals*. https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/guidelines-for-testing-of-chemicals.htm

Rademacher, W. (2016). Plant growth regulators: Their role in agriculture and horticulture. *Journal of Plant Physiology, 207*, 89–103. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.07.011

Raven, P. H., Evert, R. F., & Eichhorn, S. E. (2005). *Biología de las plantas* (7ª ed.). Editorial Reverté.

Rodríguez-Gámez, O., Vilasó-Cadre, J. E., Aguilera-Rodríguez, I., Pérez-Silva, R. M., & Ábalos-Rodríguez, A. (2013). Validación por verificación del método colorimétrico de la antrona para la cuantificación de ramnolípidos. *Revista Cubana de Química, 25*(3), 287–294.

Santner, A., & Estelle, M. (2019). Avances recientes y tendencias emergentes en la señalización de hormonas vegetales. *Nature Reviews Molecular Cell Biology, 10*(4), 275–284.

Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2017). *Fisiología y desarrollo vegetal* (6ª ed.). Sinauer Associates / Ed. Médica Panamericana.

Yin, X., Chen, J., & Yu, H. (2020). Advances in auxin signaling and application in agriculture. *Frontiers in Plant Science, 11*, 581601. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.581601

Young, H. Y., Shimabukuro, S., & Aono, L. (1963). Growth Regulator Residues, Spectrophotometric Microdetermination of 1-Naphthaleneacetic Acid in Pineapple. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 11*(2), 132–133.

Zhang, H., Wang, X., Li, Q., & Wang, J. (2021). Un enfoque espectrofotométrico para la cuantificación de auxinas en tejidos vegetales. *Journal of Plant Research, 134*(3), 567–580.

Zhang, Q., Gong, M., Xu, X., Li, H., & Deng, W. (2022). Funciones de la auxina en el crecimiento, el desarrollo y la tolerancia al estrés de las plantas hortícolas. *Cells, 11*(17), 2761.

Zhao, Y. (2021). Biosíntesis de auxinas y su papel en el desarrollo de las plantas. *Revista Anual de Biología Vegetal, 72*, 89–115.

Anexos

En los anexos se incluye material complementario que apoya el trabajo final, tales como consentimientos informados, entrevistas, material fotográfico, etc. Evite incluir material que puede estar protegido por derechos de autor, tales como pruebas psicológicas, fragmentos de libros, artículos de revistas, patentes, etc. Recuerda no incluir en tu documento datos de personas o entidades objetos de la investigación, tales como nombres, apellidos, cédulas, números telefónicos, consentimientos informados con datos personales (Resolución 8430 de 1993), nombres de empresas sin el consentimiento escrito del representante legal, fotografías en primer plano de personas (especialmente de menores de edad) y demás información que pueda contravenir los principios emitidos en la Ley Estatutaria 1581 de 2012 (Ley de protección de datos personales).

Los siguientes anexos contienen documentos de interés para el proceso de trabajo de grado, así como trucos y recomendaciones que surgen constantemente en la elaboración de un documento en Word.