



**UNIVERSIDAD DE JAÉN**  
*Facultad de Ciencias Experimentales*

Trabajo Fin de Grado

# **Métodos cromatográficos para la determinación de reguladores de crecimiento en tejidos vegetales**

**Alumno/a: Alba Guerrero García**

**Junio, 2022**





**UNIVERSIDAD DE JAÉN**  
*Facultad de Ciencias Experimentales*

**GRADO EN QUÍMICA**

Trabajo Fin de Grado

# **Métodos cromatográficos para la determinación de reguladores de crecimiento en tejidos vegetales**

**Alumna: Alba Guerrero García**

**FIRMA**

**Jaén, Junio de 2022**



## ÍNDICE

|                                                            |           |
|------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>RESUMEN.....</b>                                        | <b>7</b>  |
| <b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>                                | <b>8</b>  |
| <b>1.1. Reguladores de crecimiento y fitohormonas.....</b> | <b>8</b>  |
| <b>1.2. Clasificación de fitohormonas.....</b>             | <b>8</b>  |
| <b>2. IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LAS FITOHORMONAS.....</b>   | <b>13</b> |
| <b>2.1. Clasificación de tejidos vegetales.....</b>        | <b>13</b> |
| 2.1.1. Raíz.....                                           | 13        |
| 2.1.2. Tallo.....                                          | 14        |
| 2.1.3. Hojas.....                                          | 15        |
| 2.1.4. Flor.....                                           | 16        |
| <b>2.2. Mecanismos de acción de las fitohormonas.....</b>  | <b>17</b> |
| 2.2.1. Auxinas.....                                        | 17        |
| 2.2.2. Giberelinas.....                                    | 18        |
| 2.2.3. Citoquininas.....                                   | 19        |
| 2.2.4. Ácido Abscísico.....                                | 19        |
| 2.2.5. Ácido Salicílico.....                               | 20        |
| 2.2.6. Poliaminas.....                                     | 20        |
| 2.2.7. Ácido Jasmónico y derivados.....                    | 21        |
| 2.2.8. Brasinoesteroides.....                              | 22        |
| 2.2.9. Etileno.....                                        | 23        |
| 2.2.10. Estrigolactonas.....                               | 23        |
| <b>3. OBJETIVOS .....</b>                                  | <b>24</b> |
| <b>4. METODOLOGÍA.....</b>                                 | <b>24</b> |

|                                                                              |           |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>5. DETERMINACIÓN DE FITOHORMONAS.....</b>                                 | <b>25</b> |
| <b>5.1. Métodos cromatográficos.....</b>                                     | <b>25</b> |
| 5.1.1. Cromatografía de gases.....                                           | 25        |
| 5.1.2. Cromatografía de líquidos.....                                        | 27        |
| 5.1.2.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....            | 28        |
| 5.1.2.2. Cromatografía de líquidos de ultrarápida (UHPLC).....               | 30        |
| <b>5.2. Espectrometría de masas (MS).....</b>                                | <b>31</b> |
| <b>5.3. Metodología analítica para la determinación de fitohormonas.....</b> | <b>32</b> |
| 5.3.1. Ácido Jasmónico.....                                                  | 32        |
| 5.3.2. Ácido Abscísico.....                                                  | 33        |
| 5.3.3. Poliaminas.....                                                       | 34        |
| 5.3.4. Giberelinas.....                                                      | 35        |
| 5.3.5. Auxinas.....                                                          | 36        |
| 5.3.6. Citoquininas.....                                                     | 37        |
| 5.3.7. Brasinoesteroides.....                                                | 38        |
| 5.3.8. Estrigolactonas.....                                                  | 38        |
| <b>5. CONCLUSIONES.....</b>                                                  | <b>44</b> |
| <b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>                                                  | <b>44</b> |

## **RESUMEN**

En este trabajo de fin de grado se ha realizado una búsqueda bibliográfica sobre los métodos de cuantificación existentes actualmente para fitohormonas y reguladores de crecimiento en muestras vegetales. Este trabajo consta de una breve introducción para poner en contexto que son las fitohormonas y los reguladores del crecimiento vegetal y que función ejercen cada uno de ellos en distintas zonas del organismo. Por dicha razón, es importante conocer la fisiología vegetal para saber en qué punto exacto realizan sus funciones, explicándose ésta detalladamente. Por otro lado, se detallará el tratamiento de muestra de cada fitohormona, generalmente basado en una extracción empleando como disolvente acetonitrilo. Posteriormente, se explicará en detalle los métodos analíticos existentes para su determinación, siendo los métodos basados en cromatografía líquida y cromatografía de gases con detectores UV y espectrometría de masas los métodos más usados.

**PALABRAS CLAVE:** Fitohormonas, reguladores del crecimiento, cromatografía, espectrometría de masas.

## **ABSTRACT**

In this end-of-degree project, a short overview of existing quantification methods for the determination of phytohormones and growth regulators in plant samples has been carried out. This work consists of a brief introduction to contextualise what phytohormones and plant growth regulators are and what function each performs in different body areas. For this reason, it is crucial to know the plant physiology to know at what point strictly they perform their functions, explaining this in detail. On the other hand, the sample treatment of each phytohormone will be detailed, generally based on an extraction using acetonitrile as extraction solvent. Subsequently, the current analytical methods for its determination will be deeply explained. The most commonly employed are based on liquid chromatography and gas chromatography with UV detectors and mass spectrometry.

**KEYWORDS:** Phytohormones, growth regulators, chromatography, mass spectrometry.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Reguladores de crecimiento y fitohormonas**

El funcionamiento general de las plantas requiere ciertos mecanismos para regular y/o coordinar las diferentes actividades de sus células, tejidos y órganos. Es por ello que es necesario definir que son los reguladores de crecimiento y las fitohormonas (*Meshram, J.H. et al. 2022*).

Los reguladores del crecimiento vegetal, también conocidos como fitorreguladores, son compuestos orgánicos distintos a los nutrientes que, cuando se aplican en pequeñas concentraciones, afectan los procesos fisiológicos de las plantas. Dichos reguladores promueven, inhiben o alteran cualitativamente el crecimiento y desarrollo de las plantas (*Meshram, J.H. et al. 2022*).

Las fitohormonas son los reguladores clave del crecimiento y procesos de desarrollo de las plantas. Se definen como una sustancia orgánica, distinta a los nutrientes, que es activa en muy bajas concentraciones, a veces se produce en determinados tejidos y se transporta a otros, donde ejerce su función, pero también realizar su función en los tejidos donde se ha realizado su síntesis (*Meshram, J.H. et al. 2022*).

### **1.2. Clasificación de las fitohormonas**

Las fitohormonas pueden clasificarse en base a su estructura molecular, su función a nivel vegetal y sus efectos estimulantes o inhibidores entre otras clasificaciones. La tabla 1.1 muestra una clasificación de las fitohormonas más usadas para el crecimiento vegetal y sus aplicaciones (*Alcántara Cortés, J.S. et al. 2019*).



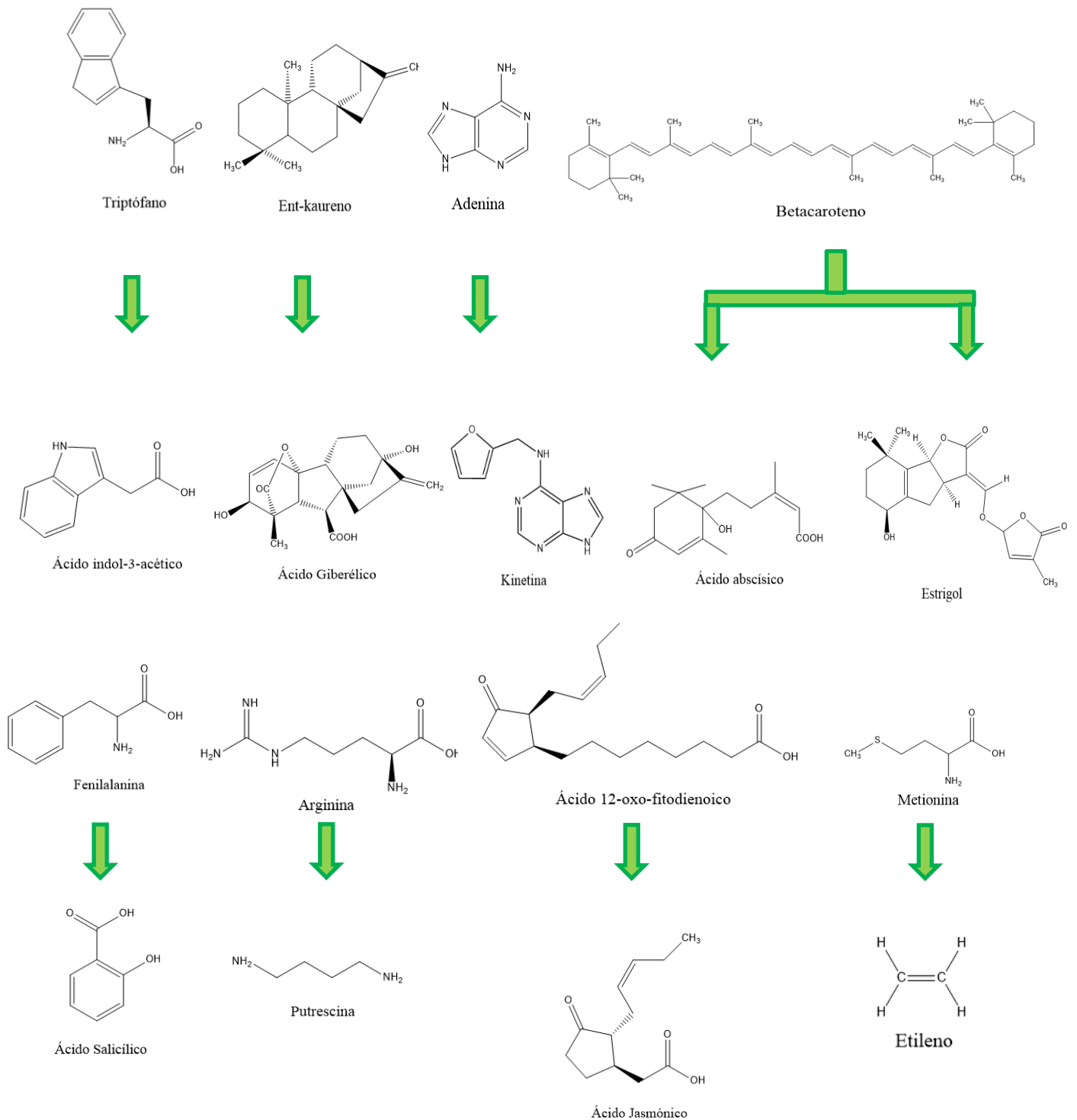
| FITOHORMONA         | VARIEDADES                                                                                                                                   | EFFECTOS A NIVEL VEGETAL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | EFFECTOS A NIVEL CELULAR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | PRECURSORES ORGÁNICOS |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| <b>AUXINAS</b>      | <ul style="list-style-type: none"> <li>· AIA</li> <li>· AIB</li> <li>· 2,4-D</li> <li>· Ácido o-naftalenacético (NAA) (Sintético)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Formación y elongación de tallos</li> <li>· Producción de diferentes raíces adventicias</li> <li>· Aumento de la dominancia apical</li> </ul>                                                                                                                                                                                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>· División y elongación celular</li> <li>· Diferenciación celular</li> <li>· Promoción división celular meristemática</li> <li>· Aumenta contenido osmótico celular</li> <li>· Aumenta permeabilidad celular</li> <li>· Aumento de producción proteica</li> <li>· Disminución de la presión de la pared celular</li> </ul> | L-Triptofano          |
| <b>GIBERELINAS</b>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>· GA1</li> <li>· GA2</li> <li>· GA3</li> </ul>                                                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Aumenta el desarrollo de tejidos de manera constante</li> <li>· Elongación de raíces, hojas jóvenes, floración</li> <li>· Alargamiento de segmentos nodales</li> <li>· Participan en procesos de iniciación floral</li> <li>· Vital en fertilidad de plantas masculinas y femeninas</li> <li>· Induce germinación de semillas</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Estimula la elongación celular en respuesta a condiciones de luz y oscuridad</li> <li>· Promociona el crecimiento embrionario</li> <li>· Producida de manera endógena durante los procesos de germinación y desarrollo apical</li> </ul>                                                                                 | ent-Kaureno           |
| <b>CITOQUININAS</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Kinetina</li> <li>· Zerotina</li> <li>· Benciladenina</li> <li>· 4-hidroxifeniletanol</li> </ul>    | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Induce la iniciación y elongación de raíces</li> <li>· Activa la senescencia de las hojas</li> <li>· Estimulan el desarrollo fotomorfogénico vegetal</li> <li>· Estimula la generación de brotes axilares a nivel vegetal.</li> </ul>                                                                                                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Pueden sustentar e iniciar la proliferación de tejidos vegetales madre</li> <li>· Permite producir una alta proliferación y división celular</li> <li>· Se produce con mayor abundancia en las células de los ápices radiculares</li> </ul>                                                                              | Adenina               |

|                         |                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                   |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ÁCIDO ABSCÍSICO</b>  | No Presenta                                                                                                                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Regula y mantiene la dormancia de las semillas</li> <li>· Estimula la maduración de semillas</li> <li>· Puede inhibir el proceso de germinación vegetal</li> <li>· Regula la transpiración celular (Estomas)</li> <li>· Puede inducir la senescencia vegetal y floración vegetal</li> </ul>           | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Promociona la producción de tejidos zigotos</li> <li>· Tiene un fácil acceso a la membrana celular vegetal</li> <li>· Esta sintetizado en tejidos jóvenes como el endodermo de plantas madre y en algunos tejidos vegetales de las semillas (Testa)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Isopentil Pirofosfato</li> <li>· Carotenoides</li> </ul> |
| <b>ÁCIDO SALICÍLICO</b> | No presenta                                                                                                                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Potencializa el crecimiento de la floración</li> <li>· Incrementa la longevidad floral</li> <li>· Control y protección de procesos de estrés</li> <li>· Mejora la tolerancia de la germinación a bajas temperaturas</li> <li>· Aumenta resistencia en ambientes de alta salinidad o sequía</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Rol inhibitorio en la síntesis de etileno a nivel celular</li> <li>· Control de actividad fotosintética</li> <li>· Control de la conductividad de los estomas</li> </ul>                                                                                       | Fenilalanina                                                                                      |
| <b>POLIAMINAS</b>       | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Cadaverina</li> <li>· Putrecina</li> <li>· Agmatina</li> <li>· Spermidina</li> <li>· Spermina</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Promueve la elongación y desarrollo de la raíz</li> <li>· Promueve el desarrollo del sistema radicular primario, lateral y adventicio</li> <li>· La disminución del contenido de poliaminas puede causar la disminución de la elongación radicular</li> </ul>                                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Sintetizadas por medio de las células pertenecientes al sistema radicular</li> <li>· Involucradas en procesos de señalización de la transducción</li> <li>· Asociadas a procesos de proliferación y crecimiento de células vegetales</li> </ul>                | Adenina                                                                                           |

|                                    |                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ÁCIDO JASMÓNICO Y DERIVADOS</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Ester metílico de ácido jasmónico</li> <li>· Ácido jasmónico</li> </ul>              | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Regulación del desarrollo de órganos embrionarios</li> <li>· Regulación de la germinación de semillas</li> <li>· Regula la formación de raíces</li> <li>· Están involucrados en la adaptación a procesos de estrés y fototropismos</li> </ul>              | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Regula el crecimiento y desarrollo celular</li> <li>· Importante función en la inmunidad vegetal</li> <li>· Su síntesis comienza en organelos vegetales como cloroplastos, mitocondrias y vacuolas</li> <li>· Inhibe la formación de callos</li> <li>· Involucrados en procesos de regulación de envejecimiento celular</li> </ul>                                                                                                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Ácido 12-oxo-fitodienólico (OPDA)</li> <li>· Ácidos grasos poliinsaturados</li> </ul> |
| <b>BRASINOESTEROIDES</b>           | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Brasinolida</li> <li>· 25HB</li> <li>· Catasterona</li> <li>· Ponasterona</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Controla el crecimiento de raíces</li> <li>· Regula la fotomorfogénesis</li> <li>· Diferenciación de estomas y sistema vascular</li> <li>· Promoción del vástago vegetal</li> <li>· Control y adaptación a factores de estrés</li> </ul>                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Regulación del metabolismo</li> <li>· Señalización celular</li> <li>· Control de la elongación y división celular</li> <li>· Control de la inmunidad vegetal</li> <li>· Promociona la producción de etileno</li> <li>· Su síntesis comienza en el retículo endoplasmático</li> </ul>                                                                                                                                                       | Campesterol                                                                                                                    |
| <b>ETILENO</b>                     | No presenta                                                                                                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Regula la maduración y senescencia vegetal</li> <li>· Maduración de hojas, inicio de floración y frutos</li> <li>· Desarrollo de órganos sexuales</li> <li>· Puede mejorar las características de maduración de frutos</li> </ul>                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Capaz de ser producido por cualquier órgano vegetal</li> <li>· Potencializa la acción de auxinas, ácido abscísico y citoquininas</li> <li>· Puede inhibir la acción del ácido jasmónico y el ácido giberélico</li> <li>· Induce la reducción de ácidos nucleicos, la degradación de proteínas, disminución de la membrana celular</li> <li>· Induce la degradación de lípidos, peroxidación y ruptura de pigmentos en las hojas</li> </ul> | Metionina                                                                                                                      |
| <b>ESTRIGOLACTONAS</b>             | <ul style="list-style-type: none"> <li>· GR24 (Sintético)</li> <li>· Estrigol</li> </ul>                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Involucrado en respuestas adaptativas cuando se presenta deficiencia de fósforo y nitrógeno en el medio</li> <li>· Potencializa el desarrollo de raíces</li> <li>· Puede aumentar el desarrollo radicular cuando se combina con ciertas auxinas</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Controla el transporte de otras fitohormonas</li> <li>· Pueden inhibir la acción de las citoquininas</li> <li>· Control en el metabolismo de sustancias en el sistema radicular</li> <li>· Controla la regulación homeostática vegetal</li> </ul>                                                                                                                                                                                          | Carotenoides                                                                                                                   |

Tabla 1.1 Clasificación de fitohormonas. Fuente: Alcántara Cortés, J.S. et al. 2019

Cada uno de estos reguladores necesitan para su síntesis diferentes precursores, los cuales generalmente son obtenidos del medio en el que se desarrollan las plantas. En la figura 1.1 se muestran varios precursores que existen para cada una de las principales fitohormonas (Alcántara Cortés, J.S. et al. 2019).



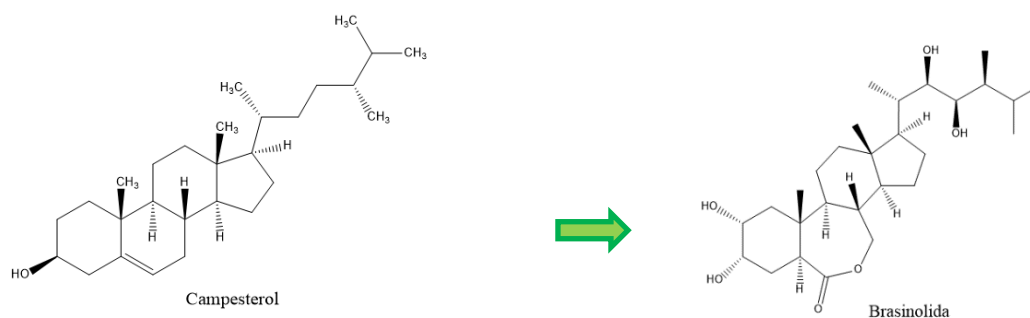


Figura 1.1 Fitohormonas vegetales más comunes en la naturaleza. Se muestran las diferentes estructuras químicas de los precursores necesarios para la producción de cada fitohormona

## 2. IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LAS FITOHORMONAS

### 2.1. Clasificación de tejidos vegetales

Para entender mejor en qué lugar participan cada una de las fitohormonas, es necesario tener conocimiento sobre fisiología vegetal (León. L., 2010).

#### 2.1.1. Raíz

Cuando las semillas germinan, las raíces comienzan a desarrollarse. La raicilla o radícula se convierte en la raíz primaria y se desarrolla para formar la raíz secundaria unida a ella. Las raíces están cubiertas por tejido epidérmico, extendiéndose para formar los llamados pelos radiculares. El parénquima se encuentra debajo de la epidermis, aunque no realiza la función de fotosíntesis, sino que actúa como tejido de almacenamiento. Debajo del parénquima se encuentra la capa endotelial, que es un tejido más denso que el anterior.

En el centro de la raíz hay tejido vascular, redondeado y formando una estela. En la última parte hay una zona muy dura compuesta de tejido vascular, que abre canales a través de la capa del suelo y protege las células meristemáticas que crecen más profundamente, llamada caliptra o cofia. En corte transversal, el xilema (tejido conductor de agua en las plantas vasculares, formado por células huecas muertas llamadas traqueidas y vasos sanguíneos) y el floema (tejido vascular que transporta los alimentos desde la producción hasta el almacenamiento, formado por columnas

con células vivas que perforan la pared, permitiendo que el material pase de una celda a otra) se encuentran en el centro de la raíz (León. L., 2010).

Funciones de la raíz:

- Obtener del suelo el agua y sales minerales (León. L., 2010).
- Servir de anclaje para la planta (León. L., 2010).
- Servir como reserva de alimento como el almidón (León. L., 2010).

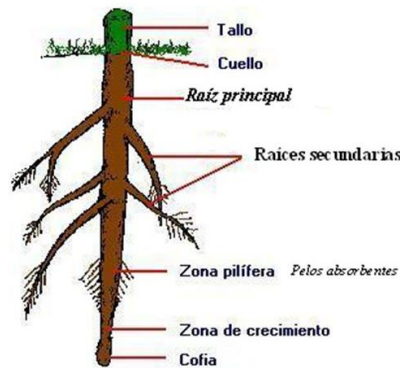


Figura 2.2 Estructura de una raíz. Fuente: (León. L., 2010).

### 2.1.2. Tallo

Es una estructura alargada de la que crecen ramas, hojas, flores y frutos. Cuanto más largo es el tallo, más trabajo tiene que hacer el sistema vascular para transportar agua y minerales desde la raíz hasta cada célula de la planta.

Puede ser leñosa si el tallo forma una estructura dura (troncos de árboles y arbustos), o puede ser herbácea porque no forma una estructura leñosa y mantiene una consistencia blanda (León. L., 2010).

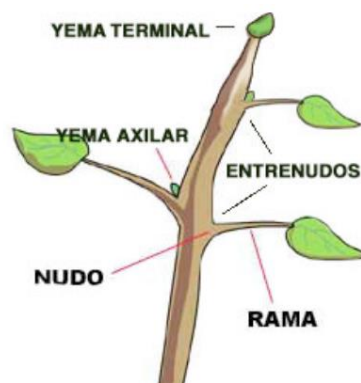


Figura 2.3 Estructura del tallo. Fuente: (León. L., 2010).

En el interior del tallo se localiza:

- La colénquima que proporciona elasticidad a y plasticidad las hojas (León. L., 2010).
- El esclerénquima les brinda soporte a las plantas formado por células muertas cubiertas de lignina (León. L., 2010).

En los tallos también se encuentran tejidos como yemas ricas en meristemas, es decir, tejidos en crecimiento. Minerales y materiales procesados en toda la planta (León. L., 2010).

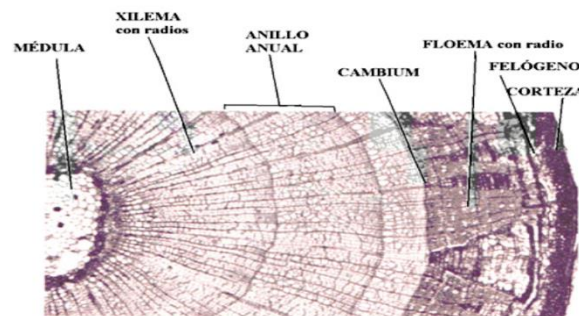


Figura 2.4 Interior de un tallo. Fuente: (León. L., 2010).

### 2.1.3. Hojas

Las hojas son órganos especializados, generalmente con forma aplanada, lo que les permite exponer una superficie más grande para captar más luz. La hoja está rodeada de tejido epidérmico que protege la hoja, seguido de parénquima o tejido fotosintético y tejido vascular (xilema y floema). Por lo general, las hojas son verdes debido a la presencia de un pigmento (clorofila), pero no, otros pigmentos como los carotenoides (rojo o naranja) y la luteína (amarillo) también se encuentran en las hojas. El oxígeno y el agua ingresan a la atmósfera a través de poros llamados estomas ubicados en la epidermis de la hoja, lo que permite que los gases entren y salgan, también se produce la transpiración y otra estructura es el cabello llamado tricomas los cuales están a ambos lados de la hoja y sirven para defender a la hoja, evitar daños por el viento y amortiguar los golpes mecánicos (León. L., 2010).

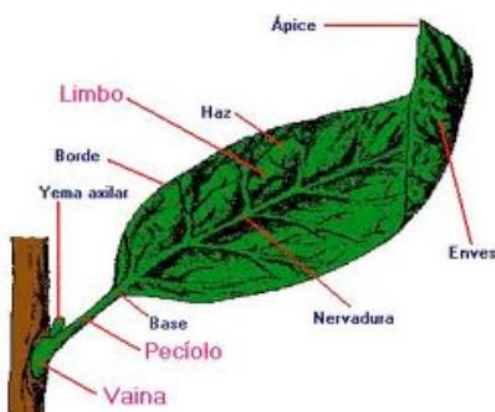


Figura 2.5 Estructura de una hoja. Fuente: (León. L., 2010).

#### 2.1.4. Flor

Las flores tienen 4 elementos básicos:

1. Cáliz: Consta de varias hojas verdes llamadas sépalos, que son hojas verdes dispuestas en anillo y se ubican sobre un receptáculo que es una corola formada por pétalos, que son hojas modificadas de diferentes colores y contienen néctar (León. L., 2010).
2. Corola: Consiste en pétalos, que son hojas modificadas de colores brillantes y rodean las estructuras reproductivas. La función de la corola es atraer pájaros o insectos como moscas, escarabajos, mariposas y abejas (León. L., 2010).
3. El pistilo o pistilo (órgano femenino): Es la estructura en la que se encuentra el óvulo de la flor, tienen forma de botella y se dividen en tres partes (León. L., 2010):
  - Estigma: Es la parte superior, generalmente pegajosa, y actúa como una abertura que recibe el polen y lo introduce (León. L., 2010).
  - Estilo: Es un tubo que se extiende hasta el fondo, similar a un cuello (León. L., 2010).
  - Ovario: La estructura donde se encuentra y fertiliza el óvulo (León. L., 2010).
4. El androceo o estambres (órgano masculino), es el aparato reproductor masculino que se compone por los filamentos, que son estructuras delgadas que en su punta alojan una estructura llamada antera la cual conduce y almacena los espermatozoides en forma de polen (León. L., 2010).



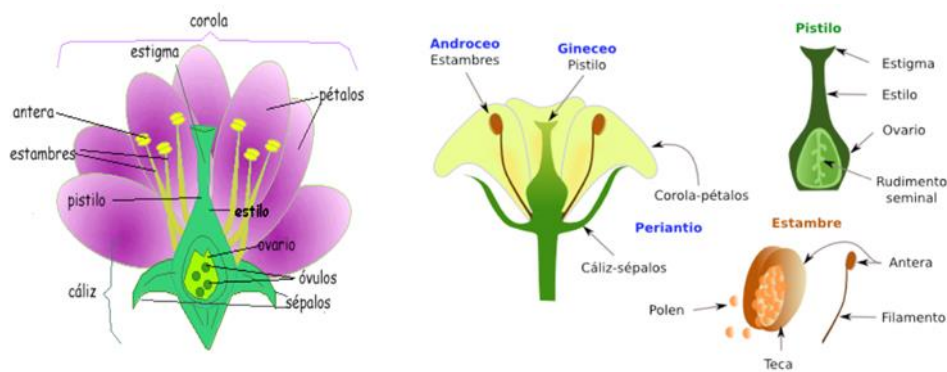


Figura 2.6 Estructura de una flor. Fuente: (León. L., 2010).

## 2.2. Mecanismos de acción de las fitohormonas

El desarrollo de las plantas requiere de reguladores hormonales (fitohormonas), las cuales son capaces de controlar la actividad metabólica para una mejora de la homeostasis intracelular y extracelular. Cada fitohormona realiza diferentes interacciones para poder cumplir sus funciones. Podemos decir que, dentro de la clasificación de fitohormonas, vistas en el apartado anterior, se encuentran las más utilizadas para el crecimiento vegetal, las cuales desarrollaré una a una para entender mejor su funcionamiento (Alcántara Cortés, J.S. et al. 2019).

### 2.2.1. Auxinas

Son un tipo de hormonas vegetales que están especializadas para diferentes procesos a nivel de la planta. El principal punto de acción es a nivel celular, donde tienen la capacidad de dirigir e intervenir en los procesos de división, elongación y diferenciación celular. Esta, generalmente está bien distribuida en la mayoría de las células y tejidos vegetales, por lo que puede interferir en los procesos de diferenciación unicelulares y pluricelulares e incluso actuar sobre diferentes tejidos vegetales. Dada la función de esta hormona, se piensa que es un morfógeno capaz de inducir la diferenciación celular en órganos como raíces, tallos y hojas, que así mismo se producen. Una de las propiedades más relevantes de las auxinas es su capacidad para inducir la formación y elongación de tallos a nivel de planta, Promueve la división celular en cultivos de callos (un grupo de células indiferenciadas sobreproducidas por un exceso de auxina en el ambiente de la planta) en presencia de citoquininas y tiene la capacidad de inducir la producción de distintas raíces adventicias en la hoja recién cortada y la capacidad del tejido del tallo. La auxina más

conocida a nivel vegetal es el ácido 3-indol-acético (AIA), que es la principal auxina de origen natural, pero también se conocen otros tipos de auxinas que se producen sintéticamente, como el ácido indolbutírico (IBA), el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el  $\alpha$ - ácido naftalenoacético (NAA) (Alcántara Cortés, J.S. et al. 2019).

### 2.2.2. Giberelinas

Son también conocidas como ácidos giberélicos, aparecieron cerca de la década de 1930, cuando algunos científicos analizaron por primera vez algunas fitopatologías relacionadas con el arroz. En esta investigación se observó un hongo conocido como *Gibberella fujikuroi*, agente etiológico de la enfermedad "bakanae" presente en las plántulas de arroz. Dicha enfermedad era ocasionada por la sobreexpresión de la fitohormona giberelina A, la cual era sintetizada por ese hongo y ocasionaba un crecimiento apical de la planta, con una morfología delgada en el desarrollo del vástago vegetal. Con el paso del tiempo algunos científicos mediante filtración y purificación de metabolitos que eran capaces de producir estos hongos, pudieron aislar e identificar distintos tipos de giberelinas en la década de 1950 (GA1, GA2, GA3) (Alcántara Cortés, J.S. et al. 2019).

Esta fitohormona puede ser producida por varios microorganismos como *Pseudomonas* spp, *Bacillus* spp, *Lactobacillus* spp, entre otros, cuando ocurren ciertas interacciones bióticas y parasitarias (bacterias y hongos). Están involucradas a nivel vegetal en el desarrollo de tejidos cuyo crecimiento es constante, como lo pueden ser la elongación de raíces, hojas jóvenes o la floración. Por otra parte, el ácido giberélico (GA3), juega un papel importante en el alargamiento de los segmentos nodales, ya que permite estimular la elongación celular en respuesta a las condiciones de luz y oscuridad. Además, tiene una gran importancia en los procesos iniciales de la floración, por lo que es muy importante para la fertilidad de las plantas masculinas y femeninas. Cuando hay una baja concentración de giberelinas se observa una esterilidad y un bajo desarrollo de los aparatos reproductores vegetales. Por otro lado, es importante destacar que dicha sustancia tiene la capacidad de inducir la germinación de las semillas y tiene una alta capacidad estimulante en el crecimiento embrionario (Alcántara Cortés, J.S. et al. 2019).

### 2.2.3. Citoquininas

Son un tipo de fitohormonas derivadas de la adenina que tuvieron su primera aparición entre los años 1940 y 1950, cuando Caplin y Steward comenzaron a estudiar el efecto que tenía el extracto de la levadura y el jugo de tomate sobre el crecimiento vegetal. Durante dicho estudio se observó que dichas sustancias tenían la capacidad de iniciar la proliferación de tejidos madre cuando eran aplicadas sobre organismos vegetales en pequeñas proporciones. Pasado un tiempo, se estudiaron sustancias que tuvieran una función similar, encontrando en el agua de coco las citoquininas. Las citoquininas tienen la capacidad de estimular e inducir una alta proliferación y división celular, suelen inducir la iniciación y elongación de las raíces al igual que pueden activar la senescencia de las hojas, permitiendo estimular el desarrollo fotomorfogénico vegetal y participar en el aumento y generación de la producción de brotes. Estas fitohormonas suelen producirse abundantemente en la punta de la raíz y se transportan normalmente por el xilema vegetal hacia las hojas. Su efecto siempre suele ir acompañado de la presencia de auxinas debido a su alta complementariedad con la estimulación del crecimiento y desarrollo vegetal, por lo que una concentración parecida entre auxinas y citoquininas puede inducir la proliferación de células no diferenciadas (meristemos), mientras que una mayor concentración de auxinas podría generar un aumento en la producción de raíces, y una mayor concentración de citoquininas induciría a una mayor producción de brotes vegetales (yemaciones) (Alcántara Cortés, J.S. et al. 2019).

### 2.2.4. Ácido Abscísico (ABA)

Es una fitohormona que tiene la capacidad de inhibir y controlar algunos procesos vegetales que usualmente ocurren de manera natural. Este puede ser producido de forma indirecta por las plantas a partir de la producción de ciertos carotenoides. También puede ser sintetizado de manera directa por algunos organismos fúngicos. Posee la capacidad de regular y mantener la dormancia de las semillas potencializando este efecto, teniendo una función importante en la maduración de semillas y en la producción de cigotos. Esta fitohormona también presenta una función importante en la maduración del embrión vegetal y está implicada en procesos de regulación génica y promoción de la senescencia. Esta sustancia, además, puede inducir la floración vegetal, pero a altos niveles de concentración pueden inducir un

mal desarrollo en la planta y posteriormente puede reducirse la transpiración vegetal por medio de la regulación de los estomas estableciendo un equilibrio osmótico, lo que lleva a un nivel de turgencia impar a nivel celular. Dicho ácido es sintetizado principalmente en los tejidos jóvenes como el endodermo de las plantas madre y algunos tejidos de las semillas vegetales como la testa (*Alcántara Cortés, J.S. et al. 2019*).

#### *2.2.5. Ácido salicílico*

Es una fitohormona que permite mejorar y potenciar el crecimiento de la floración vegetal. Tiene la capacidad de incrementar la longevidad floral y puede adoptar un papel inhibitorio en la síntesis del etileno. Dicha fitohormona, puede tener un efecto sinérgico cuando se combina con otras fitohormonas, como las auxinas y giberelinas. Poseen una función en el control y protección de procesos de estrés, ya que pueden inducir una mejor tolerancia a la germinación en ambientes con bajas temperaturas, así como mejorar la capacidad de resistencia en ambientes con alta salinidad o sequía. También tiene una gran importancia en el control de la actividad fotosintética y la conductividad de los estomas en presencia de un estrés biótico como la sequía (*Alcántara Cortés, J.S. et al. 2019*).

#### *2.2.6. Poliaminas*

Son un tipo de feromonas involucradas en la elongación y desarrollo de la raíz. Son sustancias de bajo peso molecular y son sintetizadas en el sistema radicular vegetal. Algunas plantas pueden producir 3 tipos diferentes de poliaminas (Poliaminas libres, Poliaminas solubles conjugadas y Poliaminas insolubles unidas), dependiendo de la especie vegetal. Son importantes en el desarrollo del sistema radicular primario, lateral y adventicio por lo que se les atribuye una actividad específica en la formación estructural de la raíz. Tiene la capacidad de controlar y regular los factores dependientes del desarrollo radicular (crecimiento de ejes radiculares, aparición de raíces laterales y dirección y elongación del sistema radicular). Existen dos tipos de interacción de estas hormonas, una de tipo endógeno (limita el desarrollo vegetal) y otra de tipo exógeno (estimula el desarrollo vegetal), pero su efecto puede variar en función de las interacciones ambientales. Estudios realizados anteriormente nos dicen que la disminución de los niveles de poliaminas se relaciona con el envejecimiento y

la senescencia vegetal mientras que la acumulación de diferentes poliaminas libres se ve asociada con el crecimiento del tejido y la organogénesis (Alcántara Cortés, J.S. et al. 2019).

#### 2.2.7. Ácido jasmónico y derivados

Su actividad metabólica se encuentra a nivel fisiológico en diferentes procesos a nivel de la planta, por lo que se cree que tiene un gran papel regulador en el crecimiento, desarrollo celular, desarrollo de órganos embrionarios, germinación de semillas, desarrollo de raíces y formación de semillas. Se sabe que el ácido jasmónico (JA), como los tubérculos, actúa tanto de forma inhibitoria como estimulante y es una de las pocas hormonas vegetales con la mayor actividad a nivel celular. La actividad biológica de los jasmonatos muestra que pueden inhibir la germinación y el crecimiento de raíces cuando sus concentraciones están por debajo de  $10^{-3}$  M. Además, inhibieron la germinación del polen y la formación de callos in vitro. Otros estudios han demostrado efectos estimulantes sobre el desarrollo de raíces en algunas variedades de papa; además, pueden inhibir la actividad transcripcional de los cloroplastos, la producción de clorofila y la recepción de luz. A nivel de planta, están presentes principalmente en órganos jóvenes de hojas, flores y frutos, con concentraciones menores en raíces, hojas viejas y hojas maduras. Por su parte, el JA tiene una de sus principales funciones en la regulación de la síntesis de proteínas, por lo que se puede decir que regula y controla la formación de la pared celular (Alcántara Cortés, J.S. et al. 2019).

El JA actúa en el control y regulación de la germinación de semillas. Además, tiene la capacidad de inhibir o retrasar la germinación. Esta fitohormona también es muy útil en la regulación de la senescencia celular, como en ciertos segmentos de la hoja, porque promueve la actividad proteolítica y la actividad enzimática de la peroxidasa, y puede estar involucrada en procesos de control de la respiración celular. La actividad del ácido jasmónico puede interferir con la regulación de los órganos reproductores masculinos y femeninos en las plantas. Además, pueden tener algún efecto sinérgico o antagónico con otros tipos de hormonas vegetales para potenciar o inhibir el desarrollo de procesos metabólicos, como el desarrollo de pétalos o la formación de estambres de plantas, y en cuanto a sus efectos sobre el sistema radicular, pueden

inhibir o promover el alargamiento de los rizomas de las plantas. En cuanto a la regulación de los factores de estrés, cuando están presentes patógenos de insectos o plantas que afectan el desarrollo celular, pueden mediar respuestas químicas relacionadas con la resistencia y aumentar su actividad al promover y activar la actividad enzimática y la reparación celular en caso de daño causado por factores externos (*Alcántara Cortés, J.S. et al. 2019*).

Finalmente, en la función inmunológica de las plantas, el ácido jasmónico tiene cuatro funciones (*Alcántara Cortés, J.S. et al. 2019*):

- a) Activa péptidos que forman mecanismos de barrera contra infecciones en la pared celular.
- b) Activación de enzimas que participan en la síntesis de fitolaxinas y componentes fenólicos.
- c) Pueden inducir la síntesis de inhibidores de la proteasa que protegen a las plantas de agentes entomológicos y fitopatógenos.
- d) Pueden inducir la producción de péptidos de azufre con actividad fungicida.

#### 2.2.8. *Brasinoesteroides*

Los brasinoesteroides son un tipo de polihidroxiesteroides de lactona con una estructura basada en brasinolida que comenzó a estudiarse a principios de la década de 1970. Dentro de la fisiología vegetal, desempeñan diferentes funciones, ya que están en la regulación de metabolismo y señalización vegetal, tienen por lo tanto diferentes efectos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas. Entre ellas, se encontraron varias funciones principalmente para controlar la elongación y división celular, el crecimiento de raíces, la regulación de la fotomorfogénesis, la diferenciación del sistema estomático y vascular, la germinación de semillas y la elongación del tallo de la planta, las cuales están relacionadas con el control de la inmunidad y la reproducción. Ellos, a su vez, pueden reducir en gran medida los cambios de estrés causados por factores bióticos y abióticos en el medio. Se sabe que la aplicación exógena de diferentes tipos de brasinoesteroides promueve la germinación de la semilla, el hipocótilo, el cotiledón, el crecimiento de la hoja, el alargamiento lateral de la raíz y la diferenciación del meristema apical (*Alcántara Cortés, J.S. et al. 2019*).

#### 2.2.9. Etileno

Esta fitohormona está involucrada en una gran variedad de procesos metabólicos a nivel de la planta, puede ser sintetizada naturalmente por diferentes especies de plantas y generalmente se produce en cualquier órgano de la planta. Como regulador vegetal, la sustancia tiene efectos sinérgicos y antagónicos cuando se usa en combinación con otras hormonas vegetales, ya que induce y mejora la aplicación de auxina, ácido abscísico y citoquininas durante la maduración y desarrollo de la hoja, mientras que otras hormonas como el ácido giberélico y el ácido jasmónico pueden inhibirse utilizando dicho regulador de crecimiento. En aplicaciones endógenas se puede observar que su actividad metabólica puede inducir reducción de ácidos nucleicos, degradación de proteínas, reducción de membrana celular, degradación de lípidos, peroxidación y descomposición de pigmentos en hojas al participar en el proceso de senescencia, e inducir desarrollo y maduración de los órganos sexuales en la etapa temprana de floración. Considerando el proceso por el cual necesita ser sintetizado a nivel celular, el aminoácido más importante para producirlo en el ambiente de la planta es la metionina, dados los procesos que requiere para ser sintetizado a nivel celular (*Alcántara Cortés, J.S. et al. 2019*).

#### 2.2.10. Estrigolactonas

Son biomoléculas con estructuras de lactona terpenoide derivadas de carotenoides que tienen la capacidad de aumentar el desarrollo de raíces primarias y adventicias, pero tienen ciertos tipos de funciones inhibitorias, como la inhibición de la formación de raíces laterales. Estas sustancias son esenciales en las respuestas adaptativas cuando el medio en el que se desarrolla el organismo vegetal es deficiente en fósforo y nitrógeno, por lo que tienden a mejorar mucho el desarrollo radicular. Pueden inducir la ramificación de las hifas ajustando la estructura de las yemas, promoviendo así la simbiosis con las micorrizas arbusculares, promoviendo así el desarrollo de las raíces. Estas sustancias también pueden tener un papel en el control del transporte de otras hormonas vegetales que actúan para inducir la formación de raíces, como la auxina. Asimismo, tienen la capacidad de inhibir la acción de las citoquininas, ya que su papel como mediadores del transporte de fitohormonas puede controlar el metabolismo en el desarrollo radicular. Estas fitohormonas se caracterizan por su gran potencial de enraizamiento junto con las auxinas, aumentando así el desarrollo de los cabellos

radiculares, la ramificación y el número de raíces adventicias producidas. También se pueden utilizar de forma exógena para aumentar la resistencia del medio a la sequía y la salinidad. Su papel en el control del flujo de fitohormonas ha generado un intenso interés en la biotecnología como una herramienta importante para el control del desarrollo de las raíces y para una mayor resistencia a los procesos de estrés y la regulación de la homeostasis (Alcántara Cortés, J.S. et al. 2019).

### **3. OBJETIVOS**

El objetivo principal de este trabajo es la realización de una búsqueda bibliográfica sobre métodos cromatográficos actuales para la determinación de reguladores de crecimiento vegetal.

Entre los objetivos específicos se encuentran:

- Manejo adecuado de las bases de datos para realizar la búsqueda de información y selección coherente de bibliografía.
- Capacidad de síntesis y de redacción de una revisión bibliográfica.
- Determinar la importancia de los reguladores de crecimiento vegetal y el papel de las fitohormonas en él.
- Evaluar los métodos analíticos utilizados en la actualidad para la detección de reguladores de crecimiento vegetal.

### **4. METODOLOGÍA**

Al tratarse de un trabajo de revisión bibliográfica se ha realizado una búsqueda exhaustiva en las siguientes bases de datos:

- Scopus
- Web of science
- Elsevier
- Google académico
- ScienceDirect
- SciFinder



Para realizar la búsqueda se utilizaron una serie de palabras clave tales como fitohormona, regulador de crecimiento vegetal, plantas, ácido jasmónico, brasinoesteroides, etileno, estrigolactonas, poliaminas, ácido salicílico, ácido abscísico, citoquininas, giberelinas, auxinas, cromatografía y espectrometría de masas.

Para recopilar una información lo más específica posible se ha optado por acceder a un amplio rango de búsquedas, en particular desde 1990 a 2022, siendo los más relevantes los de estos últimos años.

Los criterios de selección de artículos han sido bastante amplios, en los cuales ponderaba la utilización de varios métodos de determinación, lo que ha permitido una buena comparación.

La tabla 5.2 contiene detalles de algunos de los métodos más importantes utilizados para la preparación y determinación de fitohormonas.

## **5. DETERMINACIÓN DE FITOHORMONAS**

### **5.1. Métodos cromatográficos**

#### *5.1.1. Cromatografía de gases*

En cromatografía de gases los componentes de una muestra vaporizada se separan debido a que se reparten entre una fase estacionaria contenida en una columna (un sólido o un líquido inmovilizado sobre un soporte sólido o sobre las paredes de la columna) y una fase móvil gaseosa. Cuando la fase estacionaria es un líquido hablamos de cromatografía gas-líquido, y cuando la fase estacionaria es un sólido hablamos de cromatografía gas-sólido. Tras la separación, la muestra se vaporiza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. En dicha cromatografía la fase móvil no interactúa con las moléculas del analito, siendo su única función transportar este último a través de la columna (Skoog, D. et al. 2008).

La cromatografía de gases es un método analítico cuyo objetivo es la separación de sustancias volátiles y térmicamente estables. La principal limitación de esta técnica es la estabilidad térmica de los componentes de la mezcla o de la propia matriz, pero una

de las mayores ventajas que tiene esta técnica es que proporciona una buena resolución y sensibilidad elevada. El límite de temperatura cuando se trabaja con esta técnica ronda los 450 °C y este hecho limita a los solutos que pueden volatilizarse eficazmente en tales condiciones a sustancias con un peso molecular inferior a 1000 (Cela, R. et al. 2003).

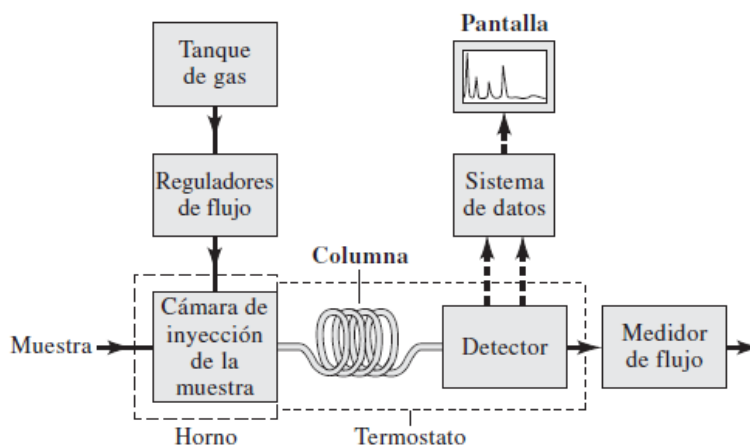


Figura 5.7 Diagrama de bloques de un cromatógrafo de gases típico.  
Fuente: (Skoog, D. et al. 2008).

Los componentes básicos de un cromatógrafo de gases son:

- Sistema de gas portador: En cromatografía de gases, a la fase móvil se denomina gas portador y debe ser químicamente inerte. El helio es el gas para fase móvil más común, pero también se usan argón, nitrógeno e hidrógeno (Skoog, D. et al. 2008).
- Sistema de inyección de la muestra: Con el fin de tener una alta eficiencia de la columna se requiere que la muestra sea de un tamaño adecuado y que se introduzca como un “tapón” de vapor; la inyección lenta o muestras demasiado grandes causan dispersión de las bandas y una mala resolución. En el caso de las columnas analíticas rellenas ordinarias, el tamaño de la muestra varía desde unas pocas décimas de microlitro a 20 µl. Las columnas capilares requieren muestras menores, en estos casos se emplea un sistema divisor de la muestra que permite entregar una pequeña fracción conocida de la muestra inyectada y el resto se desecha (Skoog, D. et al. 2008).

- Configuraciones de columna y hornos para la columna: En cromatografía de gases se utilizan dos tipos generales de columnas, las empacadas y las tubulares abiertas o capilares. Las columnas cromatográficas empacadas varían hasta 5 m de longitud, y las columnas capilares varían hasta 100 m. Están construidas con sílice fundida o con acero inoxidable, pero también se usa el vidrio o el Teflón. Con el fin de poder colocarse en el interior de un horno a temperatura controlada, se les da la forma de helicoides con diámetros de 10 a 30 cm. La columna se suele alojar dentro de un horno con temperatura controlada. La temperatura óptima de la columna depende del punto de ebullición de la muestra y del grado de separación requerido (Skoog, D. et al. 2008).



Figura 5.8 Columnas capilares de sílice fundida. Fuente: (Skoog, D. et al. 2008)

- Sistemas de detección: El detector ideal para cromatografía de gases debe de tener una sensibilidad adecuada, buena estabilidad y reproducibilidad, amplia respuesta lineal, intervalos de temperatura hasta los 400 °C, tiempo de respuesta corto, alta confiabilidad, manejo sencillo y selectividad (Skoog, D. et al. 2008).

#### 5.1.2. Cromatografía de líquidos

A la hora de elegir una técnica cromatográfica, para resolver una muestra determinada es necesario disponer de alguna información acerca de la muestra. Si la muestra no posee una fracción volátil se utiliza cromatografía líquida (Cela, R. et al. 2003).

La cromatografía de líquidos es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada, debido a su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su automatización y su capacidad para separar especies no volátiles o termolábiles (Skoog, D. et al. 2008).

Para las muestras que requieren de dicha cromatografía es importante la relación entre el tamaño de las moléculas del soluto y el tamaño de los poros del material cromatográfico para que la separación sea eficaz (Cela, R. et al. 2003).

#### 5.1.2.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

En la actualidad, toda la cromatografía de líquidos se efectúa con flujo presurizado y se utilizan las siglas LC o HPLC sin distinción (Cela, R. et al. 2003).

Con el objetivo de alcanzar flujos razonables con rellenos de tamaño de partícula de entre 3 y 10  $\mu\text{m}$ , se requieren presiones de bombeo de varios cientos de atmósferas. Debido a estas presiones elevadas, el equipo necesario para la cromatografía de líquidos de alta resolución tiende a ser más complejo y caro que el que se utiliza en otros tipos de cromatografía. En la figura 5.9 se muestra un esquema de los componentes fundamentales de un cromatógrafo de líquidos característico (Skoog, D. et al. 2008).

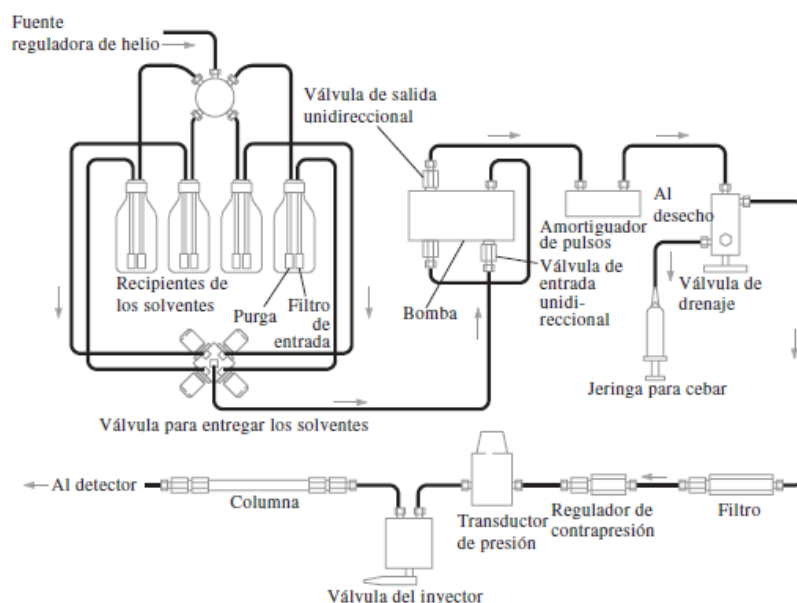


Figura 5.9 Diagrama de bloques que muestra los componentes de un cromatógrafo de líquidos característico de HPLC. Fuente: (Skoog, D. et al. 2008).

- **Sistemas de bombeo:** Entre los requisitos para las bombas en cromatografía de líquidos está 1) la generación de presiones de hasta 414 bares, 2) salida libre de pulsos, 3) tasas de flujo de 0.1 a 10 ml/min, 4) reproducibilidad del flujo de 0.5% relativo o mejor y 5) componentes resistentes a la corrosión a causa de la diversidad de disolventes. Debe destacarse que las presiones elevadas que generan las bombas de cromatografía de líquidos no constituyen un riesgo de explosión, porque los líquidos no son muy compresibles. Por tanto, la rotura de un componente del sistema solo supone una pérdida de disolvente (*Skoog, D. et al. 2008*).

- **Sistemas de inyección de muestra:** Los volúmenes de muestra que se emplean tienen que ser muy pequeños. El medio que más se usa para la introducción de las muestras en la cromatografía de líquidos se basa en los bucles de muestreo. Con frecuencia, estos dispositivos forman parte del equipo cromatográfico y hay bucles intercambiables que permiten la elección de tamaños de muestra desde 1 hasta 100  $\mu$ l o más. Con bucles de este tipo se puede introducir la muestra a presiones de hasta 483 bares con una desviación estándar relativa de unas décimas porcentuales (*Skoog, D. et al. 2008*).

- **Columnas para cromatografía de líquidos de alta resolución:** Las columnas para esta técnica se construyen con tubo de acero inoxidable de diámetro interno uniforme. Algunas ocasiones las columnas para cromatografía de líquidos de alta resolución se fabrican con tubos de vidrio de paredes resistentes o con polímeros como el polieteretercetona. También hay columnas de acero inoxidable cuyo interior está revestido con vidrio o polieteretercetona. La mayoría de las columnas para cromatografía de líquidos miden de 5 a 25 cm de largo. Normalmente se suelen utilizar columnas rectas, pudiéndose alargar a veces acoplando dos o más de ellas. El diámetro interior de las columnas analíticas es a menudo de 3 a 5 mm; los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son 3 o 5  $\mu$ m. Las columnas que más se utilizan miden de 10 a 15 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro interior y están rellenas con partículas de 5  $\mu$ m (*Skoog, D. et al. 2008*).

- **Tipos de rellenos de la columna:** En cromatografía de líquidos se utilizan dos tipos básicos de rellenos, pelicular y de partícula porosa. Las partículas peliculares

eran cuentas esféricas de vidrio o de polímero no porosas cuyos diámetros característicos eran de 30 a 40  $\mu\text{m}$ . En la superficie de estas se depositaba una fina capa porosa de sílice, de alúmina o de una resina sintética de poliestireno-divinilbenceno, o bien, una resina de intercambio iónico. Las micropartículas porosas reemplazaron por completo a las partículas peliculares. Los rellenos de partículas porosas característicos para cromatografía de líquidos están formados por micropartículas porosas cuyos diámetros varían entre 3 y 10  $\mu\text{m}$ , dichas partículas pueden ser de sílice, alúmina, resina sintética de poliestireno-divinilbenceno o resinas de intercambio iónico (Skoog, D. et al. 2008).

- Detectores: Los detectores de cromatografía de líquidos han sido instrumentos analíticos tradicionales adaptados con celdas de flujo para medir concentraciones bajas de solutos en flujos de líquidos, como absorbancia o fluorescencia. El problema principal en el mejoramiento de la cromatografía de líquidos es la adaptación y perfeccionamiento de dichos dispositivos (Skoog, D. et al. 2008).

- Detectores de absorción UV-visible: la mayoría de detectores de absorción son dispositivos de doble haz, en los que uno de ellos atraviesa la celda del eluyente y el otro es de referencia. Para comparar las intensidades de los dos haces se utilizan detectores fotoeléctricos contrastados. El cromatograma consiste en una gráfica de la absorbancia en función del tiempo (Skoog, D. et al. 2008).
- Detectores de fluorescencia: En la mayoría de ellos, la fluorescencia se detecta por medio de un transductor fotoeléctrico colocado a  $90^\circ$  respecto al haz de excitación. Una ventaja de los métodos de fluorescencia es su alta sensibilidad, que resulta ser mayor por más de un orden de magnitud que la mayoría de los procedimientos de absorción (Skoog, D. et al. 2008).

#### 5.1.2.2. Cromatografía de líquidos ultra rápida (UHPLC)

Se comenzó a utilizar sustituyendo a HPLC cuando se desarrolló una fase estacionaria de menos de 2 micras. Las nuevas partículas se fabricaron con la misma funcionalidad química que las fases estacionarias de HPLC comúnmente disponibles, lo que aseguró que la selectividad del sistema cromatográfico se mantuviera al usar la misma

fase móvil. Los beneficios de rendimiento significativos se obtuvieron mediante el aumento de la eficiencia. Hay muchas ventajas a tener en cuenta al migrar métodos de HPLC a un sistema UHPLC, incluidos tiempos de ejecución más cortos, mayor resolución cromatográfica, mayor sensibilidad y menor consumo de disolvente. Para utilizar las nuevas columnas UHPLC, es necesario utilizar una bomba que pueda funcionar a una presión más alta para acomodar la contrapresión aumentada ejercida por las partículas más pequeñas en la columna. La celda de flujo del detector también requiere una actualización para tener un volumen interno más pequeño que es necesario para detectar las bandas más estrechas de los componentes que se eluyen de la columna (*Edwards G. et al. 2021*).

## **5.2. Espectrometría de masas (MS)**

La MS ha cobrado una importancia cada vez mayor como método de detección y cuantificación en LC y UHPLC. El acoplamiento de un detector tan selectivo con una técnica tan versátil y de eficacias tan elevadas, hace que el acoplamiento LC-MS o UHPLC-MS sea una potente herramienta que presenta importantes perspectivas en diversos campos de investigación proporcionando una segunda dimensión en la separación, ya que los analitos además de separarse por su relación carga/tamaño son detectados por su relación masa/carga.

En el caso de la MS se requiere una muestra en fase gaseosa, y la salida de la columna de cromatografía de líquidos es un soluto disuelto en un disolvente. Como primer paso, el disolvente se tiene que convertir en vapor. Cuando está vaporizado, el disolvente de cromatografía de líquidos produce un volumen de gas que es de 10 a 1000 veces mayor que el gas portador en cromatografía de gases. Por consiguiente, la mayor parte del disolvente se tiene que eliminar. Se han desarrollado varios dispositivos para resolver los problemas del retiro del disolvente y de la interferencia de la columna de cromatografía de líquidos (*Skoog, D. et al. 2008*).

La combinación de cromatografía de líquidos de alta resolución y la espectrometría de masas genera una alta selectividad porque los picos no resueltos se pueden aislar al supervisar sólo una masa seleccionada. La técnica de LC-MS tiene la capacidad de

proporcionar huellas dactilares de un producto particular sometido a elución en lugar de confiar en el tiempo de retención como sucede en la HPLC ordinaria. La combinación también proporciona masa molecular, información estructural y análisis cuantitativo exacto (Skoog, D. et al. 2008).

Los sistemas de LC-MS ya son invariablemente computarizados. Mediante estos instrumentos se pueden obtener tanto cromatogramas de tiempo real como los reconstruidos mediante computadora y los espectros de los picos eluidos (Skoog, D. et al. 2008).

### **5.3. Metodología analítica para la determinación de fitohormonas**

#### *5.3.1. Ácido Jasmónico*

A 5 ml del caldo de fermentación obtenido por vía microbiana, utilizando cepas silvestres de *Botryodiplodia theobromae*, previamente filtrado y centrifugado, se le ajustó el pH a 3 con una disolución de HCl. Se realizó una extracción líquido- líquido con acetato de etilo y se evaporó el extracto hasta sequedad (Lorenzo, M. et al., 2005).

Para su determinación vía GC, se realizó una derivatización con diazometano. Con respecto a las condiciones en cromatografía de gases, la temperatura de la columna DB-1 (25 cm x 4.6 mm x 5 µm) fue a 190 °C en modo isotérmico y la temperatura del inyector y detector fue de 230 °C, con un caudal de gas portador de 30 ml/min (Ueda, J. et al., 1994). El resto de condiciones pueden consultarse en la Tabla 5.2.

El modo de separación isotérmico permitió la separación de los jasmonatos a línea base con un tiempo de análisis de 12 min, con una buena resolución entre los picos, siendo el detector utilizado de UV (230 nm) (Ueda, J. et al., 1994).



### 5.3.2. Ácido Abscísico

Para la extracción del ácido abscísico en muestras de *Gerbera Jamesonii* se empleó una extracción sólido líquido. En resumen, tal y como vemos en la tabla 5.2, se utilizaron 0.2 g de hojas liofilizadas, las cuales fueron sumergidas en 10 ml de una disolución extractante compuesta por acetona: ácido acético 0.2 M 70:30 (v/v), 100 mg/ml de 2,6 di-t-butil 4-metilfenol y 20 mg/ml de ascorbato de sodio durante 16 horas a 4 °C a oscuras mediante agitación continua.

El extracto se centrifugó durante 16 min y se filtró con papel. Se procedió a una segunda extracción del residuo con 2.5 ml de la disolución extractante previamente comentada y se centrifugó otra vez a la misma velocidad durante 5 min. El extracto se filtró y se recogió la fase líquida. Se evaporó la acetona con corriente de nitrógeno a 35 °C. Se ajustó el pH de la fase acuosa a 8.5 con una disolución de bicarbonato sódico semisaturada y se procedió a la extracción de los pigmentos con 3 x 15 ml de acetato de etilo. La fase orgánica fue descartada y el pH de la disolución se ajustó a 2.5 con ácido sulfúrico 1N (*Olivella C. et al., 2001*).

Mediante extracción en fase sólida, la disolución se introdujo en un cartucho de C18, previamente acondicionada con 3 ml de metanol y 3 ml de HCl 1N. El ácido abscísico fue eluido con 2 x 3 ml de éter etílico recogido sobre agua. La fase etérea fue extraída y seguidamente evaporada con corriente de nitrógeno a 35 °C. El residuo sólido se recuperó con 0.1 ml de metanol y la hormona se metiló con 0.6 ml de diazometano. Los derivados metilados fueron llevados a sequedad con una corriente de nitrógeno 35 °C. Los residuos sólidos fueron resuspendidos en 0.5 ml de tampón fosfato y 0.1 ml fueron utilizados para la determinación (*Olivella C. et al., 2001*).

Para su análisis cromatográfico, se tomaron 70 µL, y después de pasarlos a través de un filtro de nailon de 0.2 µm de tamaño de poro, se inyectaron en un equipo de HPLC. La columna utilizada tenía unas dimensiones de 15 cm de longitud y 0.4 cm de diámetro, con una fase móvil de metanol-acético y una fase estacionaria de octadecilsilil (ODS-2), de 3 µm de tamaño de partícula. La elución de las hormonas se realizó con un caudal de 0.4 ml/min (*Olivella C. et al., 2001*).

Los resultados obtenidos mostraron una gran variabilidad. Esto pudo atribuirse parcialmente al procedimiento analítico y a la variabilidad de las hojas. Por otro lado, no se encontraron cambios significativos en los niveles de ácido abscísico en hojas de diferente edad (*Olivella C. et al., 2001*).

### 5.3.3. Poliaminas

Como puede observarse en la tabla 5.2 las poliaminas fueron extraídas de la matriz a través de una extracción sólido líquido. Para ello un gramo de *Stevia rebaudiana* en polvo en un tubo de 20 ml y se extrajo mediante agitación vortex durante 10 min a temperatura ambiente con 10 ml de acetonitrilo/agua 80:20 (v/v). Posteriormente, el tubo se centrifugó durante 5 min y una parte del sobrenadante se filtró (*Cacciola F. et al. 2010*).

La separación se realizó mediante la técnica LC × LC (dicha técnica es de tipo bidimensional, se acoplan dos HPLC que tienen dos columnas distintas con diferentes mecanismos de separación). La separación en la primera dimensión se logró utilizando una columna de PA-G (250 m x 1 mm, 5 µm). Se observó que el perfil de elución de la separación en la primera dimensión y los tiempos de retención dependían en gran medida del pH exacto de la fase móvil, probablemente como consecuencia de las interacciones de intercambio aniónico que afectan a la ionización de los compuestos débilmente ácidos. Ambos disolventes se prepararon diariamente y el pH se ajustó cuidadosamente a 3. Durante cada ciclo de modulación de 20 s, a la velocidad de flujo de la separación en la primera dimensión de 20 µl/min, se transfirieron 6.7 µl de eluyente desde la separación en la primera dimensión a la separación en la segunda dimensión. En esta separación se utilizaron bucles colectores de 20 µl. La separación en la segunda dimensión se logró utilizando una columna de C18 (30 mm x 2.1 mm, 1.8 µm) mantenida a 70 °C, con un caudal de 30.4 ml/min. El tiempo de modulación LC × LC fue de 20 s. Todos los análisis se realizaron por triplicado, empleando para ambos casos un detector UV (*Cacciola F. et al. 2010*).

#### 5.3.4. Giberelinas

Se seleccionaron semillas de maíz (*Zea mays L.*) sin daños visibles y con forma uniforme, las cuales tuvieran una masa promedio de 0.3878 g (*Rivera, J. D. et al. 2017*). Como podemos ver en la tabla 5.2, a cada caja se le adicionaron 12 ml de agua destilada y se colocaron en una incubadora sin luz, a una temperatura de 30 °C. Después de 48 horas, las semillas se sacaron de la incubadora y fueron trituradas en un molino eléctrico, hasta obtener un polvo muy fino que se guardó en bolsa de sello hermético y en un congelador a -20 °C para su posterior extracción (*Rivera, J. D. et al. 2017*).

Para la extracción de la giberelina se empleó una técnica de extracción dinámica con disolvente asistida, en la cual se utilizó como disolvente acetonitrilo – ácido fórmico 5% (80:20, (v/v)). La celda de extracción se llenó con 0.8 g de muestra y se colocó en el interior de un baño ultrasonido al cual se le controló la temperatura del agua para que no fuera superior a 35 °C. Posteriormente el sistema se conectó a una bomba peristáltica para controlar el flujo del disolvente a través de la celda, siendo este de 0.4 ml/min; la extracción se realizó por un tiempo 25 min., al final del cual se obtuvo un volumen de 10 ml del extracto (*Rivera, J. D. et al. 2017*).

El análisis se realizó en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC), empleando una columna C18 (150 x 4.6 mm. de diámetro) con un tamaño de partícula de 5 µm (*Rivera, J. D. et al. 2017*).

Para identificar la presencia del ácido giberélico en las muestras se realizaron comparaciones entre el tiempo de retención de la muestra y del estándar, se hicieron dopados de la muestra, se determinó la pureza espectral de pico y se realizaron análisis por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPL-CMS), utilizando un detector de trampa iónica (*Rivera, J. D. et al. 2017*).

### 5.3.5. Auxinas

Para la preparación de la muestra B Juncea (L) se compraron semillas de mostaza que fueron aleatoriamente seleccionadas y sembradas en suelo húmedo. Después de 10 días, plantas similares de B Juncea (L) Czern fueron seleccionadas y transportadas en cajas. El experimento se llevó a cabo desde enero a marzo de 2019 durante 35 días con muestras de B Juncea (L). Se recolectaron muestras de Czern de 30 plantas seleccionadas al azar. Como vemos en la tabla 5.2 para el tratamiento de muestra, las hojas se lavaron con agua del grifo para eliminar la suciedad y suelo, después fueron congeladas con nitrógeno líquido y posteriormente almacenadas a 4 °C en un congelador hasta su análisis (Lea, V. N. et al. 2021).

Los tejidos se molieron y aproximadamente 300 mg de cada muestra se pesó y se transfirió a tubos de 15 ml. Alrededor de 3000 µl de disolución de 2-propanol/agua/HCl concentrado (2:1:0.002, (v/v)) se añadió como disolvente de extracción. Después las muestras que se encontraban a 4 °C se agitaron durante 30 min (Lea, V. N. et al. 2021).

Posteriormente, se añadieron 6000 µl de diclorometano, seguido de agitación durante otros 30 min a 4 °C, centrifugándose durante 10 min. Se formaron dos fases tras la centrifugación, con residuos vegetales ubicados en la interfase. Aproximadamente 1 ml de la capa inferior se volvió a disolver en 1 ml de metanol. Finalmente, se agitó en un vórtex y se centrifugó a 4 °C durante 10 min; el sobrenadante se inyectó en la columna y fue analizado por LC-MS (Lea, V. N. et al. 2021).

Con respecto a las condiciones de LC, se utilizó un sistema equipado con una columna de C18 (150 mm x 2.1 mm, 3 µm). Las muestras se mantuvieron a 8 °C en la bandeja del automuestreador y la temperatura de la columna se mantuvo a 40 °C. Tanto el agua como el disolvente (metanol) fueron utilizados como fase móvil A y B, con un caudal constante de 0.1 ml/min. El programa de gradiente total fue por lo tanto de 15 min de duración (Lea, V. N. et al. 2021).

Por otro lado, la MS, para la confirmación y cuantificación de las hormonas endógenas de la planta y sus principales metabolitos. Previamente al análisis cromatográfico, se

realizó un diagnóstico para seleccionar los iones precursor y producto en los modos de ionización negativa y positiva, utilizando unas soluciones estándar (1 ng/μl) de hormonas vegetales que se infundieron en el espectrómetro de masas empleando un detector de trampa de iones y utilizando una jeringa de 500 μL a un caudal de 5 μl/min. El método mostró una buena linealidad y una sensibilidad adecuada para detectar estos compuestos en las muestras estudiadas (Lea, V. N. et al. 2021).

#### 5.3.6. Citoquininas

Se cultivaron plántulas de tomate tipo salvaje (WT) *Solanum lycopersicum* (L). Las placas Petri se incubaron verticalmente en la oscuridad a 22 °C durante 3 días. Las plantas etioladas se irradiaron con luz azul durante un máximo de 120 min.

En la tabla 5.2 podemos ver que, para el análisis de la respuesta de citoquinina, las plántulas germinadas se transfirieron a medio un suplementado con 0, 1, 5 o 10 μM de isopenteniladenina. Las plantas se cultivaron en la oscuridad durante 3 días más. Posteriormente, la zona de elongación del hipocótilo (tallo de la planta) se extirpó bajo luz verde para la extracción de ARN y la expresión génica. Las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta que se procedió (Hloušková, P., et al. 2019).

Se obtuvieron líneas de tomate TFT6. Estas líneas silenciadas se caracterizaron por parámetros de crecimiento reducidos, incluidos la altura, el número de hojas y el peso seco (Hloušková, P., et al. 2019).

La identificación se realizó mediante LC-MS. La separación se llevo a cabo en una columna de C18 (150 mm x 4.6 mm, 5 μm). Los péptidos se eluyeron hasta 120 min con un gradiente de acetonitrilo del 4% al 40. Los resultados fueron integrados, y las diferencias cuantitativas fueron evaluadas mediante el cálculo de números normalizados de coincidencias espectrales de péptidos dirigido en réplicas experimentales a través de un análisis basado en el monitoreo de reacciones seleccionadas. Solo se consideraron para el análisis las proteínas que tenían al menos

un péptido proteotípico detectable. El detector empleado para la MS, fue un detector de trampa de iones (*Hloušková, P., et al. 2019*).

#### 5.3.7. *Brasinoesteroides*

Las raíces y las hojas de sorgo liofilizadas se homogeneizaron utilizando una combinación de perlas de acero inoxidable redondas. Todo el tejido foliar homogeneizado de cada muestra se combinó y se mezcló a fondo. Se prepararon tres réplicas analíticas añadiendo una porción de 19-21 mg del tejido foliar liofilizado a un vial de vidrio de 2 ml. Las fitohormonas se extrajeron añadiendo 1 ml de una disolución de metil-terbutil-éter (MTBE) que contenía 6:3:1 MTBE/metanol/agua (v/v/v) y se agitó a 4° C durante 60 minutos (Tabla 5.2). A continuación, los viales de vidrio se centrifugaron durante 15 minutos. Una alícuota de 400 µl de la extracción se transfirió a un nuevo vial de vidrio de 2 ml, se secó bajo nitrógeno, se resuspendió en 100 µl de metanol y se almacenó a -80° C hasta el análisis de LC-MS (*Shefflin, A. M. et al., 2019*). Para su análisis, se inyectaron 3 µl de extracto. Se utilizó una columna C18 (100 mm x 1 mm, 1.8 µm) para la separación cromatográfica. La fase móvil A consistió en agua con 0,1% de ácido fórmico y la fase móvil B fue 100% acetonitrilo. La columna se reequilibró durante 4.5 minutos para un tiempo total de ejecución de 12 minutos. El caudal se ajustó a 120 µl/min y la temperatura de la columna se mantuvo a 45 °C. Las muestras se mantuvieron a 6 °C en el automuestreador. La detección se realizó en un espectrómetro de masas, empleando un detector de trampa de iones (*Shefflin, A. M. et al., 2019*).

#### 5.3.8. *Estrigolactonas*

Se pesaron 25 mg de arroz molido y se transfirió a un vial de vidrio de 8 ml. Se preparó una disolución de metanol con 2,6 di-t-butil 4-metilfenol al 0.1% (P/V). Se vuelve a disolver el extracto de apocarotenoides (APO) con 120 µl de ACN acuoso al 90% (v/v) y se agita en vórtex durante 10 segundos. Seguidamente se filtra la disolución de muestra utilizando un filtro de 0,2 µm en un vial de vidrio ambar de 1.5 ml, dichos viales se mantienen a 4 °C (*Mi, J. et al., 2022*).

Como se indica en la tabla 5.2 se empleó un equipo UHPLC-MS. La separación fue llevada a cabo en una columna de C18 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 µm) y se empleó un modo gradiente. La fase móvil consistió en una mezcla agua-acetonitrilo (80:20, (v/v)) y una mezcla de acetonitrilo-isopropanol (60:40, (v/v)). La temperatura de la columna se fijó en 35 °C y el caudal fue de 0.2 ml/min. Se analizaron los apocarotenoides utilizando un espectrómetro de masas en modo de ionización positiva (electrospray). Finalmente, se identificaron los apocarotenoides utilizando datos de MS de alta resolución y se compararon con los estándares de APO sintéticos, cuantificándose los APO utilizando el método de estándar interno. Se empleó una trampa de iones como MS (*Mi, J. et al., 2022*).

| Compuestos determinados | Muestra         | Peso o volumen de las muestras analizadas | Tratamiento de muestra                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Determinación        | Fase móvil                                       | Referencia               |
|-------------------------|-----------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|--------------------------------------------------|--------------------------|
| Auxinas                 | Brassica Juncea | 300 mg                                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Lavado con agua del grifo.</li> <li>· Congelado con nitrógeno.</li> <li>· Almacenado a 4 °C.</li> <li>· Triturado de tejidos con mortero.</li> <li>· Pesada de 300 mg/muestra.</li> <li>· Tranferencia a tubos de 15 ml con tapa de rosca.</li> <li>· Adición del disolvente de extracción.</li> <li>· Agitación a 4 °C durante 30 min.</li> <li>· Centrifugar 10 min.</li> <li>· Concentrar fase inferior con un evaporador de nitrógeno 1 h.</li> <li>· Disolución en 1 ml de MeOH.</li> <li>· Agitar en vórtex.</li> <li>· Centrifugar.</li> </ul> | LC-MS<br>Columna C18 | Propanol-Agua-HCl concentrado (2:1:0.002, (v/v)) | (Lea, V. N. et al. 2021) |



|                        |                          |          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                        |                                              |                                |
|------------------------|--------------------------|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------|
| <b>Giberelinas</b>     | Zea mays L.              | 0.3878 g | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Colocación en placas Petri.</li> <li>· Adición de agua destilada.</li> <li>· Incubadora sin luz 48 h</li> <li>· Triturado.</li> <li>· Congelado a -20 °C.</li> </ul>                                                                                                  | HPLC-MS<br>Columna C18                 | Acetonitrilo-Ácido fórmico 5% (80:20, (v/v)) | (Rivera, J. D. et al. 2017)    |
| <b>Citoquininas</b>    | Solanum lycopersicum (L) |          | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Congelado con nitrógeno líquido.</li> <li>· Almacenaje a -80 °C.</li> <li>· Adición de isopenteniladenina.</li> <li>· Cultivo 3 días más en oscuridad.</li> <li>· Extirpación bajo luz verde para extracción de ARN</li> <li>· Liofilización de las hojas.</li> </ul> | LC-MS<br>Columna C18                   | Ácido fórmico 0.5%-Acetonitrilo 5%           | (Hloušková, Petra et al. 2019) |
| <b>Ácido Abscísico</b> | Gerbera Jamesonii        | 0.2 g    | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Extracción mediante acetona/acético.</li> <li>· Agitación continua 16 h a 4 °C.</li> <li>· Segunda extracción mediante acetona/acético.</li> <li>· Centrifugación.</li> <li>· Filtrado</li> <li>· Evaporación de la acetona con nitrógeno.</li> </ul>                 | HPLC<br>Columna Octadecilsilil (ODS-2) | Acetona-Acético (70:30, (v/v))               | (Olivella C. et al., 2001)     |

|                          |                           |          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                            |                                         |                                |
|--------------------------|---------------------------|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------|
|                          |                           |          | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Ajuste de pH</li> <li>· Extracción de pigmentos con acetato de etilo.</li> <li>· Extracción en fase sólida.</li> <li>· Recuperación del residuo con metanol.</li> <li>· Metilación con diazometano.</li> <li>· Secado con corriente de nitrógeno a 35 °C.</li> </ul> |                            |                                         |                                |
| <b>Poliaminas</b>        | Stevia rebaudiana         | 1 g      | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Extracción mediante acetonitrilo/agua.</li> <li>· Centrifugación.</li> <li>· Filtrado a través de membrana.</li> <li>· Filtrado.</li> </ul>                                                                                                                          | LC x LC<br>Columnas C18    | Acetonitrilo-Agua (80:20, (v/v))        | (Cacciola F. et al. 2010)      |
| <b>Ácido Jasmónico</b>   | Botryodiplodia theobromae | 5 ml     | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Centrifugado.</li> <li>· Ajuste de pH a 3.</li> <li>· Extracción líquido-líquido.</li> <li>· Rotavapor</li> </ul>                                                                                                                                                    | GC<br>Columna capilar DB-1 | Helio                                   | (Lorenzo, M. et al., 2005)     |
| <b>Brasinoesteroides</b> | Hoja de sorgo             | 19-21 mg | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Extracción de fitohormonas con metil-butyl-eter.</li> <li>· Centrifugado.</li> <li>· Extracción de una alícuota de 400 µl.</li> <li>· Secado con nitrógeno.</li> </ul>                                                                                               | LC-MS<br>Columna C18       | Agua-Ácido fórmico 0.1 % y Acetonitrilo | (Shefflin, A. M. et al., 2019) |

|                        |                                        |       |                                                                                                                                                                                                             |                         |                                                                                     |                               |
|------------------------|----------------------------------------|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
|                        |                                        |       | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Resuspensión en 100 µl de metanol.</li> </ul>                                                                                                                      |                         |                                                                                     |                               |
| <b>Estrigolactonas</b> | Raíces de <i>Oryza sativa</i> en polvo | 25 mg | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Trasladar la muestra a un vial de vidrio ámbar de 8 ml.</li> <li>· Preparar la solución de apocarotenoides.</li> <li>· Preparar 50 ml de ACN acuso 90%.</li> </ul> | UHPLC-MS<br>Columna C18 | Agua-Acetonitrilo (80:20, (v/v)) y Acetonitrilo-Alcohol isopropílico (60:40, (v/v)) | (Mi, J. <i>et al.</i> , 2022) |

Tabla 5.2 Diferentes métodos cromatográficos para detectar hormonas

## 6. CONCLUSIONES

En base a la búsqueda bibliográfica realizada, se puede extraer como conclusión:

- La mayoría de fitohormonas pueden ser detectadas mediante métodos cromatográficos, tanto por cromatografía de líquidos como por cromatografía de gases.
- Los detectores empleados en cromatografía son de detectores de UV o de espectrometría de masas.
- Los detectores empleados en espectrometría de masas en la mayoría de los casos son detectores de trampa de iones.
- Los métodos más utilizados son la combinación de cromatografía-líquida con espectrometría de masas.
- Las columnas cromatográficas utilizadas son en la mayoría de los métodos de C18.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Alcántara Cortes, J. S.; Jovanna A. G.; Alcántara Cortés J. D.; Sánchez Mora, R. M. (2019). *Main hormonal regulators and their interactions in plant growth*.
- Cacciola, F.; Delmonte, P.; Jaworska, K.; Dugo, P.; Mondello, L.; Rader, J. I. (2010). *Journal of Chromatography A*.
- Cela, R.; Lorenzo, R. A.; Casais, M. C. (2003). *Técnicas de separación en Química analítica*, 296-433.
- Skoog, D.; Holler, J.; Crouch, S.R. (2008). *Principios de análisis instrumental*, 788-828.
- Edwars, G. (2017), *Cromatografía líquida, incluidas HPLC, UHPLC y LCxLC*.
- Hlouškováa, P.; Černýb, M.; Kořínkováa, N.; Luklováb, M.; Gómez Minguetc, E.; Brzobohatýb, B.; Galuszkaa, P.; Bergougnotx, V.; (2019). *Affinity chromatography revealed interactome of tomato (Solanum lycopersicum L.) during blue light-induced de-etiolation. Journal of Proteomics*, Vol. 193.
- Lea, V. N.; Trung Nguyena, Q.; Tung Nguyena, N.; Giang Le, T.; Jandac, T.; Szalai, G.; Rui, Y. (2021). *Simultaneous determination of plant endogenous*

*hormones in green mustard by liquid chromatography – Tandem mass spectrometry. Chinese Journal of Analytical Chemistry.*

- León E. (2011). *Biología II Enfoque por competencias*, 190-202.
- Lorenzo, M.; González, J.; Castillo, G.; Redondo, D.; Michelena, G. (2005). *Opciones para la determinación de Ácido Jasmónico estimulador del crecimiento vegetal por dos métodos cromatográficos*. Revista Cubana de Química, Vol. 17, núm. 1, 289.
- Meshram, J. H.; Waghmare, V.N. (2022). *Plant Growth Regulator*.
- Mi, J.; Liew, K. X.; Al-Babili, S. (2022). *Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Analysis of Carotenoid-Derived Hormones and Apocarotenoids in Plants*.
- Olivella, C.; Vendrell, M.; Savé, R. (2001). *Determinación de Ácido Abscísico, Ácido Indolacético, Zeatina y Ribósido de zeatina en hojas desarrolladas de Gerbera Jamesonii CV. Bolus y su variación con la edad*. Investigación agraria. Producción y protección vegetales, Vol. 16, 335-336.
- Rivera, J. D.; Milena Correa, Y.; Marcela Ocampo, D. (2017). *Estandarización de un método cromatográfico para la identificación del ácido giberélico en semillas de maíz (Zea mays L.)*, Ciencia en Desarrollo, Vol. 8, núm. 2, 51-60.
- Sheflin, A. M.; Kirkwood, J. S.; Wolfe, L. M.; Jahn, C. E.; Broeckling, C. D.; Schachtman, D. P.; Prenni, J. E. (2019). *High-throughput quantitative analysis of phytohormones in sorghum leaf and root tissue by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry*.
- Ueda, J., Miyamoto, K.; Kamisaka, S. (1994). *Separation of a New Type of Plant Growth Regulator, Jasmonates by chromatographic procedures*. Journal of Chromatography A. 658, 129-142



