

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS



CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Evaluación de la actividad fitorreguladora de auxinas obtenidas a partir de un extracto de tallos de fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en cultivos de plantas in vitro.

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previa la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Autor: Álvaro Chrystiam Díaz Sisalema

Tutor: Ph.D. Orestes Darío López Hernández

Ambato – Ecuador

Marzo – 2018

APROBACIÓN DEL TUTOR

Ph.D. Orestes Darío López Hernández

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 16 de enero de 2018



Ph.D. Orestes Darío López Hernández

C.I. 1754784864

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Álvaro Chrystiam Díaz Sisalema, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



Álvaro Chrystiam Díaz Sisalema

C.I. 1804750576

AUTOR

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

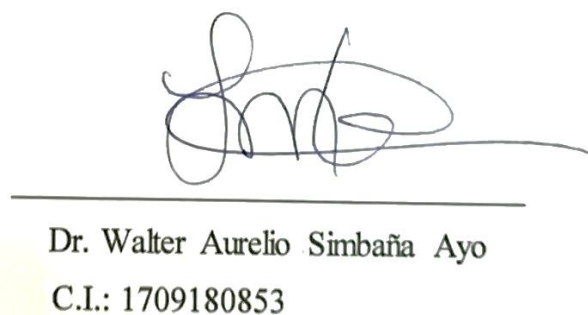
Para constancia firman:



Presidente del Tribunal



MSc. Wilson Patricio Orozco Freire
C.I.: 1721363008



Dr. Walter Aurelio Simbaña Ayo
C.I.: 1709180853

Ambato, 27 de febrero de 2018

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Álvaro Díaz', is written over a horizontal line. The signature is stylized and somewhat illegible due to the cursive nature of the writing.

Álvaro Chrystiam Díaz Sisalema

C.I. 1804750576

AUTOR

DEDICATORIA

“El Señor te bendiga y te guarde; el Señor te mire con agrado y te extienda su amor; el Señor te muestre su favor y te conceda la paz”.

Números 6:24-26

Todo esfuerzo trae su recompensa, aunque en el camino haya adversidades siempre habrá quien te motive a seguir adelante. Cada persona que llega a tu vida te ayuda ya sea para bien o para mal y aprendes algo de cada uno adquiriendo fortalezas que te ayudaran en la vida.

Mientras seamos libres para soñar debemos hacerlo porque muchas veces el perseguir nuestros sueños nos ayudan a crecer y a obtener lo que anhela nuestro corazón.

Siempre debemos llevar en nuestra mente los bellos momentos que vivimos con aquellas personas que amamos porque al final son los recuerdos felices los que nos darán alegría cuando más tristes estemos.

Recordar con amor y nostalgia aquellos momentos felices que te regaló la persona que amas no implica que la hayas perdido u olvidado solo que está siempre presente en tu corazón, aunque no la tengas entre tus brazos.

Para Dios primeramente por darme la sabiduría y entendimiento, así como la fuerza para salir adelante en medio de adversidades; a mi madre por su apoyo incondicional y por siempre estar ahí brindándome sus consejos y forjando en mi vida valores morales y cristianos; a mi padre por darme la vida, y a todos aquellos que me ayudaron con un granito de arena de corazón gracias por su amor y apoyo incondicional.

Los amo a todos

Álvaro

AGRADECIMIENTOS

Al Dios de los cielos y la tierra por derramar sus bendiciones día tras día y permitirme terminar una de mis metas. Me ha fortalecido cada día y ha puesto en mí la sabiduría de lo alto para superar cada escalón y obstáculo presentes a lo largo de mi carrera.

A mi madre Dolores Sisalema por su ayuda incondicional. Por guiarme hacia el camino del bien hasta llegar a cumplir mi sueño, por todo lo que hizo durante este largo trayecto, por sacrificarse días enteros por darme lo mejor, y sobre todo, por su amor el cual es sincero y me lo brinda sin esperar nada a cambio. Todo lo que soy te lo debo a ti, gracias por todo lo que he recibido.

A mi padre Manuel Díaz que a pesar de no estar junto a mí me ha ayudado en lo que estaba a su alcance. A mis hermanos Julio, Margot, Verónica, Raquel, Santiago, Dina y Jéssica por ayudarme de una u otra forma durante todo este camino sin ustedes no lo habría logrado. Gracias por que cada uno con palabras y acciones me ayudaron para seguir con más fuerzas cada día.

A todas las personas, amigos y compañeros que estuvieron junto a mí dentro y fuera de las aulas de clase. Gracias por brindarme incontables momentos de felicidad, así como momentos de disgustos los cuales nos ayudaron para fomentar losos de amistad y seguir adelante. A Lourdes Yuquilema y Vanessa Mera por ser las mejores amigas que he conocido gracias por sus palabras de apoyo cuando me sentía desanimado. A Cristina Quipe por ser la mujer que cautivo mi corazón gracias por llegar a mi vida y ser después de Dios y mi familia lo más importante para mí.

Al Ph.D. Orestes López gracias por haber aceptado ser quien me ayude a realizar este proyecto, por brindarme su amistad y ser quien me guie a culminar con éxito mi carrera.

A todos los docentes que me instruyeron y generaron en mi esa sed de investigación.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

PÁGINAS PRELIMINARES

Portada.....	i
Aprobación del tutor	ii
Declaración de autenticidad	iii
Aprobación del tribunal de grado	iv
Derechos de autor	v
Dedicatoria	vi
Agradecimientos	vii
Índice general de contenidos.....	viii
Resumen.....	xiii
Abstract.....	xiv
Introducción	1

TEXTO

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1 Tema de Investigación	4
1.2 Justificación.....	4
1.3 Objetivos	7
1.3.1 Objetivo general.....	7
1.3.2 Objetivos específicos	7

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes investigativos	8
2.2 Hipótesis	11

2.2.1	Efecto de la relación material vegetal/disolvente (MV/D) y método de extracción sobre el rendimiento de extracción líquida de sólidos totales (SST) y auxinas presentes en tallos de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	11
2.2.2	Evaluación de la actividad fitorreguladora de las auxinas del extracto de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. en el crecimiento <i>in vitro</i> de tallos de mora.	12
2.3	Señalamiento de variables de la hipótesis	12
2.3.1	Análisis del proceso de extracción de sólidos solubles totales (SST) y auxinas de los tallos de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	12
2.3.2	Evaluación del efecto fitorregulador de las auxinas del extracto líquido de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. sobre el crecimiento de tallos de mora sin espinas en cultivos <i>in vitro</i>	12

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1	Materiales	13
3.1.1	Material de vidrio y plástico	13
3.1.2	Reactivos	13
3.1.3	Equipos.....	14
3.2.2	Procesamiento del material vegetal.....	15
3.2.3	Diseño experimental	16
3.2.4	Estudio de las condiciones de extracción a escala de laboratorio	17
3.2.4.1	Proceso de extracción.....	17
3.2.4.1.1	Extracción asistida por ultrasonido	17
3.2.4.2	Determinación de sólidos solubles totales (SST).....	18
3.2.4.3	Análisis estadístico	18
3.2.4.4	Obtención del extracto líquido a mayor escala	19
3.2.4.4.1	Purificación y aislamiento del extracto concentrado	20

3.2.4.4.2	Detección y cuantificación de auxinas en el extracto	21
3.2.5	Evaluación de la actividad fitoregulatora de auxinas en cultivos vegetales <i>in vitro</i>	23
3.2.5.1	Preparación del medio de cultivo con el extracto obtenido	23
3.2.5.2	Cultivo de plantas <i>in vitro</i> y evaluación del crecimiento de tallos de mora variedad sin espinas	24

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	Análisis y discusión de los resultados	25
4.1.1	Preparación del material vegetal (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	25
4.1.2	Determinación del mejor tratamiento para la extracción a escala de laboratorio.....	26
4.1.3	Determinación de sólidos solubles totales en el extracto concentrado	30
4.1.4	Detección de auxinas por el método de Salkowsky.....	31
4.1.5	Cuantificación de auxinas por método espectrofotométrico	33
4.1.6	Evaluación <i>in vitro</i> de las auxinas extraídas	33
4.2	Verificación de hipótesis	34

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1	Conclusiones	36
5.2	Recomendaciones	38

MATERIALES DE REFERENCIA

Bibliografía.....	39
-------------------	----

Anexos.....	50
-------------	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diseño Experimental para extracciones a escala de laboratorio	16
Tabla 2. Etapas del procesamiento de la materia vegetal.....	25
Tabla 3. Rendimiento del proceso de extracción con cada tratamiento	26
Tabla 4. Análisis de varianza para el rendimiento de extracción de auxinas	27
Tabla 5. Optimización de la Respuesta Experimental.....	28
Tabla 6. Sólidos totales en el extracto madre y concentrado	31
Tabla 7. Crecimiento de los explantes de tallos de mora	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fuente de auxinas en la planta.	9
Figura 2. Localización del punto de recolección del material vegetal.	15
Figura 3. Procesamiento del material vegetal previo al proceso de maceración.....	15
Figura 4. Proceso de maceración.....	17
Figura 5. Obtencion a mayor escala del extracto rico en auxinas	19
Figura 6. Filtracion del extracto concentrado.....	20
Figura 7. Evaporacion del disolvente en el extracto concenrado	21
Figura 8. Curva estándar de acudo indol acético	22
Figura 9. Aplicación del reactivo de Salkowsky a la muestra del extracto de auxina.	23
Figura 10. Diagrama de Pareto de Efectos Incidentes en el experimento	28
Figura 11. Efectos Principales para la extracción	29
Figura 12. Superficie de respuesta de las interacciones de los tratamientos experimentales.....	30

Figura 13. Detección de auxinas empleando el reactivo de Salkowsky como indicador	32
Figura 14. Evaluación de la actividad fitorreguladora de auxinas presentes en el extracto de tallos de fréjol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	35

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Solución de Salkowsky.....	50
Anexo 2. Estándares para la curva de calibración de AIA	50
Anexo 3. Separación de los residuos vegetales y el extracto líquido con sólidos extraídos	50
Anexo 4. Determinación de sólidos totales usando balanza de humedad	51
Anexo 5. Concentración de la solución madre empleando un rotaevaporador	51
Anexo 6. Extracto líquido concentrado al 23,93 %	52
Anexo 7. Sólidos encapsulados con gel de sílica para facilitar la purificación del extracto	52
Anexo 8. Separación de sólidos contaminantes en el extracto rico en auxinas	53

RESUMEN

Las auxinas son un grupo de hormonas vegetales que regulan diversos procesos en el desarrollo y crecimiento de la planta, siendo ampliamente usadas en protocolos de propagación *in vitro* de material vegetal. En este trabajo se evaluó el potencial fitorregulador de auxinas obtenidas a partir de un extracto líquido de tallos de fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.). La eficiencia de la extracción fue del 49,46 % con el proceso de maceración en frío obteniendo 4,94 g de sólidos extraídos. El extracto madre concentrado al 23,93 % de sólidos presentó una concentración de $40,57 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ de auxinas cuantificados mediante el método de Salkowsky a 540 nm. La actividad fitorreguladora se evaluó en un ensayo *in vitro* mediante oxidación y crecimiento de tallos de mora variedad sin espinas en medio de cultivo de multiplicación modificado. Se comparó con el medio de cultivo preparado con hormonas sintéticas, obteniendo un mayor índice de oxidación en los tallos de mora al usar el extracto de auxinas debido a que están disueltas en alcohol etílico, sin embargo, aumentaron el crecimiento del tallo en un 4,34 % más en comparación a los tallos crecidos con hormonas sintéticas.

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris*, auxinas, ácido-3-indol acético, cultivos vegetales *in vitro*, biotecnología vegetal, cuantificación de fitohormonas.

ABSTRACT

Auxins are a group of plant hormones that regulate various processes in the development and growth of the plant, being widely used in protocols of *in vitro* propagation of plant material. In this work, the phyto regulatory potential of auxins obtained from a liquid extract of stems of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) was evaluated. The extraction efficiency was 49,46 % with the cold maceration process obtaining 4,94 g of extracted solids. The concentrated mother extract at 23,93 % solids showed a concentration of $40.57 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ of auxins quantified by the Salkowsky method at 540 nm. The phyto regulatory activity was evaluated in an *in vitro* assay by oxidation and growth of mullet stems without spines in modified growth media. It was compared with the culture medium prepared with synthetic hormones, obtaining a higher rate of oxidation in the blackberry stems when using the extract of auxins because they are dissolved in ethyl alcohol, however, they increased the growth of the stem in a 4,34 % more compared to stems grown with synthetic hormones.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*, auxins, indole-3-acetic acid, *in vitro* plant cultures, plant biotechnology, quantification of phytohormones.

INTRODUCCIÓN

El fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es nativo del continente Americano. No obstante, hoy en día se cultiva ampliamente en países de Asia y África, así como en regiones de América Latina, Medio Oriente, China, Europa, Estados Unidos y Canadá. De todos estos países Latinoamérica es el productor por excelencia (FAO, 1992; Beebe et al., 2008). Se lo considera el más importante para el consumo a nivel mundial ya que se produce en una amplia gama de sistemas y ambientes de cultivos en todo el mundo en condiciones favorables o no y usando un mínimo de insumos (Jones, 1999; Rodríguez et al., 2016).

En todo el territorio ecuatoriano se cultiva fréjol, sin embargo, la region sierra es la mayor productora (FAO, 2001). Igualmente, por ser la legumbre de mayor consumo, se la considera de subsistencia y se siembra en mayor cantidad por ser calificada como una fuente de alimentación no solo humana sino animal (Carrasco & Toro, 2003). El fréjol no sólo se constituye en una fuente de proteínas y carbohidratos para la población, sino que también aporta una cantidad relativamente adecuada de vitaminas y minerales (Guzmán-Maldonado et al., 1996; Rao, 2001). Adicionalmente, contiene una serie de metabolitos secundarios como taninos, antocianinas, compuestos fenólicos y fibra (Guzmán-Maldonado et al., 1996; De Mejía et al., 2003), entre otros.

Curtis & Barnes (2008) señalan que todas las plantas en general no solo requieren de agua y nutrientes del suelo para su crecimiento, sino también demandan, al igual que otros seres vivos, hormonas se desplazan a través de los fluidos para que se lleve a cabo un crecimiento armónico.

Campbell et al. (2001) indican cinco tipos de hormonas vegetales, de los cuales tres tienen una estructura y función similar. Estas son: las auxinas, citoquininas y giberelinas que actúan como impulsores del crecimiento. También existen hormonas encargadas de inhibir este proceso metabólico. Dichas sustancias incluyen: las morfotinas y poliaminas que a su vez conjuntamente con el etileno brindan resistencia a la planta ante los ataques de agentes patógenos.

Las auxinas comprenden una gran familia de sustancias que intervienen en diversos procesos biológicos tales como el crecimiento y diferenciación celular. Tienen en común la capacidad de producir un alargamiento y agrandamiento celular en los tallos en desarrollo (Roca & Mroginski, 2007).

González et al. (2004) indican que existen varios tipos de auxinas las cuales pueden ser naturales como el ácido indol-3-acético (AIA) que es la más utilizada o sintéticas como el ácido naftalacético (ANA). Sin embargo, existen auxinas naturales empleadas en menor cantidad como la indol-3-carboxialdehído, indol-3-acetaldehído, indol-3-acetamida entre otras (Roca & Mroginski, 2007). El AIA se produce en los ápices de los tallos, meristemas y hojas jóvenes de yemas terminales y desde estos puntos se transportan al resto de la planta; mientras que ANA es la hormona que se encarga del enraizamiento de la planta, crecimiento del fruto y decoloración de las hojas (González et al., 2004).

Para la extracción de metabolitos vegetales (p. e. fitohormonas, aceites esenciales, polifenoles, etc.) se encuentran diversos métodos. Uno de ellos es la extracción asistida por ultrasonidos, técnica muy usada en la actualidad por diferentes ramas de la ciencia (Martínez, 2014). Esta técnica tiene la capacidad de extraer compuestos activos, sabores o especias de diferente material vegetal porque genera disruptes en las células vegetales y mejora la transferencia de masa logrando una extracción en menor tiempo y más eficaz con un mayor rendimiento (Hielscher, 2016).

Por otro lado la maceración es un método tradicional de extracción sólido-líquido. Aquí, la sustancia sólida que se va a emplear es rica en compuestos solubles en el líquido o disolvente que se va a usar para el proceso. Se obtienen dos productos que se pueden usar independientemente: el extracto con sustancias químicas de interés y el residuo sólido libre de ciertas sustancias disueltas en el disolvente (López, 2008).

Como menciona I solve (2000) la biotecnología vegetal se basa en la utilización de plantas para la producción de bienes y servicios, enfocando su campo de acción directamente sobre la producción primaria de alimentos y en el posterior

procesamiento y conservación de los mismos relacionándose íntimamente a la agricultura y horticultura.

Los métodos convencionales (injertos y cultivo por estacas) usados para mejorar el crecimiento de plantas se basan en la selección por fenotipos de los individuos de interés por alguna propiedad que los distinguen de otros (Alvarez, 2011). Según la FAO (2003), existen una serie de técnicas de gran potencial que son capaces de complementar las prácticas de mejoramiento convencionales, siendo el cultivo de tejidos, una de ellas ya que permite propagar el material vegetal en tubos de ensayo para protegerlo de agentes patógenos que puedan causar enfermedades

El cultivo de tejidos o propagación *in vitro* (del latín en vidrio) es una técnica que consiste en sembrar un explante que posea un potencial alto de diferenciación (totipotencia celular). Comprende la siembra de material celular en completa asepsia en condiciones adecuadas de nutrientes y factores ambientales como temperatura y humedad (Abdelnour-Esquivel & Vincent, 2006).

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1 Tema de Investigación

Evaluación de la actividad fitorreguladora de auxinas obtenidas a partir de un extracto de tallos de fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en cultivos de plantas *in vitro*.

1.2 Justificación

Según datos de las Naciones Unidas se estima que la población mundial se incrementará en un 16.44 % para el año 2030 (ONU, 2015). Esto sugiere la búsqueda de nuevas alternativas de cultivo vegetal que garanticen una calidad y cantidad adecuadas de los principales rubros agrícolas (p. e. el cultivo de soja, trigo, maíz y arroz; Jaffe, 2002) para satisfacer la creciente demanda y así cuidar la seguridad alimentaria.

Los métodos convencionales de cultivo tales como el de estacas, acodos y surcos, que se emplean desde la antigüedad, presentan ciertas limitaciones para resolver el problema de la demanda del consumidor (Alfonso & Monedero, 2004; Enriquez, 2007). Su principal desventaja es la limitación del número de plantas que se pueden llegar a producir por hectárea (Pilatti, 2007). Asimismo, la siembra de plantas de manera tradicional no garantiza que los productos estén libres de patógenos o enfermedades debido a que son susceptibles al ataque de microorganismos que se encuentran sobre todo tipo de superficies (Montañez, 2013).

La biotecnología ofrece como alternativa varios métodos diferentes al tradicional para el cultivo de plantas, debido al desarrollo de ciertas técnicas basadas en las ciencias de la biología molecular, manipulación genética y cultivo de tejidos vegetales (Duque, 2010). Dichas técnicas permiten a los fitomejoradores producir fácilmente una gran cantidad de plantas mejoradas con mayor resistencia a las plagas y enfermedades brindando además una tolerancia al estrés climático (Miles et al., 2008).

El cultivo de tejidos vegetales se utiliza para obtener plantas enteras *in vitro* a partir de células individuales consiguiendo así, tantas como se desee en un periodo corto de tiempo y en un espacio reducido (Raven et al., 2002). Los principales métodos para el cultivo de tejidos son la regeneración a partir de callos, protoplastos y embriogénesis somática (Arias, 2005).

El cultivo de tejidos se basa en el conocimiento generado acerca de las hormonas vegetales y su función reguladora en el desarrollo, ya que de estas sustancias dependerá la adaptación de la planta al medio que las rodea (Roca & Mroginski, 2007). Estas hormonas tienen funciones específicas. Así por ejemplo, las auxinas intervienen en el alargamiento de los tallos en desarrollo, aunque también actúan en menor cantidad en el crecimiento de la raíz y en el fruto de la planta (Raven et al., 2002).

Durante su desarrollo, las plantas a más de realizar una etapa fotosintética o tomar minerales del suelo, llevan a cabo varios procesos fisiológicos que deben ser coordinados para que favorezcan su crecimiento (el crecimiento de las raíces y tallo, la floración, la fructificación, la caída de hojas, producción de hormonas y cambios en el entorno de la planta) (Celis & Gallardo, 2008).

Un proceso fisiológico muy importante es la síntesis de reguladores de crecimiento, fitohormonas u hormonas vegetales que son sustancias orgánicas capaces de afectar el metabolismo y el crecimiento celular (García & Flores, 2004). La función principal de la fitohormona es intervenir en el alargamiento de los tallos en desarrollo, en el crecimiento de la raíz y en el fruto de la planta (Raven et al., 2002). Existen varias fitohormonas tales como: las auxinas, citoxiaminas, las giberelinas, el etileno y el ácido abscísico, entre otras. Todas regulan el desarrollo de la planta y de ellas dependerá la adaptación de las mismas al medio que las rodea (Roca & Mroginski, 2007) y se desenvuelva.

En la actualidad la auxina es conocida por ser la primera fitohormona estudiada (Pimienta et al., 2006) y por su alto potencial en la agricultura (Celis & Gallardo, 2008). Desempeñan un rol fundamental en prácticamente en todos los aspectos de la morfogénesis de las plantas (Omelyanchuk et al., 2017), incluso en la regulación de la

expresión de los genes que dan origen a las giberelinas (Gómez & García, 2006). Debido a la importancia que tienen las auxinas en el desarrollo de las plantas, es evidente que se requiere un método sencillo para su detección ya sea en extractos vegetales o en cultivos microbianos.

La utilización de fitohormonas naturales presenta una serie de ventajas frente a las sintéticas. Así por ejemplo, se destacan el costo de la obtención, ya que al ser menos procesadas y obtenidas por métodos artesanales, se reduce significativamente la inversión. Además, al ser extraídas de ciertas partes de la planta ricas en fitohormonas, como por ejemplo de los tallos, se pueden obtener en la concentración que se encuentran en la naturaleza, siendo ideal para el crecimiento de la planta (Roca & Mroginski, 2007).

A pesar de que existen métodos químico-analíticos, es de suma importancia una técnica que sea de bajo costo, sencilla y que arroje una alta eficiencia en la detección de auxinas. Previos estudios alusivos a este tema y citados en Celis & Gallardo (2008), muestran la identificación de auxinas en cultivos microbianos empleando HPLC. Otros métodos cromatográficos (p. e. espectrofotometría y cromatografía de capa fina) bien pueden ser usados para la detección de la presencia de auxinas en extractos de tallos de fréjol.

El fréjol representa la leguminosa alimentaria de mayor importancia de uso directo y consumo a nivel mundial (Jones, 1999; Rodríguez et al., 2016) porque puede ser cultivado en diversos sistemas y ecosistemas (Jones, 1999), haciendo que sea de fácil acceso y esté disponible a un bajo costo. Considerando las tendencias de crecimiento de la población mundial, se prevé que su consumo aumente (Belluci et al., 2014).

En el Ecuador se cultivan principalmente en la región Sierra y constituyen una fuente de proteínas, ácido fólico, fibra dietética y carbohidratos (FAO, 2001). Por otro lado, el fréjol silvestre de origen Mesoamericano y de posterior expansión independiente hacia América del Sur, ha dado lugar a dos piscinas de genes silvestres en los Andes (Bitocchi et al., 2012; Desidero et al., 2013). El primer gen presente en el fréjol silvestre de Ecuador y al norte de Perú (Rodríguez et al., 2016), se caracteriza por un

almacenamiento específico de proteínas en las semillas, faseolina tipo I ('Inca'), no presente en el otro gen (Kami et al., 1995); y el otro más al sur de Perú, Bolivia y Argentina (Kami et al., 1995; Bitocchi et al., 2012).

A pesar de ser un alimento muy consumido no es aprovechado al máximo. Una vez cosechado el producto el material vegetal sobrante (tallos) es desechado. Estos residuos pueden generar un beneficio extra al productor tomando en cuenta que los tallos de las plantas en general son ricos en hormonas (Curtis & Barnes, 2008). Bajo este contexto, empleando técnicas como la extracción sólido-líquido, se puede obtener dichas sustancias para evaluar su viabilidad y desarrollar investigaciones que faciliten el desarrollo de la agricultura y de la biotecnología especialmente en la propagación *in vitro* de tejido vegetal aprovechando, de este modo, los beneficios que generan el uso de las auxinas.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

- Evaluar la actividad fitorreguladora de auxinas obtenidas en un extracto de fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en cultivos de plantas *in vitro*.

1.3.2 Objetivos específicos

- Obtener un extracto rico en auxinas aplicando las tecnologías de extracción asistida por ultrasonidos y maceración en frío.
- Determinar el efecto que tiene la aplicación del extracto rico en auxinas en la etapa de micropropagación de tallos de mora *in vitro*.
- Comparar la eficiencia de los dos métodos propuestos para la extracción de auxinas.
- Promover un método de extracción y detección de auxinas que sea eficaz y sencillo para su aplicación industrial.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes investigativos

Actualmente la propagación empleando métodos *in vitro* ha ido creciendo en todo el mundo y su objetivo principal es obtener plantas más sanas y en menor tiempo de producción (Roca & Mroginski, 2007). Este método de cultivo vegetal permite ejercer un control sobre los procesos morfogénéticos, fisiológicos y bioquímicos que se llevan a cabo en la planta (Abdelnour-Esquivel & Vincent, 2006).

En numerosos laboratorios de Europa y en países de América Latina como Colombia, Perú y Argentina se utilizan estas técnicas para multiplicar plantas ya sean ornamentales o frutales en mayor cantidad. Sin embargo, se requieren condiciones específicas así como nutrientes y fitorreguladores para producir plantas sanas y resistentes (Roca & Mroginski, 2007). Dichos reguladores vegetales juegan un papel importante ya que de ellos dependen la adaptación de las planta al medio que los rodea

Santner & Estelle (2009) y Taiz & Zeiger (2010), mencionan que las hormonas vegetales o fitohormonas son un grupo de compuestos especializados y diferenciados que regulan la mayoría de los procesos metabólicos de las plantas y sus máximos representantes son las auxinas. Estas hormonas se han convertido en las más estudiadas desde que fueron descubiertas y se las considera las más importantes por las funciones que cumplen (Fogaca & Fett-Neto, 2011). Aparte de esto, son ampliamente usadas en la preparación de medios de cultivo para tejidos vegetales debido a su papel en la formación de raíces, elongación del tallo, etc. (Pop et al., 2011).

Curtis & Barnes (2008) señalan, que los tallos de las plantas en general son ricos en auxinas siempre y cuando no se corte el meristemo apical. Si esto sucede la planta dejaría de producir auxinas reprimiendo el crecimiento de las yemas axilares. La Fig. 2a muestra que, mientras mayor es la distancia entre el ápice y la yema axilar la

concentración de auxina disminuye. En el lado opuesto, la Fig. 2b ilustra un corte en el meristemo apical eliminándose la producción de auxina.

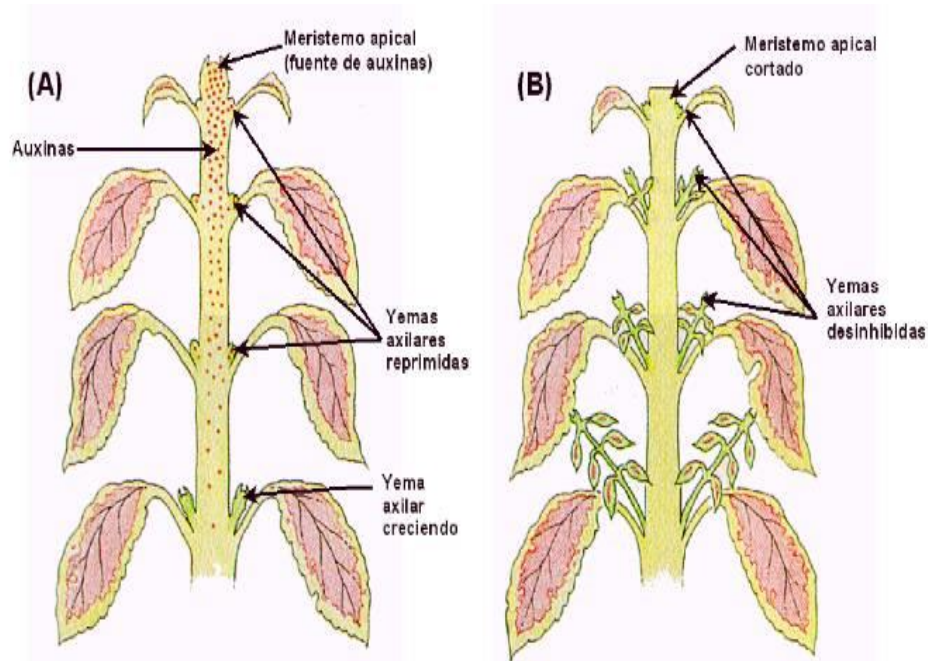


Figura 1. Fuente de auxinas en la planta. En el gráfico A los puntos rojos indican fuentes ricas en auxinas, mientras que, en el gráfico B debido al corte en el meristemo apical no se produce auxinas para el resto del tallo. **Fuente:** Curtis & Barnes (2008).

Basándose en lo señalado por Curtis & Barnes (2008), se han realizado diversos estudios en los cuales se extrajo auxinas partiendo de tallos de plantas. Itamar & García (2016), señalan que las fitohormonas por ser sustancias endógenas bioactivas tienen una gran importancia para los agricultores ya que permiten mejorar su calidad visual (tamaño, compacidad, ramificación y color), su calidad fisiológica (resistencia al estrés, salida del reposo, mejora la post-cosecha) y el desarrollo de nuevos productos menos contaminados. Por estas ventajas que traen el uso de auxinas se ha optado por usar auxinas naturales para el fitomejoramiento tanto en laboratorios *in vitro* como en la agricultura convencional (García & Rivera, 2016).

Pese a que el fréjol crece en casi todos los ambientes del mundo, no se han realizado estudios previos para la obtención de fitoreguladores de esta planta. La importancia de la extracción de hormonas vegetales de tallos de plantas, radica en que se usa la mayor cantidad de material vegetal para la industria en lugar de desperdiciarla. García &

Rivera (2016), extrajeron hormonas potenciadoras del crecimiento a partir de tallos de mango. Las hormonas extraídas se las puede aplicar directamente en las plantas ya que al ser naturales son más fácilmente asimilables por las plantas. En la naturaleza, la síntesis de auxinas no se limita solo a las plantas, sino que también a ciertos microorganismos como rizobacterias que crean un impulso en el crecimiento, desarrollo y adaptación de las plantas (Celis & Gallardo, 2008).

Porfirio et al. (2015), determinan que para obtener auxinas de los tallos de plantas se debe establecer un protocolo analítico de extracción en el cual se use un método adecuado tomando en cuenta que las muestras vegetales están en forma sólida y que los analitos extraídos deben estar en una fase líquida para facilitar la purificación y determinar la concentración. Las auxinas son ligeramente solubles en agua y altamente solubles en disolventes orgánicos (metanol, etanol, acetona, éter dietílico y dimetilsulfóxido), es por esto que Machakova et al. (2008), señala que la extracción de estas hormonas vegetales usando un disolvente adecuado garantiza la obtención de la máxima cantidad de dicha fitohormona y una mínima cantidad de otros metabolitos secundarios (p.e. aceites esenciales y polifenoles).

Debido a que se han generalizado protocolos de propagación y estudios fisiológicos de tejidos vegetales en los cuales se requieren fitoreguladores (auxinas, giberelinas y otros) Porfirio et al. (2015) y Celis & Gallardo (2008), plantean métodos de obtención de auxinas tales como extracción a partir de partes de plantas y síntesis microbiana. A su vez Yan et al. (2012), han desarrollado métodos analíticos (p. e. cromatografía de capa fina, cromatografía líquida de alta resolución fluorescencia) para la detección y cuantificación de estas hormonas, con los cuales, se puede llevar a cabo una cuantificación mucho más precisa de los niveles de auxinas presentes en las plantas.

Para extraer auxinas presentes en los tallos de las plantas existen métodos convencionales y no convencionales. Dentro de los primeros está la maceración y destilación, mientras que los segundos está la exposición a baños de ultrasonido y extracción asistida por microondas (Hu et al., 2011).

Llaudy & Canals (2007), indican que se utilizan métodos de maceración cuando la planta contiene principios activos que pueden perderse o modificarse si se exponen a temperaturas altas o a su vez si el disolvente a usar provoca el mismo efecto. En la maceración de la plantas debe usarse un disolvente específico para evitar que el principio activo que se requiere extraer sufra alteraciones. Además, se utiliza recipientes que se cierren herméticamente y dependiendo del tipo de planta se debe agitar al menos una vez al día por 30-50 segundos (Lee et al., 2008; Pan et al., 2010).

La extracción sólido-líquido empleando ultrasonidos es un método relativamente nuevo pero eficaz. De Corta (2013), señala que la extracción asistida por un baño ultrasónico permite superar la lenta extracción, la baja reproductibilidad de la extracción sólido-líquido usando métodos convencionales y es una extracción rápida y económica ya que se han demostrado resultados similares al usar otras técnicas como la extracción asistida por microondas.

En estudios realizados por Cui et al. (2015), las hormonas vegetales extraídas fueron cuantificadas bajo técnicas cromatográficas como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) e ionización por electrospray. La identificación de las mismas se ha logrado usando espectrofotometría de masas y espectrofotometría simple ya que permite la identificación de grupos funcionales específicos mediante el cambio de coloración con un indicador específico (Chiwocha & Abrams, 2003).

2.2 Hipótesis

2.2.1 Efecto de la relación material vegetal/disolvente (MV/D) y método de extracción sobre el rendimiento de extracción líquida de sólidos totales (SST) y auxinas presentes en tallos de *Phaseolus vulgaris* L.

Hipótesis Nula

La relación (MV/D) y el método de extracción no afectan el rendimiento de extracción de SST y auxinas presentes en tallos de *Phaseolus vulgaris* L.

Hipótesis Alternativa

La relación (MV/D) y el método de extracción afectan el rendimiento de extracción de SST y auxinas presentes en tallos de *Phaseolus vulgaris* L.

2.2.2 Evaluación de la actividad fitorreguladora de las auxinas del extracto de *Phaseolus vulgaris* L. en el crecimiento *in vitro* de tallos de mora.

Hipótesis Nula

Las auxinas del extracto de *Phaseolus vulgaris* L. no presentan actividad fitorreguladora en el crecimiento *in vitro* de tallos de mora.

Hipótesis Alternativa

Las auxinas del extracto de *Phaseolus vulgaris* L. presentan actividad fitorreguladora en el crecimiento *in vitro* de tallos de mora.

2.3 Señalamiento de variables de la hipótesis

2.3.1 Análisis del proceso de extracción de sólidos solubles totales (SST) y auxinas de los tallos de *Phaseolus vulgaris* L.

- Evaluación de la relación material vegetal/disolvente (MV/D).
- Evaluación del método de extracción.
- Producción de un extracto líquido de color verde con contenido auxínico.

2.3.2 Evaluación del efecto fitorregulador de las auxinas del extracto líquido de *Phaseolus vulgaris* L. sobre el crecimiento de tallos de mora sin espinas en cultivos *in vitro*.

- Cuantificación de tallos de mora sin espinas crecidos con el extracto obtenido rico en auxinas.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Material de vidrio y plástico

- Vasos de precipitación de 50, 100, 250 y 1000 ml (Boro 3,3; Pyrex $\pm 0,05$).
- Matraces de 50, 250, 500 y 1000 ml (Boro 3,3 $\pm 0,05$).
- Probetas graduadas de 10, 50 y 100 ml (Boro 3,3 $\pm 0,05$).
- Pipetas graduadas de 5 y 10 ml ($\pm 0,05$).
- Micropipetas de 100, 200 y 1000 μl (CYANPipettes)
- Balones de aforo de 100 ml ($\pm 0,01$).
- Tubos de ensayo (Boro 3,3; Pyrex).
- Tubos eppendorf.
- Tubos de microcentrifuga eppendorf de 1,5 y 2 ml.
- Embudo.
- Lienzo.

3.1.2 Reactivos

Para el proceso de extracción:

- Alcohol etílico al 96%

Para el proceso de purificación:

- Ácido acético al 5% (Sigma).
- Gel de sílice.
- Ácido cítrico.
- Fosfato de sodio (Sigma)

- Buffer fosfato de pH 4.

Para la determinación de la concentración de auxinas:

- Solución al 37% de ácido perclórico (Sigma).
- Solución 0,5 M de cloruro férrico.
- Ácido indol acético (Sigma).

Para la evaluación fitorreguladora:

- Medios de propagación *in vitro* de tallos de mora sin espinas.

3.1.3 Equipos

- Balanza Analítica (AE ADAM PGL 12001)
- Balanzas de Humedad (CITIZEN MB200 y KERN MLS 50-3).
- Rotaevaporador (IKA HB10 50-3).
- Espectrofotómetro UV-VIS (SPECTRONIC INSTRUMENTS).
- Cámara de flujo laminar (Streamline EN1822.1)
- Baño de ultrasonido (BRANSON 2800).
- Plancha de calentamiento (IKA C-MAG HS7)
- Refrigerador.

3.2 Métodos

3.2.1 Recolección de la materia prima

Se recolectó 2 kg de plantas de fréjol en bolsas de plástico con agujeros para evitar que los tallos se marchiten por la falta de oxígeno. El producto es originario de la parroquia Atahualpa de la ciudad de Ambato (Coordenadas -1.196140 S; -78.598116 N).

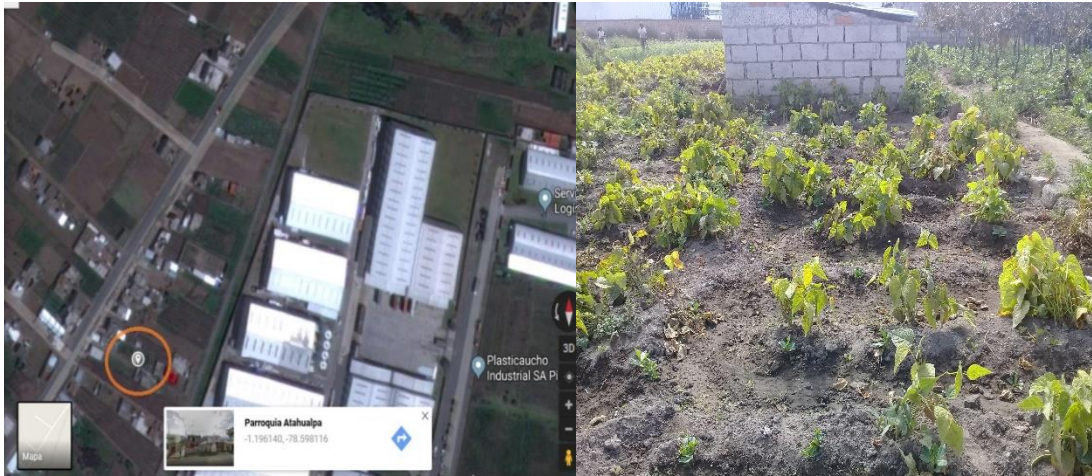


Figura 2. Localización del punto de recolección del material vegetal. Fotografía y mapa Google Earth.

3.2.2 Procesamiento del material vegetal

Una vez recolectados los tallos de fréjol, se eliminó el material vegetal que no se usó (hojas y raíces). Posteriormente, los tallos fueron lavados con agua y detergente para retirar impurezas. Subsecuentemente, fueron sometidos a dos lavados sucesivos con agua corriente. Con la ayuda de un bisturí se procedió a cortar en trozos pequeños de 3 cm aproximadamente (Fig. 3) para proceder al proceso de extracción por ultrasonido y maceración en frío.



Figura 3. Procesamiento del material vegetal previo al proceso de maceración. El material vegetal (tallos de fréjol) fue cortado para facilitar la actuación del disolvente.

3.2.3 Diseño experimental

Para la obtención del extracto rico en auxinas a escala de laboratorio se realizó un diseño de bloques con arreglo factorial 2^2 con tres réplicas, y cuyo modelo matemático es: $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i \beta_j + \alpha\beta_{ij} + u_{ijk}$. Los factores fueron los siguientes:

- **Factor A:** Relación material vegetal/disolvente (alcohol etílico al 96%).

Niveles:

- A₁: 1:10
- A₂: 1:15

- **Factor B:** Método de extracción.

Niveles:

- B₁: Maceración en frío
- B₂: Baño de ultrasonido

Respuesta experimental: Rendimiento del proceso de extracción

Tabla 1. Diseño Experimental para extracciones a escala de laboratorio.

Tratamiento	Factor A	Factor B	Detalle
1	-	-	1:10 - maceración
2	+	-	1:15 - maceración
3	-	+	1:10 - ultrasonido
4	+	+	1:15 - ultrasonido

Nota: Diseño factorial 2^2 , Factor A: Relación material vegetal/disolvente (alcohol etílico al 96%), Factor B: Método de extracción, Respuesta experimental: Rendimiento del proceso de extracción.

3.2.4 Estudio de las condiciones de extracción a escala de laboratorio

3.2.4.1 Proceso de extracción

Para la extracción de las fitohormonas por maceración en frío se colocó 10 g de tallos de fréjol y 100 ml de alcohol etílico al 96 % en un matraz de 250 ml de capacidad para la relación 1:10. Por su parte, para la relación 1:15 se colocó 10 g en 150 ml del mismo disolvente (según los tratamientos especificados en la Tabla 1). Se dejó macerar por 21 días en un refrigerador a 10 °C. El recipiente se selló con papel aluminio para evitar que exista pérdida de disolvente (Fig. 4) por volatilidad. Una vez transcurrido el tiempo de maceración los extractos se filtraron empleando un embudo de vidrio y un lienzo registrando el volumen final del extracto y posterior almacenamiento a 10 °C.



Figura 4. Proceso de maceración. Este proceso se llevó a cabo bajo agitación cada dos días para homogenizar la muestra con el disolvente y aumentar la superficie de contacto

3.2.4.1.1 Extracción asistida por ultrasonido

La extracción asistida por ultrasonido se llevó a cabo usando 10 g de material vegetal en 100 ml de disolvente (relación 1:10) y 10 g de la materia prima en 150 ml de disolvente (relación 1:15). Posteriormente, las dos muestras fueron expuestas al baño ultrasónico BRANSON 2800 durante 10 minutos. Por último, al finalizar la exposición al baño de ultrasonido se prosiguió a filtrar usando un embudo de vidrio y un lienzo

para retener sólidos relativamente grandes. Se registró el volumen final y se amaceno a 10 °C tapando con papel aluminio para que no se volatilice el solvente.

3.2.4.2 Determinación de sólidos solubles totales (SST)

El porcentaje de sólidos solubles totales (SST) de cada tratamiento realizado se determinó usando balanzas de humedad (CITIZEN MB200 y KERN MLS 50-3). Con el porcentaje de humedad obtenido en cada muestra se calculó el porcentaje de sólidos extraídos empleando la Ecuación 1

$$\% \text{ SST} = 100\% - \% \text{ humedad}$$

[Ec. 1]

La masa de sólidos extraídos con cada uno de los tratamientos se obtuvo con la siguiente formula:

$$\text{Sólidos extraídos (g)} = \text{Volumen del extracto} * \frac{\% \text{ SST}}{100}$$

[Ec. 2]

(Susleby et al., 2011)

El rendimiento del proceso de extracción se lo realizó en base a los sólidos extraídos con la formula siguiente:

$$\% \text{ rendimiento de extracción} = \frac{\text{sólidos extraídos}}{\text{peso inicial de la muestra}} * 100$$

[Ec. 3]

3.2.4.3 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos con el rendimiento de extracción de SST se analizaron con el software estadístico Statgraphics Centurión versión XVII.I.

3.2.4.4 Obtención del extracto líquido a mayor escala

Realizado el análisis estadístico se eligió el mejor tratamiento para la extracción de auxinas a mayor escala. El tratamiento usado, debido a su eficiencia, fue el de maceración en frío con relación entre el material vegetal y el disolvente 1:10 (45 g de tallos en 450 ml de alcohol etílico). Para la extracción se siguió el procedimiento y condiciones ambientales descritas en el apartado 3.2.4.1.1 (Fig. 5). Finalizado el tiempo de extracción se determinó el porcentaje de sólidos solubles totales, así como la masa de los sólidos extraídos.

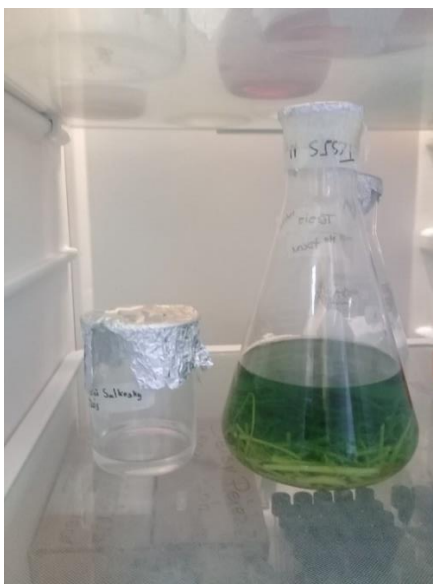


Figura 5. Obtención a mayor escala del extracto rico en auxinas. En el matraz los tallos de fréjol juntamente con el alcohol etílico (proceso de maceración); en el vaso de precipitados el reactivo de Salkowsky usado para la detección de auxinas en el extracto.

El extracto obtenido se concentró al 20 % mediante la evaporación del disolvente en un destilador rotatorio o rotaevaporador (IR KERN MLS 50-3) a 200 RPM y a 78 °C (temperatura de ebullición del disolvente). Para el volumen final del concentrado se empleó la fórmula siguiente:

$$V_c = \frac{C_d * V_d}{C_c}$$

Donde:

[Ec. 4]

V_c = Volumen del extracto concentrado

C_c = Concentración del extracto al concentrado

C_d = Concentración del extracto diluido

V_d = Volumen del extracto diluido

3.2.4.4.1 Purificación y aislamiento del extracto concentrado

El extracto concentrado fue filtrado a través de un lienzo para retener sólidos e impurezas que afecten la concentración de las auxinas (Fig. 6). Posteriormente, al filtrado, se le agregó 2 g de gel de sílice siguiendo el método establecido por Itamar & García (2016) para encapsular las auxinas. El resto del disolvente se evaporó a través de un baño maria usando una plancha de calentamiento (IKA C-MAG HS7) a 80°C y un vaso de precipitados para retener las auxinas encapsuladas (Fig. 7). El recipiente con las auxinas encapsuladas fué lavado con 10 ml de alcohol etílico y subsecuentemente se lavó dos veces con 5 ml de ácido acético al 5 %.



Figura 6. Filtración del extracto concentrado. En el matraz se observa el extracto concentrado con una coloración verde oscura, al pasarla por el lienzo se observa una pérdida de coloración debido a la detención de sólidos en el filtro

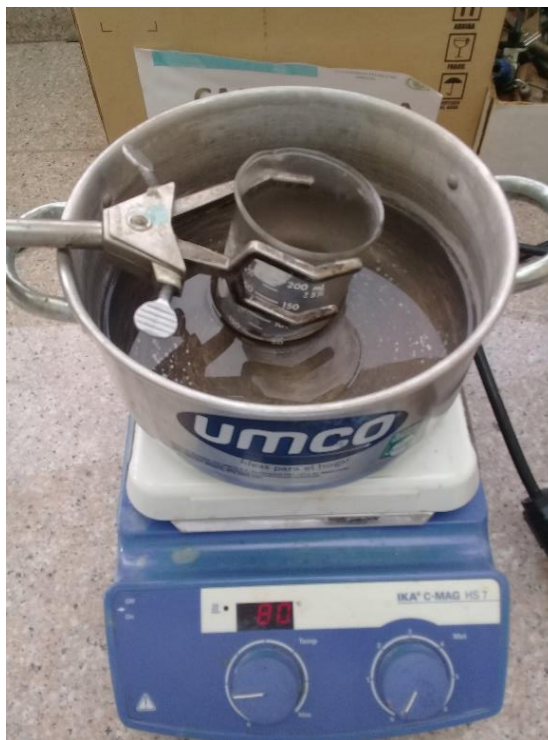


Figura 7. Evaporación del disolvente en el extracto concentrado. El disolvente se evapora a baño maria a temperatura de ebullición del alcohol etílico.

Itamar & García (2016), señalan que para la detección de las fitohormonas se debe resuspender en una solución tampón. Para ello se usó buffer fosfato de pH 4 durante 5 minutos. Se preparó 100 ml de una solución a base de fosfato de sodio 0,2 mol/l (solución A) y ácido cítrico 0,1 mol/l (solución B), para esto, se tomó 4,11 ml de la solución A y 15,89 ml de B aforando con agua destilada. De la solución preparada se tomo 80 ml y se añadió a la resuspension de auxinas dejando en refrigeración por 7 días. Las hormonas aisladas fueron colocadas en una solución de alcohol etílico al 35 % para proceder a los análisis cuantitativos mediante espectrofotometría.

3.2.4.4.2 Detección y cuantificación de auxinas en el extracto

La detección y cuantificación de auxinas se llevó a cabo empleando el reactivo de Salkowsky. Este reactivo permite establecer la presencia de grupos indol característico de los compuestos auxínicos (Glickman & Dessaux, 1995). Para la elaboración del reactivo se utilizó la metodología descrita en Castillo et al. (2007) (Anexo 1).

Este método se basa en la oxidación que genera el ácido perclórico en las moléculas indol, generando una coloración de rosado a fucsia. Para ello se utilizó una solución madre de 1 mg/ml de ácido indol acético (AIA) para preparar soluciones patrón con concentraciones de 0, 2, 4, 8, 10, 15, 20 y 30 µg/ml. Con las soluciones preparadas se construyó la curva de calibración de AIA midiendo la absorbancia a 540 nm usando un espectrofotómetro UV-VIS (SPECTRONIC INSTRUMENTS). Los valores de la curva calibración de ácido indol acético obtenida se muestran en la Tabla 3 (Anexo 2).

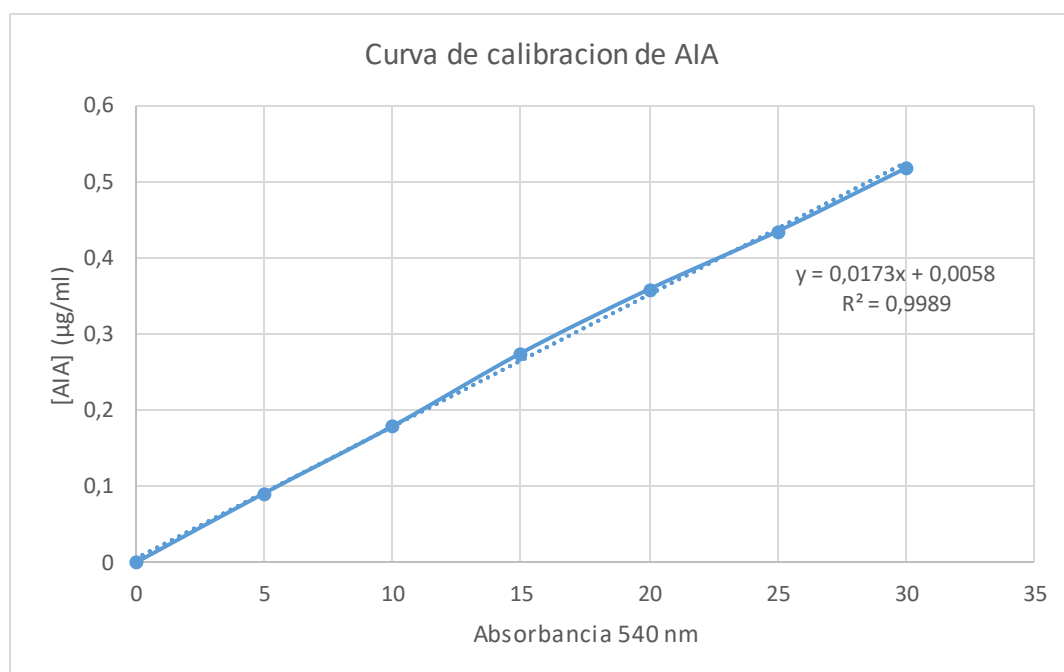


Figura 8. Curva estándar de ácido indol acético. El gráfico indica la tendencia lineal que tiene las concentraciones de AIA de 0 a 30 µg/ml).

Con la curva estándar de AIA se halló la ecuación 5 con la cual se determinó la concentración de auxinas. El coeficiente de correlación lineal indica que los datos no se hallan tan dispersos, por lo que es aceptable el uso de curva patrón para la cuantificación de las auxinas.

$$[\text{auxina}] = \frac{\text{Abs. a } 540 \text{ nm} - 0,0058}{0,0173}$$

[Ec. 5]

Para la lectura de la absorbancia del extracto obtenido con el mejor tratamiento se realizó una dilución 1/10. Se colocó 0,5 ml de la dilución en un tubo de ensayo y se añadió 0,5 ml del reactivo del Salkowsky; se dejó reaccionar durante 5 minutos y se midió la absorbancia en celdas de plástico de 1 ml de capacidad.

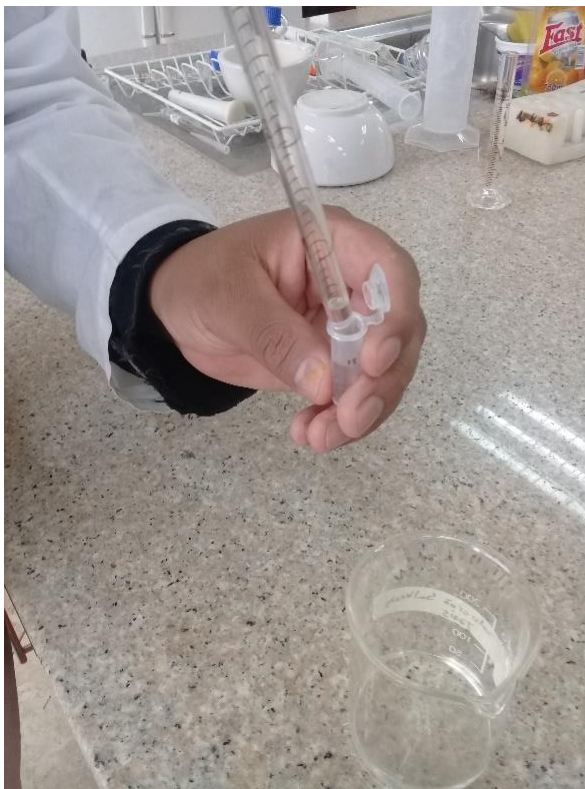


Figura 9. Aplicación del reactivo de Salkowsky a la muestra del extracto de auxina. La muestra del extracto purificado se encuentra en el tubo eppendorf con las auxinas encapsuladas con gel de sílice

3.2.5 Evaluación de la actividad fitoreguladora de auxinas en cultivos vegetales *in vitro*.

3.2.5.1 Preparación del medio de cultivo con el extracto obtenido

Se preparó medio de cultivo de propagación *in vitro* con los requerimientos nutritivos y condiciones ambientales necesarios para un crecimiento armónico de las plantas. En lugar de usar las hormonas sintéticas se usó el extracto obtenido, relacionando la concentración de hormona presente con la requerida para el medio de cultivo.

3.2.5.2 Cultivo de plantas *in vitro* y evaluación del crecimiento de tallos de mora variedad sin espinas

Para evaluar la actividad fitorreguladora de las auxinas extraídas se sembró 10 tallos de mora (*Rubus ulmifolius*) de la variedad sin espinas en medio de multiplicación empleando 3 ml de la solución rica en auxina. Los cambios físicos tanto del medio de cultivo como de los tallos de mora, fueron observados diariamente durante 15 días para detectar irregularidades como oxidación o contaminación. Al finalizar el tiempo de observación se midió el tamaño del tallo crecido en el medio de cultivo con las hormonas extraídas y se comparó con el tamaño de los tallos crecidos en el medio de multiplicación con auxinas sintéticas.

CAPÍTULO IV




RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis y discusión de los resultados

4.1.1 Preparación del material vegetal (*Phaseolus vulgaris* L.)

Una vez cosechado el fréjol, la planta se arranca o se deja secar en el mismo terreno para que sirva de abono (Pérez et al., 2013). Sin embargo, se la puede usar para extraer metabolitos que sean aplicables en la agricultura especialmente los tallos que tienen los ápices apicales y yemas axilares en auxinas ricos en auxinas (Curtis & Barnes, 2008). Los tallos de las plantas cuando se exponen a la presencia de oxígeno tienden a oxidarse (Taiz & Zeiger, 2009) es por esto que, el material vegetal usado se procesó el mismo día que se lo arrancó del suelo para evitar daños en los mismos y pérdida de auxinas. De todo el material vegetal se usó los tallos con más cantidad de yemas axilares para obtener una mayor cantidad de auxinas y se hizo trozos de 3 cm para facilitar la acción del disolvente (Burbano et al., 2003), tal y como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Etapas del procesamiento de la materia vegetal.

Tallos de fréjol			
Observación	Recolección del material vegetal	Limpieza de los tallos	Tallos cortados para la extracción

Nota: Las plantas fueron arrancadas del suelo a las 8 am y procesadas una hora después para evitar que sufran oxidación. La limpieza de los tallos fue con detergente y agua para eliminar impurezas (p. e. tierra y piedras pequeñas) que interfieran en el proceso de extracción.

Los tallos de fréjol fueron sometidos directamente al proceso de extracción con el alcohol etílico ya que las hormonas vegetales a temperaturas altas pierden estabilidad

y su estructura química se altera (Dobrev & Kamifiek, 2002) es por esto que al procesarlas no se sometió a un secado para preservar el material vegetal por más tiempo.

4.1.2 Determinación del mejor tratamiento para la extracción a escala de laboratorio

Los tratamientos fueron realizados según el diseño factorial establecido en la metodología (diseño de bloques 2²). El análisis estadístico para cada tratamiento propuesto en el diseño experimental se basó en la respuesta experimental al medir la cantidad de sólidos solubles en alcohol etílico en cada uno de los ensayos.

Según Ochoa et al. (2013), el método de determinación de sólidos solubles totales (SST) permite realizar una investigación en corto tiempo ya que se puede tener el rendimiento de extracción a escala de laboratorio y posteriormente aplicar la misma metodología a escala mucho más grande. En esta investigación se puede decir que el mejor tratamiento es el de maceración con relación material vegetal/disolvente 1:10 ya que se obtuvo una mayor cantidad de sólidos totales (1,06 gramos en promedio) y un rendimiento de extracción más alto en comparación con los otros tratamientos (10,56 % en promedio). En la Tabla 3 se indica la cantidad de sólidos extraídos con cada tratamiento, así como el rendimiento de extracción.

Tabla 3. Rendimiento del proceso de extracción con cada tratamiento.

Tratamiento	Sólidos extraídos	Rendimiento	Sólidos extraídos	Rendimiento	Sólidos extraídos	Rendimiento
	(g)	(%)	(g)	(%)	(g)	(%)
	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3	
1:10 - maceración	1,07214	10,72	0,88399	8,84	1,21716	12,17
1:15 - maceración	0,2295	2,29	0,1428	1,43	0	0
1:10 - ultrasonido	0,01417	0,14	0	0	0,00972	0,1

1:15 -	0	0	0,0086	0,09	0,00684	0,07
ultrasonido						

Nota: Las columnas con el signo de porcentaje indican el rendimiento de la extracción, mientras que las columnas de su izquierda indican la cantidad en gramos de los sólidos extraídos. Al realizarse tres replicas se obtienen valores más reales y calculando la media de los valores obtenidos tanto de solidos extraídos como del rendimiento se obtuvo el mejor tratamiento para realizarlo a mayor escala

Al realizarse el análisis estadístico se obtuvo los datos de varianza y la optimización del experimento logrando la verificación experimental del mejor tratamiento para aplicarlo a mayor escala, siendo el tratamiento 1 el optimizado. La tabla ANOVA señaló la significancia estadística que tiene la interacción de cada tratamiento en el proceso de extracción del líquido rico en auxinas (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis de varianza para el rendimiento de extracción de auxinas.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Relación M.V/D	33,6487	1	33,6487	3,33	0,1179
B: Método de extracción	61,032	1	61,032	6,04	0,0493
AB	33,0851	1	33,0851	3,27	0,1204
Bloques	18,0892	2	9,04462	0,89	0,4571
Error total	60,6629	6	10,1105		
Total (corr.)	206,518	11			

Nota: La Tabla ANOVA indica un análisis de los datos con un 95% de confianza en cada uno de los tratamientos realizados para la extracción de auxinas, de los cuales la relación entre el material vegetal y el disolvente presenta una mayor relevancia en comparación a los otros. **Fuente:** STATGRAPHICS Centurion XVII. (2017)

En la Tabla 4 se indicó la significancia estadística que se encontró al comparar el cuadrado medio de los datos frente error experimental estimado. En el análisis que se llevó a cabo se observó que las interacciones de los tratamientos presentan un valor-P mayor a 0,05 siendo significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95 %; lo cual se evidencia en el diagrama de Pareto donde, el factor AB (combinación de los factores) tiene una mayor incidencia en el rendimiento de la

extracción, siendo relevante únicamente el factor A (Relación material vegetal/disolvente) ya que el método de extracción no influye en gran manera en los resultados obtenidos. En el Fig.10 se observa la incidencia que tiene cada factor en el rendimiento de la extracción de auxinas.

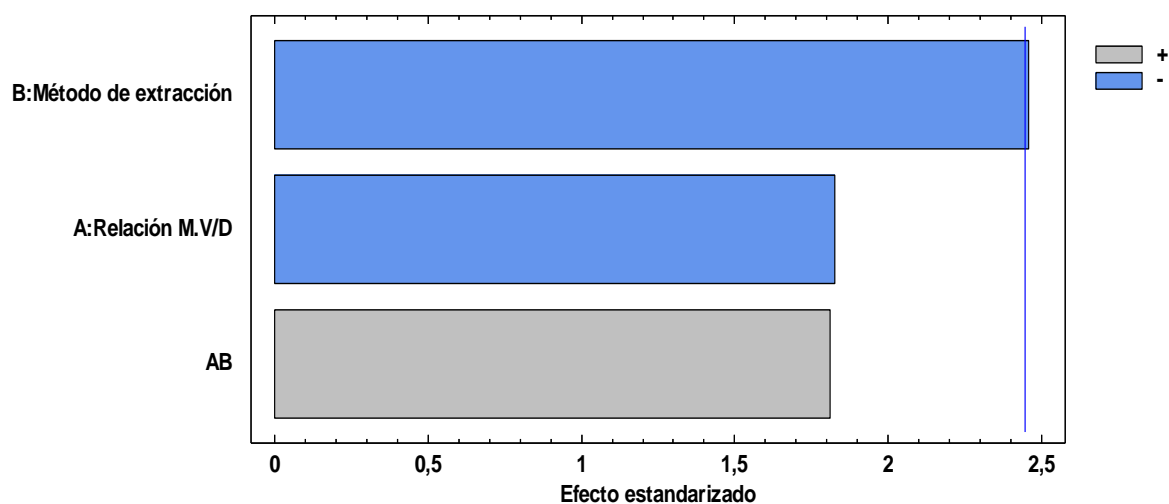


Figura 10. Diagrama de Pareto de Efectos Incidentes en el experimento. **Fuente:** STATGRAPHICS Centurion XVI.I. (2017).

El factor A (Relación material vegetal /disolvente) tiene un 80% de efecto en la extracción, por lo cual es el más significativo entre los dos factores de estudio.

Con el análisis de optimización de respuesta, se obtuvo el mejor tratamiento tomando en cuenta el análisis de varianza del diseño experimental realizado. El valor óptimo expresado en porcentaje de rendimiento de extracción fue de 7,91097 siendo el tratamiento 1 el que cumplió con las características óptimas para la obtención del extracto en mayor escala.

Tabla 5. Optimización de la Respuesta Experimental.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Relación Material vegetal/disolvente	10,0	15,0	10,0
Método de extracción	0,0	1,0	0,0

Nota: Se indica tanto el índice superior como el inferior de los 4 ensayos experimentales; así también el tratamiento para la optimización en el proceso de extracción de auxinas. **Fuente:** STATGRAPHICS Centurion XVI.I. (2017).

El tratamiento 1 que es maceración en frío durante 21 días a 10°C con la relación entre el material vegetal/disolvente 1:10 aprovecha de mejor manera la cantidad de sólidos totales presentes conservándolos y evitando pérdidas significativas del material vegetal, del disolvente y tiempo de extracción. En la Fig. 11 se observa los efectos que tienen los factores sobre el mejor tratamiento (tratamiento 1), donde se aprecia la optimización de la respuesta experimental dando como resultado la verificación del tratamiento 1 como el mejor ya que se aprecia en ambos factores que la tendencia es lineal e inversamente proporcional teniendo mejores resultados en el porcentaje de extracción, es decir, mientras menor sea la relación entre el material vegetal con el disolvente y mayor el tiempo de extracción por maceración en frío mayor será el rendimiento.

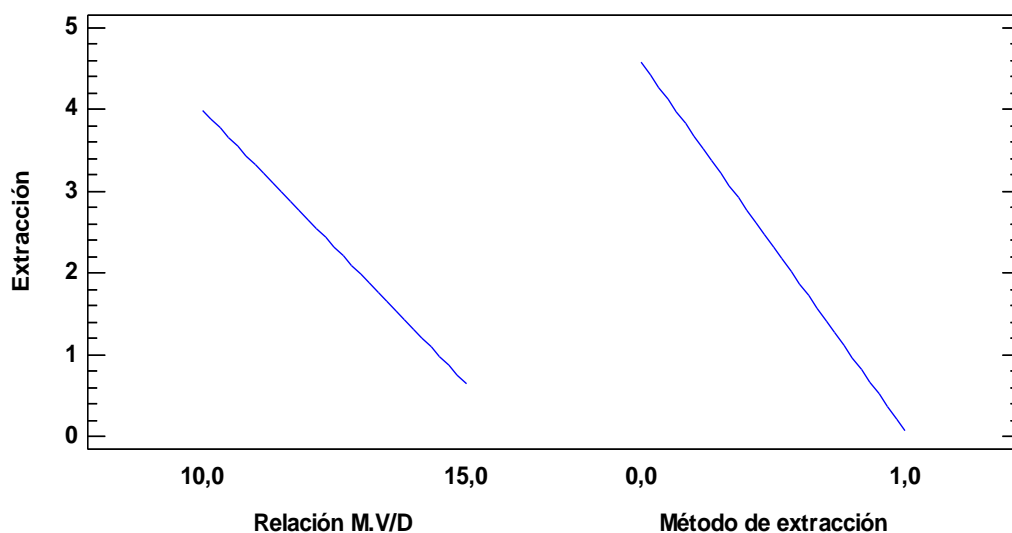


Figura 11. Efectos Principales para la extracción. La recta de la izquierda representa la relación material vegetal/disolvente y debajo los niveles bajo y alto (1:10 y 1:15) respectivamente; mientras que la recta de la derecha representa los métodos de extracción empleados siendo 0 maceración en frío y 1 ultrasonido. **Fuente:** STATGRAPHICS Centurion XVII.I. (2017).

El gráfico de efectos señala que el tratamiento 1 es óptimo ya que el rendimiento es mucho mayor y apreciable en comparación a los otros tratamientos que apenas si se pudo extraer una mínima cantidad de sólidos.

Así también la superficie de respuesta proporcionó una amplia visión de las interacciones entre los tratamientos (Fig.12) y como se ve afectado el rendimiento debido a dichas interacciones. Se destaca que el rendimiento de extracción proporciona

información acerca de la eficiencia del tratamiento para extraer una mayor cantidad de sólidos entre los cuales se encuentran las auxinas.

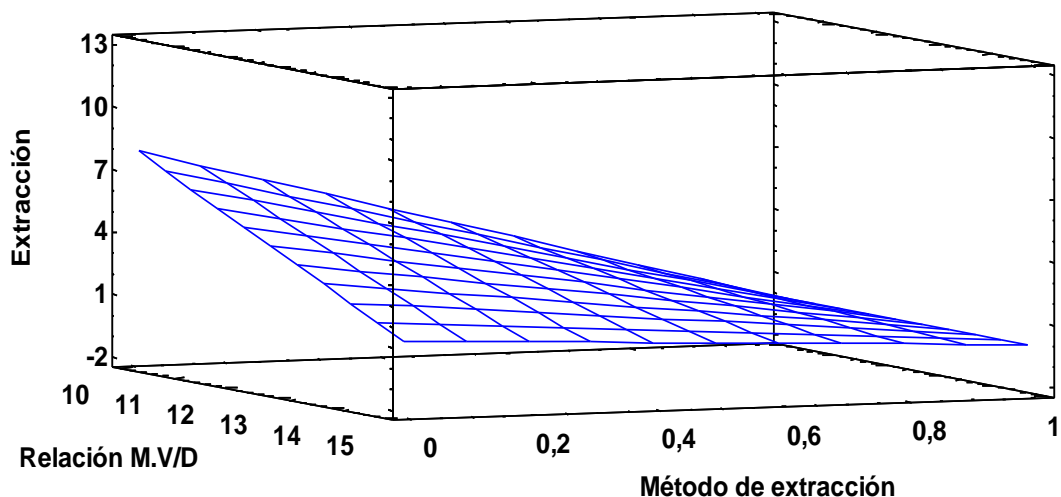


Figura 12. Superficie de respuesta de las interacciones de los tratamientos experimentales. En el área más amplia del gráfico se observan los puntos máximos donde se optimiza el rendimiento de extracción.

Fuente: STATGRAPHICS Centurion XVI.I. (2017).

La superficie de respuesta de las interacciones de los tratamientos experimentales muestran que los puntos más altos son cuando se tiene una relación 1:10 y va disminuyendo conforme aumenta esta relación; así también el rendimiento disminuye conforme se cambia de método de extracción, sin embargo, no es muy relevante esta disminución.

4.1.3 Determinación de sólidos solubles totales en el extracto concentrado

Los parámetros para la obtención del extracto líquido a escala de laboratorio se basaron en la respuesta experimental dada por el análisis estadístico y por la cantidad de sólidos solubles presentes en el tratamiento 1 (mejor tratamiento de extracción). Según Ochoa et al. (2013), los sólidos solubles presentes en un extracto líquido son proporcionales a la cantidad de compuestos fenólicos presentes en el material vegetal. A pesar de esto, la cantidad de sólidos extraídos no tienen relación con la cantidad de auxinas registrada. Esto se debe principalmente a la concentración de estas hormonas en la planta, ya que se encuentra en mínima cantidad (Porfirio et al., 2015) es por eso que el disolvente extrajo, en mayor cantidad, compuestos fenólicos propios de la planta de

fréjol. A continuación, en la Tabla 6 se señala la cantidad de sólidos solubles totales y la cantidad de sólidos extraídos aplicando el mejor tratamiento de extracción a mayor escala.

Tabla 6. Sólidos totales en el extracto madre y concentrado

	Sólidos solubles totales (%)	Sólidos extraídos (g)
Extracto madre	1,09	4,95
Concentrado	2,49	6,34

Nota: El extracto madre fue secado usando un rotaevaporador para concentrarlo al 23 %; usando la Ec. 4 se obtuvo el volumen del extracto para llegar a la concentración deseada.

Fue necesario concentrar el extracto madre, debido a la baja concentración de hormonas en el extracto. Bai et. al, (2010) y (Fu et al., 2011) señalan que la concentración endógena de las auxinas se encuentran típicamente en pequeñas cantidades en los tejidos vegetales, generalmente van desde 1 a 50 ppm lo que hace que el análisis cualitativo y cuantitativo de estos compuestos sea muy difícil.

4.1.4 Detección de auxinas por el método de Salkowsky

Celis & Gallardo (2008), indican que se requiere un método de detección y cuantificación de auxinas que sea rápido y fácil de aplicar debido a que métodos convencionales como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) resultaron ser costosas en comparación a los métodos espectrofotométricos. El método de espectrofotometría resultó ser muy fácil y rápido ya que al usar el reactivo de Salkowsky como indicador en la detección de grupos indol (característico de las auxinas) se observó un cambio de color al reaccionar dicho grupo con el reactivo, dando como resultado la presencia de auxinas. En la Fig. 13 se observa el viraje de color en la muestra del extracto a cuantificar. Los tubos eppendorf de los extremos contienen la muestra con el reactivo de Salkowsky y se observa un color ligeramente amarillo lo que indica la presencia de auxinas. El tubo eppendorf del medio es el blanco de comparación.



Figura 13. Detección de auxinas empleando el reactivo de Salkowsky como indicador A la derecha y a la izquierda se observan las muestras preparadas para la cuantificación de auxinas mientras que en el medio se observa el blanco de agua destilada.

La intensidad en el cambio de color de la muestra al contacto con el reactivo de Salkosky depende de la concentración de auxinas; debido a que en las plantas se encuentran en bajísimas cantidades (Fu et al., 2011) el viraje de color no fue muy notorio, aun así, si se encontró presencia de auxinas ya que se observó un cambio de color en la muestra tal como se observa en la Fig. 13. Rodríguez (2006), menciona que una curva de calibración de AIA facilita la cuantificación de auxinas debido a que en las plantas, esta auxina se encuentra en mayor cantidad. Según lo estudiado por Ahmad et al. (2005), solo 5 compuestos producen una reacción visible a través del cambio de color (indol, 5 hidroxil indol acético, indol acetamida, ácido indol acético y triptamina), lo cual demuestra que el método de Salkosky no tiene alta especificidad por el AIA, sin embargo, por ser un complejo auxínico extraído directamente de la planta y aplicable a cultivos *in vitro*, es despreciable la concentración de otras fitohormonas de carácter auxínico ya que se encuentran en cantidades mucho más bajas pero que cumplen la misma función que es la elongación del tallo (Jordan & Casaretto, 2006).

4.1.5 Cuantificación de auxinas por método espectrofotométrico

Los datos obtenidos con los patrones de AIA fueron analizados utilizando una regresión lineal dando como resultado una recta equivalente ($y = 0,0173x + 0,0058$), producto de dos repeticiones, con un valor de $r^2 = 0,9989$ lo cual indica una distribución homogénea de los valores sobre la recta, además en el estudio realizado por Mantilla (2007) la curva de calibración tiene características similares por lo cual se aceptó la ecuación obtenida como un patrón de referencia para la cuantificación de auxinas extraídas de los tallos de fréjol.

Realizando los cálculos correspondientes con la Ec. 5 se obtuvo una concentración de auxinas de $0,040 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ o lo que es lo mismo $40,57 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ tomando en cuenta la dilución realizada. La concentración obtenida se encuentra dentro de los valores citados por Bai et al. (2010) y Fu et al. (2011), que es de 1 a 50 ppm. Si se realiza las conversiones apropiadas se obtiene una concentración de 51 ppm de auxinas en 45 g de material vegetal usado para la extracción. La concentración obtenida es en base al disolvente usado para la extracción y al método de cuantificación ya que la prueba de Salkosky es semicuantitativa ya que reacciona con todos los grupos indol presentes en el extracto (Pan et al., 2010; Glickmann & Dessaux, 1995).

4.1.6 Evaluación *in vitro* de las auxinas extraídas

La mayor parte de laboratorios dedicados a la propagación *in vitro* de tejidos vegetales tienen establecidos medios de cultivo o propagación para cada planta (Borges et al., 2011). Por ello fue necesario formular un medio de cultivo modificado con el extracto obtenido de tal manera que satisfaga las necesidades nutricionales y hormonales para el crecimiento del tallo de mora (Mantilla, 2007).

La evaluación se llevó a cabo en medio de cultivo de multiplicación el cual tuvo en su formulación 3 ml del extracto rico en auxinas ($40,57 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$) frente al medio de cultivo con hormonas sintéticas cuya concentración fue de $0,5 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$. La utilización de blancos para la evaluación permitió establecer una eficiencia a nivel bioquímico del extracto

rico en auxinas, sin embargo esta eficiencia no es muy relevante ya que se usó como blanco medio de cultivo con ANA hormona que cumple la misma función que el ácido-3-indol acético (AIA) presente en el extracto.

El extracto con las auxinas extraídas presentaron una actividad fitorreguladora ligeramente mayor ya que favorecieron el crecimiento de los tallos en un 4,34 % (1 mm aprox.) en comparación con las hormonas sintéticas, sin embargo, presentaron una mayor cantidad de oxidación en el tallo debido a que el disolvente usado genera oxidación en los tallos de las plantas (Dobrev et al., 2005). En la Tabla 7 se detalla el crecimiento de 10 tallos de mora al cabo de 15 días usando el extracto de tallos de fréjol como fitorregulador frente a las hormonas sintéticas.

Tabla 7. Crecimiento de los explantes de tallos de mora.

Crecimiento de tallos de mora (cm)										
Número de explante	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tamaño explante día 0	2,0	2,5	2,3	2,5	2,4	2,2	2,5	2,0	2,2	2,5
Tamaño del explante día 15 con el extracto	2,1	2,5	2,4	2,6	2,4	2,3	2,6	2,2	2,3	2,6
Tamaño del explante día 15 con horm. sintéticas	2,0	2,5	2,3	2,5	2,5	2,2	2,6	2,1	2,3	2,5

Nota: El tamaño medido es aproximado debido a que algunos explantes no eran completamente rectos, lo cual altera la medición de la longitud.

4.2 Verificación de hipótesis

- Efecto de la relación material vegetal/disolvente (MV/D) y método de extracción sobre el rendimiento de extracción líquida de sólidos totales (SST) y auxinas presentes en tallos de *Phaseolus vulgaris* L.

Como se puede apreciar en la Fig. 10 la relación entre el material vegetal y el disolvente es el factor que más influye en la extracción de auxinas, independientemente del método de extracción ya que si influye directamente en el

rendimiento de la extracción, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

- Evaluación de la actividad fitorreguladora de las auxinas del extracto de *Phaseolus vulgaris* L. en el crecimiento *in vitro* de tallos de mora.



Figura 14. Evaluación de la actividad fitorreguladora de auxinas presentes en el extracto de tallos de fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.). El medio de cultivo de color naranja posee las auxinas extraídas mientras que el azul las auxinas sintéticas

En la Fig. 14 se aprecia que las auxinas presentes en el extracto de tallos de fréjol común presentan actividad fitorreguladora en concentraciones de $40,57 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ ya que se observó un crecimiento en los tallos de mora, es por esto que, se acepta la hipótesis alternativa y se rechaza la hipótesis nula.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se evaluó la actividad fitorreguladora de auxinas obtenidas en un extracto de fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en cultivos de plantas *in vitro* dando como resultado que el extracto presenta una actividad fitorreguladora aceptable ya que favorece el crecimiento de tallos en condiciones de luz y temperatura adecuadas (12 horas diarias y 25 °C). Dicha actividad se compara a la realizada por las hormonas sintéticas ya que se obtuvieron crecimientos de aproximadamente 4,34 % superior con respecto a las hormonas sintéticas.
- Se obtuvo un extracto rico en auxinas aplicando las tecnologías de extracción asistida por ultrasonidos y maceración en frío. El método convencional fue el más eficaz ya que extrajo mayor cantidad de sólidos (4,94 g) en comparación al método de extracción asistida por ultrasonidos que extrajo una pequeñísima cantidad.
- Se determinó que al aplicar el extracto líquido rico en auxinas provoca una oxidación en el tallo de mora debido a que el disolvente usado (alcohol etílico) es tóxico para la planta provocando una coloración marrón en la superficie del tallo. Sin embargo, dicha oxidación no interfiere en la actividad fitorreguladora ya que los tallos crecieron normalmente.
- Un método fácil y sencillo para la detección y cuantificación de auxinas extraídas de material vegetal es la detección con métodos colorimétricos como la técnica del reactivo de Salkowsky que permite la detección de grupos indol en el extracto los cuales pueden ser cuantificados estableciendo una curva patrón de AIA, este método no requiere de mucho esfuerzo, además genera un costo mucho menor en comparación con métodos como HPLC.

- La concentración de auxina obtenida fue en base a la densidad del alcohol etílico usado como disolvente, dicha concentración puede variar dependiendo del disolvente que se use. La concentración registrada difiere de los valores citados por Bai et. al, (2010) y Fu et al. (2011) en sus investigaciones debido al método de cuantificación ya que por HPLC los resultados son más precisos ya que se cuantifica una hormona específica, mientras que el método usado cuantifica todas las auxinas que tengan el grupo indol en su estructura.

5.2 Recomendaciones

- Realizar una investigación científica más profunda acerca del aprovechamiento de materiales vegetales residuales como medio de obtención de metabolitos de interés como fitohormonas, polifenoles enzimas entre otras sustancias, que tienen gran uso en la industria química, bioquímica y farmacéutica.
- Aplicar tecnologías como el Secado por Aspersión para preservar los extractos sin que sufran alteraciones y tengan una vida útil más larga, logrando una biodisponibilidad a largo plazo de metabolitos con principios activos de interés.
- Realizar estudios más profundos para determinar la eficiencia a nivel molecular y estructural de los compuestos extraídos a partir de material vegetal, para lograr estandarizar métodos que sean más completos y permitan obtener mejores resultados en futuras investigaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bibliografía

- Abdelnour-Esquivel, A., & Vincent, J. (2006). *Coceptos basicos del cultivo de tejidos vegetales* (Primera ed.). San Jose, Costa Rica: Centro Interamericano de Documentacion e Informacion Agricola. Recuperado el 28 de marzo de 2017, de https://books.google.com.ec/books?id=T9QOAQAAIAAJ&pg=PA31&dq=cultivo%20de%20plantas%20in%20vitro&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=cultivo%20de%20plantas%20in%20vitro&f=false
- Ahmad, F., Ahmad, I., & Saghir, M. (2005). Indole Acetic Acid Production by the Indigenous Isolates of Azotobacter and Fluorescent Pseudomonas in the Presence and Absence of Tryphophan. (E. Gürel, Ed.) *Turkish Journal of Biology*, 29, 29-34. Recuperado el 06 de 01 de 2018
- Alfonso, C. A., & Monedero, M. (2004). *Uso, manejo y conservacion de suelos*. Asociacion Cubana de tecnicas Agricolas y Forestales, La Habana. Recuperado el 29 de junio de 2017, de <http://mst.ama.cu/644/1/USO%20MANEJO%20Y%20COSERVACI%C3%93N%20DE%20SUELOS.pdf>
- Alvarez, M. (abril de 2011). La seleccion asistida por marcadores (MAS, "Marker-assisted selection") en el mejoramiento genetico de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultivos Topicales*. Recuperado el 7 de julio de 2017, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362011000200006
- Arias, S. (2005). *Campos y perspectivas de la biotecnologia: una estrategia para su introduccion en el istmo centroamericano* (Cuarta ed.). Panama, Republica de Panama: Editorial CADESCA. Recuperado el 29 de junio de 2017, de https://books.google.com.ec/books?id=89kqAAAAYAAJ&pg=PA109&dq=metodos+de+cultivo+de+plantas+in+vitro&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=on

epage&q=metodos%20de%20cultivo%20de%20plantas%20in%20vitro&f=false

- Bai, Y., Du, F., & Liu, H. (2010). Determination strategies of phytohormones: recent advances. *Analytical Methods*, 2, 1867-1873. Recuperado el 30 de 12 de 2017
- Beebe, S., Rao, I., Cajiao, C., & Grajales, M. (2008). Selection for drought resistance in common bean also improves yield in phosphorus limited and favorable environments. *Crop Science*, 582-592. Recuperado el 21 de 11 de 2017, de <https://dl.sciencesocieties.org/publications/cs>
- Borges, M., Destrade, R., Meneses, S., Gómez, R., Malaurie, B., Hamon, P., & Charles, L. (2011). Optimización de un medio de cultivo para plantas micropropagadas de *Dioscorea alata* L. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XIII(2). Recuperado el 12 de 01 de 2018, de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/viewFile/28027/28285>
- Burbano, S., Burbano, E., & Gracia, C. (2003). *Física General* (32 ed.). Madrid, España: Tébar S. L. Recuperado el 27 de 12 de 2017, de <https://books.google.com.ec/books?id=BWgSWTYofilC&pg=PA299&dq=superficie+de+contacto&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjFIJvQ2NHYA hWK71MKHapDCewQ6AEIODAE#v=onepage&q=superficie%20de%20contacto&f=false>
- Carrasco, G., & Toro, G. (2003). *Situación del Cultivo de Frejol (Phaseolus vulgaris) en la costa ecuatoriana* (Tercera ed.). Quito, Ecuador: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA-CIDIA). Recuperado el 4 de julio de 2017, de https://books.google.com.ec/books?id=pVjAAAAIAAJ&pg=PA19&dq=frejol&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjm5aafz_XUAhUDbD4KHXhjDIUQ6AEIODAF#v=onepage&q=frejol&f=false
- Castillo, G., Ortega, G., Carabeo, V., Delgado, G., & Michelena, G. (2007). Determinación cualitativa de giberelinas y auxinas por cromatografía de capa fina. *ICIDCA. Sobre los derivados de la Caña de Azúcar*, XLI(1), 12-17.

Recuperado el 30 de 11 de 2017, de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223114967002>

Celis, L., & Gallardo, I. (2008). *Estandarizacion de metodos para deteccion de promotores de crecimiento vegetal (Acido indol acetico y giberelinas) en cultivos microbianos. (Tesis me Microbiologo Agricola y Veterinario, Universidad Politecnica Javeriana. Bogota.* Recuperado el 17 de agosto de 2017, de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis95.pdf>

Chiwocha, S., & Abrams, S. (2003). A method for Profiling Classes of Plant Hormones and their Metabolites Using Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry: An Analisis of Hormone Regulation of Thermodomancy of Lettuce (*Lactuca Sativa L.*) Seed. . *The Plant Journal*, 35, 405-417. Recuperado el 17 de agosto de 2017

Cui, K., Lin, Y., Zhou, X., Li, S., Liu, H., & Zeng, F. (2015). Comparison of sample pre-treatment methods for the determination of multiple phytohormones in plant samples by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. (J. Sneddon, Ed.) *Microchemical Journal*, 121, 25-31. Recuperado el 27 de 12 de 2017

Curtis, H., & Barnes, N. (2008). *Curtis Biologia.* Madrid, España: Editorial Medica Panamericana. Recuperado el 30 de marzo de 2017, de https://books.google.com.ec/books?id=mGadUVpdTLsC&pg=PA890&dq=auxinas&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=auxinas&f=false

De Corta, J. (2013). *Extraccion solido-liquido de alquifenoles y bisfenol con ultrasonidos focalizados. Influencia de la sonda y su uso.* La Rioja, España: Universidad de Rioja. Recuperado el 01 de mayo de 2017, de http://biblioteca.unirioja.es/tfe_e/TFE000516.pdf

De Mejía, E., Guzmán–Maldonado, S., Acosta–Gallegos, J., Reynoso–Camacho, R., Ramírez–Rodríguez, E., González–Chavira, M., . . . Kelly, J. (28 de agosto de 2003). Effect of cultivar and growing location on the trypsin inhibitors, tannins, and lectins of common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) grown in the semiarid

highlands of Mexico. *ACS Publications*, 51(20), 5962-5966.
doi:10.1021/jf030046m

Diaz, A. (2009). *Diseño estadístico de experimentos* (Segunda ed.). Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia. Recuperado el 30 de 11 de 2017, de <https://books.google.com.ec/books?id=0x0DW6dNiyAC&pg=PA6&dq=dise%C3%B1o+experimentales+estadisticos&hl=es&sa=X&ved=0ahUKewjwwdfKxenXAhXELyYKHddmBnYQ6AEIKjAB#v=onepage&q=dise%C3%B1o%20experimentales%20estadisticos&f=false>

Dobrev, P., & Kamifiek, M. (2002). Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid phase extraction. *Chromatography A*, 950, 21-29. Recuperado el 27 de 12 de 2017, de <https://www.sciencedirect.com/science/journal/00219673>

Dobrev, P., Havlicek, L., Vagner, M., Malbeck, J., & Kaminek, M. (April de 27 de 2005). Purification and determination of plant hormones auxin and abscisic acid using solid phase extraction and two-dimensional high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 159. doi:10.1016/j.chroma.2005.02.091

Duque, J. (2010). *Biotecnología, Panorámica de un sector* (Primera edición en español ed.). España: NETBIBLO, S.L. Recuperado el 10 de julio de 2017, de <https://books.google.com.ec/books?id=77eWLHLyMNcC&printsec=frontcover&dq=biotecnología&hl=es&sa=X&ved=0ahUKewijnviY2IHVAhXBKyYKHSFcBLQ6AEIITAA#v=onepage&q=biotecnología&f=false>

Enriquez, G. (2007). *Curso sobre el cultivo del cacao* (Tercera ed.). Turrialba, Costa Rica: Centro AgronomicoTropical de Investigacion y Enseñanza (CATIE). Recuperado el 30 de junio de 2017, de https://books.google.com.ec/books?id=eZgOAQAIAAJ&pg=PA129&dq=metodos%20de%20cultivo%20de%20plantas%20in%20vitro&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=metodos%20de%20cultivo%20de%20plantas%20in%20vitro&f=false

FAO. (Junio de 2001). Perfiles nutricionales por países. 35. Recuperado el 12 de junio de 2017, de <ftp://ftp.fao.org/es/esn/nutrition/ncp/ecumap.pdf>

- FAO. (marzo de 2003). Biotecnología Agrícola ¿Servirá de algo? Recuperado el 3 de julio de 2017, de <http://www.fao.org/spanish/newsroom/focus/2003/gmo1.htm>
- FAO. (2003). *Biotecnología agrícola para países en desarrollo* (Primera ed.). Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Recuperado el 1 de julio de 2017, de <http://www.fao.org/docrep/004/Y2729S/Y2729S00.HTM#Contents>
- Fogaca, C., & Fett-Neto, A. (2011). Differences in endo/exogenous auxin profile in cuttings of different physiological ages. *Plant Physiology*, 168, 2088-2092. Recuperado el 24 de 12 de 2017
- Fu, J., Sun, X., Wang, J., Chu, J., & Yan, C. (2011). Progress in quantitative analysis of plant hormones. *Chinese Science*(55), 55-74. Recuperado el 30 de 12 de 2017, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/journals/chin-sci/>
- García, C., & Rivera, J. (2016). *Aislamiento de Hormonas Potenciadoras de Crecimiento (Auxinas, Giberelinas y Citoquininas) en Mangifera indica*. Apatzingán, Michoacán, Mexico: Instituto Tecnológico Superior de Apatzingán. Recuperado el 26 de 12 de 2017, de <https://www.itsa.edu.mx/nuevo/wp-content/uploads/2016/06/REPORTE-FINAL.pdf>
- García, S., & Flores, C. (2004). *Biología 2* (Primera ed.). Guadalajara, Mexico: UMBRAL. Recuperado el 19 de Octubre de 2017, de https://books.google.com.ec/books?id=quBADTsMVQ8C&pg=PA63&dq=hormonas%20vegetales%20que%20son&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=hormonas%20vegetales%20que%20son&f=false
- Glickman, E., & Dessaux, Y. (1995). A Critical Examination of the Specificity of the Salkowsky Reagent for Indolic Compounds Produced by Phytopathogenic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 793-796. Recuperado el 17 de agosto de 2017
- Glickmann, E., & Dessaux, Y. (1995). *A critical examination of the specificity of the Salkowsky reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic*

bacteria. Applied and Environmental Microbiology (Segunda ed.). Recuperado el 07 de 01 de 2018

Gòmez, A., & García, P. (2006). *Fitohormonas: Metabolismo y formas de accion* (Primera ed.). Castellon de la Plana, España: Universitat Jaume. Recuperado el 22 de Septiembre de 2017, de https://books.google.com.ec/books?id=6MfjE2eQO4kC&pg=PA15&dq=influencia+de+fitohormonas+en+las+plantas&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=influencia%20de%20fitohormonas%20en%20las%20plantas&f=false

Gòmez, A., & García, P. (2006). *Fitohormonas: Metabolismo y formas de accion* (Primera ed.). Castellon de la Plana, España: Universitat Jaume. Recuperado el 22 de Septiembre de 2017, de https://books.google.com.ec/books?id=6MfjE2eQO4kC&pg=PA15&dq=influencia+de+fitohormonas+en+las+plantas&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=influencia%20de%20fitohormonas%20en%20las%20plantas&f=false

Guzmán-Maldonado, H., Castellanos-Ramos, J., & González de Mejía, E. (abril de 1996). Relationship between theoretical and experimentally detected tannins of common beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Food Chemistry*(Volume 55, Issue 4). Recuperado el 21 de 11 de 2017, de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814695001069>

Hielscher. (2016). *Extraccion de azafran mediante el uso de ultrasonidos*. Hielscher: Tecnologia de ultrasonidos. Recuperado el 01 de mayo de 2017, de <https://www.hielscher.com/es/ultrasonically-assisted-saffron-extraction.htm>

Hu, Y., Li, Y., Zhang, G., Li, G., & Chen, Y. (2011). Development of sample preparation method for auxin analysis in plants by vacuum microwave-assisted extraction combined with molecularly imprinted clean-up procedure. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399, 3367-3374. Recuperado el 27 de 12 de 2017

IICA. (2009). *Memoria II Curso de cultivo de tejidos* (Cuarta ed.). Catie, Turrialba, Costa Rica: Centro Internacional de Documentacion e Informacion Agricola (CIDIA). Recuperado el 1 de julio de 2017, de <https://books.google.com.ec/books?id=DOMNAQAIAAJ&pg=PA68&dq=a>

uxinas+sinteticas&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=auxinas%20sinteticas&f=false

- Isolve, M. (2000). *Historia de la Ciencia y la Tecnologia. Cultura Tecnologica 3* (Primera ed.). (Noriega, Ed.) Mexico, Mexico: Limusa S.A. Recuperado el 1 de julio de 2017, de https://books.google.com.ec/books?id=N0Lzcm9z_VsC&pg=PA22&dq=biotecnologia+vegetal&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiYkoHkqvXUAhUBQSYKHULkDvgQ6AEIRzAG#v=onepage&q=biotecnologia%20vegetal&f=false
- Itamar, J., & García, C. (2016). *Aislamiento de Hormonas Potenciadoras de Crecimiento (Auxinas, Giberelinas y Citoquinas) en Mangifera indica*. Apatzingán, Michoacán de Ocampo, México: ITSA. Recuperado el 30 de 11 de 2017, de <https://www.itsa.edu.mx/nuevo/wp-content/uploads/2016/06/REPORTE-FINAL.pdf>
- Jones, A. L. (14 de 10 de 1999). PHASEOLUS BEAN: Post-harvest Operation. *FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 25. Recuperado el 7 de junio de 2017, de <http://www.fao.org/3/a-av015e.pdf>
- Jordan, M., & Casaretto, J. (2006). *Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas*. (F. Squeo, & L. Cardemil, Edits.) La Serena, Conquimbo, Chile: Universidad de La Serena. Recuperado el 06 de 01 de 2018, de <http://www.exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Auxinasgiberelinasycitocininas.pdf>
- Lee, A., Yong, J., Tan, S., & Ong, E. (2008). Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*(610), 274-281. Recuperado el 28 de 12 de 2017
- Llaudy, M. d., & Canals, R. (2007). La maceracion prefermentativa en frio, Efectos en la extraccion del color y los compuestos fenolicos, e influencia del nivel de maduracion d ela uva. *ACE, REVISTA de ENOLOGIA*. Recuperado el 12 de junio de 2017, de http://www.acenologia.com/ciencia72_2.htm

- Lopez, E. (2008). Produccion de bebida alcoholica de alta calidad. Puebla, Mexico. Recuperado el 29 de marzo de 2017, de http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lpro/lopez_a_e/capitulo1.pdf
- Machakova, I., Zzimalova, E., & George, E. (2008). *Plant growth regulators I: introcuction; auxins, their analogues and inhibitors* (First ed.). (E. George, M. Hall, & G.-J. De Klerk, Edits.) Dordrecht, The netherlands: Springer. Recuperado el 26 de 12 de 2017
- Mantilla, E. (2007). *Evaluacion de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (Chrysanthemum morifolium var. yoko ono) en periodo de enraizamiento*. Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana. Recuperado el 04 de 01 de 2018, de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis35.pdf>
- Martinez, M. (2014). *Metodos Analíticos para la determinacion de compuestos disruptores endocrinos*. La Rioja, España: Universidad de Rioja. Recuperado el 01 de mayo de 2017, de <https://dialnet.unirioja.es/descarga/tesis/44392.pdf>
- Montañez, V. Y. (2013). *Metodo convencionales, rapidos y alternativos para el control microbiologico de la higiene en superficies*. Universidad Autonoma de Barcelona, Barcelona. Recuperado el 29 de junio de 2017, de <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/126524/vymil de1.pdf;jsessionid=7A76277C9632DD0F6E120733DD907D6B?sequence=1>
- Ochoa, A., Marin, J., Rivero, D., & Aguilera, E. (2013). *Caracterización física, físico-química y química de extractos*. Recuperado el 28 de 12 de 2017, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S1870-
- ONU. (2015). *Poblacion*. Organizacion de las Naciones Unidas, New York. Recuperado el 29 de junio de 2017, de <http://www.un.org/es/sections/issues-depth/population/index.html>
- Ortega, C. (2000). *Evaluacion de fitohormonas y abonos foliares para mejorar el amarre de frutos en tomate de arbol (Cyohomandra betacea Sendt)*. Quito, Ecuador: Universidad Central del Ecuador. Recuperado el 22 de Septiembre

de 2017, de
https://books.google.com.ec/books?id=q4wzAQAAAMAAJ&pg=PA15&dq=influencia+de+fitohormonas+en+las+plantas&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=influencia%20de%20fitohormonas%20en%20las%20plantas&f=false

Pan, X., Welti, R., & Wang, X. (2010). Quantitative analysis of major plant hormones in crude plant extracts by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Nature Protocols*, 5, 986-992. Recuperado el 27 de 12 de 2017

Pérez, S., Romo, G., & Arnaiz, M. (2013). *Mujeres (in) visibles: género, alimentación y salud en comunidades rurales de Oaxaca* (Primera ed.). Tarragona, Oaxaca, México: Publication URV . Recuperado el 28 de 12 de 2017, de <https://books.google.com.ec/books?id=iQ6gAgAAQBAJ&pg=PA61&dq=abono+natural&hl=es&sa=X&ved=0ahUKewiqname1dHYAhVhkuAKHQ0ADWcQ6AEINTAD#v=onepage&q=abono%20natural&f=false>

Pilatti, O. (2007). *Nuevas Tecnologías para el cultivo y la cosecha del algodón*. EEA Reconquista, Sao Paulo. Recuperado el 29 de junio de 2017, de <http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/cba6/palestras/1417.pdf>

Polonia, J., Rao, I., Mejia, S., Beebe, S., & Cajiao, C. (23 de 09 de 2012). Características morfo-fisiológicas del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) relacionadas con la adaptación a sequía. *bdigital*, 61(3), 197-206. Recuperado el 21 de 11 de 2017, de https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/37526/39911

Pop, T., Pamfil, D., & Bellini, C. (2011). Auxin control in the formation of adventitious roots. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* , 39, 307-316. Recuperado el 24 de 12 de 2017

Porfirio, S., Gomes, M., Peixe, A., Cabrita, M., & Azadi, P. (6 de 11 de 2015). Current analytical methods for plant auxin quantification – A review. *Analytica Chimica Acta*, 902(21), 14. Recuperado el 30 de 11 de 2017, de

<https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=57225e67dc332d0151010e72&assetKey=AS%3A355923500519424%401461870183743>

- Rao, I. (2001). Role of physiology in improving crop adaptation to abiotic stresses in the tropics: The case of common bean and tropical forages. (M. Pessaraki, Ed.) *Handbook of Plant and Crop Physiology*, 583-613. Recuperado el 21 de 11 de 2017
- Raven, P., Evert, R., & Eichhorn, S. (2002). *Biología de las plantas* (Primera ed.). Barcelona, España: Reverte S.A. Recuperado el 29 de junio de 2017, de <https://books.google.com.ec/books?id=xvNd3udrh1YC&pg=PA482&dq=metodos+de+cultivo+de+plantas&hl=es&sa=X&ved=0ahUKewiJ1PTO4uPUAhVDKyYKHUaXCOEQ6AEIKTAC#v=onepage&q=metodos%20de%20cultivo%20de%20plantas&f=false>
- Roca, W., & Mroginski, L. (2007). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones* (Tercera ed.). Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Recuperado el 28 de marzo de 2017, de https://books.google.com.ec/books?id=EXijYNw55DUC&pg=PA579&dq=cultivo%20de%20plantas%20in%20vitro&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=cultivo%20de%20plantas%20in%20vitro&f=false
- Rodriguez, M. (2006). *Determinacion de ácido indol acético (AIA), procedimiento operativo estándar*. Bogotá, Colombia: Laboratorio de Microbiología Ambiental. Pontificia Universidad Javeriana. Recuperado el 06 de 01 de 2017
- Santner, A., & Estelle, M. (2009). Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature*(459), 1071-1078. Recuperado el 21 de 12 de 2017
- Segretin, M. (2006). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivo de células vegetales). Recuperado el 27 de marzo de 2017, de <http://www.argenbio.org/adu/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20II%20Europe.pdf>
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2009). *Fisiología Vegetal* (Octava ed., Vol. I). Castellon, España: Universidad de Jaume. Recuperado el 27 de 12 de 2017, de <https://books.google.com.ec/books?id=7QIbYg->

OC5AC&pg=PA127&dq=oxidacion+de+tallos+vegetales&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiiu15L21tHYAhVE0FMKHUv_Bp4Q6AEILDAB#v=onepage&q=oxidacion%20de%20tallos%20vegetales&f=false

Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology* (Fifth ed.). Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates. Recuperado el 21 de 12 de 2017

Tirado, M. (2016). Evaluacion de la actividad antiinflamatoria de liposomas obtenidos mediante Secado por aspersion a partir del extracto hidrosoluble de la cascara del coco verde (coco nucifer). 81. Recuperado el 30 de 11 de 2017

Yan, H., Wang, F., Han, D., & Yang, G. (2012). Simultaneous determination of four plant hormones in bananas by molecularly imprinted, solid phase extraction coupled with high performance liquid chromatography . *Analyst*, 137, 2884-2890. Recuperado el 26 de 12 de 2017

Anexos

Anexo 1. Solución de Salkowsky.

Se tomó 1 ml de cloruro férrico 0,5 mol/L y 50 ml de ácido perclórico al 35 %, se agitó bien y se llevó a un baño de María a 60 °C durante 5 min.

Anexo 2. Estándares para la curva de calibración de AIA.

Solución madre		Curva estándar	
Volumen solución madre (µL)	Volumen de agua (µL)	[AIA] (µg/ml)	Lecturas de absorbancia
0	0	0	0
5	995	5	0,091
10	990	10	0,179
15	985	15	0,275
20	980	20	0,359
25	975	25	0,435
30	970	30	0,518

Nota: La columna volumen solución madre (µL) indica el volumen que se tomó para realizar las diluciones y llegar a las concentraciones requeridas para construir la curva estándar de AIA; la columna volumen de agua (µL) indica el volumen de agua destilada agregado para diluir la solución madre; la columna [AIA] (µg/ml) indica la concentración esperada de AIA.



Anexo 3. Separación de los residuos vegetales y el extracto líquido con sólidos extraídos.



Anexo 4. Determinación de sólidos totales usando balanza de humedad. Mediante determinación del porcentaje de humedad se establece la relación para obtener la cantidad de sólidos totales.



Anexo 5. Concentración de la solución madre empleando un rotaevaporador.



Anexo 6. Extracto líquido concentrado al 23,93 %.



Anexo 7. Sólidos encapsulados con gel de sílica para facilitar la purificación del extracto.



Anexo 8. Separación de sólidos contaminantes en el extracto rico en auxinas.