



Universidad Nacional
Federico Villarreal

Vicerrectorado de
INVESTIGACIÓN

Facultad de Ciencias Naturales y Matemática

DETERMINACIÓN DE FITOHORMONAS REGULADORAS DE CRECIMIENTO EN
FORMULADOS FERTILIZANTES POR ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA,
APLICANDO LA TECNICA DE DERIVADAS

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Química

AUTOR (A)

Vilca Vergaray, Antony

ASESOR (A)

Pumachagua Huertas, Rodolfo

JURADO

Lezama Vigo, Hélmer Helí
Castañeda Perez, Luz Genara
Rodriguez Mendoza, Baleriano Maximo

Lima – Perú
2019

DEDICATORIA

A Dios por todas las bendiciones que me da en esta vida, a mis padres que siempre me apoyan en mis propósitos y a mis dos amores; mi esposa y mi querida hija, que son mi fortaleza.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer sinceramente a mis profesores que me han brindado durante los años académicos su tiempo, dedicación y conocimientos en mi formación, en especial agradecer al Quím. Rodolfo Pumachagua Huertas por encaminarme en la elaboración de este trabajo y brindarme su tiempo y conocimiento en cada detalle expuesto.

Agradecer al Ing. Carlos Ancajima Ayllón, por ser parte de la motivación para la culminación de este trabajo, por brindarme sus conocimientos en el área del sector agrícola. Sin las charlas e intercambio de ideas no hubiese sido posible plantear esta investigación en las fitohormonas.

Agradecer a mí casa de estudios Universidad Nacional Federico Villarreal, por el uso de sus instalaciones para llevar a cabo la parte experimental de mi investigación.

Agradecer a mis padres por el apoyo que me han brindado a lo largo de este tiempo y durante el proceso de elaboración de este trabajo, sus palabras de apoyo y de aliento las lecciones de vida que siempre tienen para dar. Gracias por todo nunca dejaré de agradecerles.

Agradecer a cada persona que he conocido en mi vida, porque de ellos siempre aprendo cosas nuevas que me sirven en mi crecimiento profesional y personal, aunque no las mencione tenga por seguro que les estoy muy agradecido.

A todos vosotros gracias

INDICE

Resumen	10
Abstract	11
CAPITULO 1	
1. Introducción	12
CAPITULO 2	
2. Marco teórico	17
2.1. Espectroscopía de UV-Vis	
2.2. Aplicaciones de la espectroscopia de absorción	20
2.3. Derivación de Espectros	27
2.3.1. Propiedades Básicas	
2.3.2. Análisis cualitativo por utilización de espectros derivados	28
2.3.3. Análisis cuantitativo por utilización de espectros derivados	31
2.4. Aspectos importantes en el análisis de derivación de espectros	32
2.4.1. Efecto de la derivación sobre los picos de absorción solapados	
2.4.2. Factores que interfieren al cálculo de derivadas	
2.4.2.1. Distorsión	33
2.4.2.2. Relación señal-ruido	
2.5. Ventajas de la espectroscopía de derivadas	35
2.5.1. Determinación de la longitud de onda máxima	
2.5.2. Resolución de los espectros mejorados	36
2.5.3. Análisis en muestras turbias	
2.5.4. Cuantificación de soluciones con mezcla de varios componentes	
2.5.4.1. Técnica para medición: zero-crossing	38
2.5.4.2. Método de derivadas de espectros divididos	40
2.6. Fitohormonas	41
CAPITULO 3	
3. Método	46
3.1. Tipo de Investigación	
3.2. Variables	
3.3. Población y muestras	
3.4. Instrumentos	47
3.5. Procedimientos	49
CAPITULO 4	
4. Resultados	54
4.1. Evaluación de solvente adecuado	
4.2. Derivación de espectros de absorción	58
4.3. Obtención de las curvas de calibrado	78

4.4. Cuantificación de las concentraciones de las muestras comerciales	82
CAPITULO 5	
5. Discusión de resultados	89
CAPITULO 6	
6. Conclusiones	93
CAPITULO 7	
7. Recomendaciones	95
Referencias Bibliográficas	96
Anexos	99

INDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Concentraciones y Absorbancias del ácido giberélico en orden cero a una longitud de onda de 251 nm.
- Tabla 2. Concentraciones y Absorbancias del ácido giberélico de primer orden a 248 nm.
- Tabla 3. Concentraciones y Absorbancias del ácido giberélico de primer orden a 268 nm.
- Tabla 4. Concentraciones y Absorbancias del ácido giberélico de segundo orden a 260 nm.
- Tabla 5. Concentraciones y Absorbancias del ácido giberélico de segundo orden a 275 nm.
- Tabla 6. Concentraciones y Absorbancias del ácido giberélico de tercer orden a 269 nm.
- Tabla 7. Concentraciones y Absorbancias del ácido giberélico de tercer orden a 278 nm.
- Tabla 8. Concentraciones y Absorbancias del ácido giberélico de cuarto orden a 267 nm.
- Tabla 9. Concentraciones y Absorbancias del ácido giberélico de cuarto orden a 274 nm.
- Tabla 10. Concentraciones y Absorbancias del ácido indol acético de orden cero a 279 nm.
- Tabla 11. Concentraciones y Absorbancias del ácido indol acético de orden cero a 289 nm.
- Tabla 12. Concentraciones y Absorbancias del ácido indol acético de primer orden a 287 nm.
- Tabla 13. Concentraciones y Absorbancias del ácido indol acético de primer orden a 291 nm.
- Tabla 14. Concentraciones y Absorbancias del ácido indol acético de segundo orden a 289 nm.
- Tabla 15. Concentraciones y Absorbancias del ácido indol acético de segundo orden a 294 nm.
- Tabla 16. Concentraciones y Absorbancias del ácido indol acético de tercer orden a 287 nm.
- Tabla 17. Concentraciones y Absorbancias del ácido indol acético de tercer orden a 291 nm.
- Tabla 18. Concentraciones y Absorbancias del ácido indol acético de cuarto orden a 289 nm.
- Tabla 19. Concentraciones y Absorbancias del ácido indol acético de cuarto orden a 293 nm.
- Tabla 20. Absorbancias experimentales del ácido giberélico.

Tabla 21. Absorbancias experimentales del ácido indol Acético.

Tabla 22. Resultados obtenidos de las corridas del producto Plentyphos.

Tabla 23. Resultados obtenidos de las corridas del producto Gib-bex.

Tabla 24. Resultados del contenido de ácido giberélico obtenidos de las corridas del producto Fithor.

Tabla 25. Resultados del contenido de ácido indol acético obtenidos de las corridas del producto Fithor.

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Longitud de onda expresada en centímetros.
- Figura 2. Niveles energéticos de una sustancia X.
- Figura 3. Cambios energéticos representados en señales analíticas.
- Figura 4. Derivación de una curva hasta el cuarto orden.
- Figura 5. Técnica para cuantificar utilizando la amplitud.
- Figura 6. Derivación de dos picos solapados.
- Figura 7. Aplicación de la técnica del zero crossing.
- Figura 8. Estructuras de auxinas.
- Figura 9. Estructuras de Giberelinas.
- Figura 10. Espectrofotómetro UV-VIS Thermo Insight Evolution 200.
- Figura 11. Balanza Analítica RADWAG AS220 C2.
- Figura 12. Espectro de barrido del ácido indol acético disuelto en etanol.
- Figura 13. Espectro de barrido del ácido giberélico disuelto en alcohol Isopropílico.
- Figura 14. Espectro de barrido de las hormonas disuelto en etanol:alcohol Isopropílico (3:1).
- Figura 15. Espectros del ácido giberélico de orden cero.
- Figura 16. Espectros del ácido giberélico de primer orden.
- Figura 17. Espectros del ácido giberélico de segundo orden.
- Figura 18. Espectros del ácido giberélico de tercer orden.
- Figura 19. Espectros del ácido giberélico de cuarto orden.
- Figura 20. Espectros del ácido indol acético de orden cero.
- Figura 21. Espectros del ácido indol acético de primer orden.
- Figura 22. Espectros del ácido indol acético de segundo orden.

Figura 23. Espectros del ácido indol acético de tercer orden.

Figura 24. Espectros del ácido indol acético de cuarto orden.

Figura 25. Curva de calibrado del ácido giberélico.

Figura 26. Curva de calibrado del Ácido Indol Acético.

Figura 27. Espectro del producto Plentyphos de segundo orden.

Figura 28. Espectro del producto Gib-bex de segundo orden.

Figura 29. Espectro del producto Fithor de segundo orden.

Figura 30. Comparación entre el espectro de segundo orden y tercer orden del ácido giberélico.

Figura 31. Mezcla de ácido giberélico (AG) y ácido indol acético (AIA) en orden cero y su segunda derivada.

Figura 32. Ficha técnica del producto Plentyphos – Parte 1.

Figura 33. Ficha técnica del producto Plentyphos – Parte 2.

Figura 34. Ficha técnica del producto Plentyphos – Parte 3.

Figura 35. Ficha técnica del producto Gibbex – Parte 1.

Figura 36. Ficha técnica del producto Gibbex – Parte 2.

Figura 37. Ficha técnica del producto Gibbex – Parte 3.

Figura 38. Ficha técnica del producto Fithor – Parte 1.

Figura 39. Ficha técnica del producto Fithor – Parte 2.

Figura 40. Producto Fithor presentación de 1 litro.

Figura 41. Producto Gib-Bex de 1 litro.

Figura 42. Producto Plentyphos de 1 litro.

RESUMEN

En la presente tesis se propone una metodología a través del uso de la espectrofotometría UV-Vis para la determinación de las hormonas ácido indol acético (AIA) y el ácido giberélico (AG) haciendo uso de las técnicas de las derivadas, siendo así que se realizaron pruebas de solubilidad de hormonas, pruebas de derivación de espectros, eliminación de interferentes entre otros. Se definió como solvente una mezcla de etanol:alcohol isopropílico (3:1). El orden de derivada elegido fue el de segundo orden con el cual se realizó la cuantificación. Una vez definido los parámetros de nuestro método procedimos a la realización de las cuantificaciones de tres diferentes productos fertilizantes; Plentyphos, Gib-bex y el producto Fithor de la empresa Comercial Andina Industrial. La obtención de la segunda derivada como primer factor de cuantificación nos llevó a realizar las curvas de calibración, el ácido indol acético (AIA) con un factor de determinación (R^2) de 0.9999 y en el caso del ácido giberélico (AG) con un factor de determinación (R^2) de 0.9976 y así mismo con los resultados de estas curvas se cuantificó las hormonas presentes en los productos antes mencionados, obteniéndose las siguientes concentraciones: Plentyphos 0.207 g/L (AIA), Gib-bex 9.9 g/L (AG) y el Fithor 41.21 g/L (AIA), 42.40 g/L (AG). Los resultados obtenidos son aceptables ya que se encuentran dentro del rango establecido en las fichas técnicas de los productos, de tal forma que podemos concluir que el método propuesto es una alternativa para la cuantificación de las hormonas en mención.

Palabras Clave: fitohormonas, derivadas, espectroscopía, ácido indol acético, ácido giberélico.

ABSTRACT

This research proposes a methodology using the spectrophotometry UV-Vis for the determination of the hormones indol acetic acid (AIA) and gibberellic acid (AG), making use of the techniques of the derivatives. The following tests were performed: solubility of hormones, derivation of spectra and elimination of interferences among others. A mixture of ethanol:isopropyl alcohol (3:1) was defined as a solvent. The second derivative was chosen as the order to quantify. We quantify the three products: Plentyphos, Gib-bex and the Fithor product of the company Comercial Andina Industrial, after having defined the parameters of our method. Obtaining the second derivative as the first quantification factor led us to perform the calibration curves, indol acetic acid (AIA) with a determination factor (R^2) of 0.9999 and in the case of gibberellic acid (AG) with a determination factor (R^2) of 0.9976. Also with the results of these curves, we quantified the hormones present in the products mentioned above, obtaining the following concentrations: Plentyphos 0.207 g/L (AIA), Gib-bex 9.9 g/L (AG) and Fithor 41.21 g/L (AIA), 42.40 g/L (AG). The results obtained are acceptable since they are within the range established in the technical data sheets of the products, in such a way that we can conclude that the proposed method is an alternative for the quantification of the hormones mentioned.

Key Words: Phytohormones, derivatives, spectroscopy, indole acetic acid, gibberellic acid.

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Descripción y Formulación del problema

La agricultura es la actividad tradicional del Perú desde la época prehispánica donde se desarrollaron varios productos de primera importancia que se encuentran hoy en todo el mundo. El Perú es el país de origen del tomate, de la quinua, del frejol, la yuca, de la papa, entre otros. La exportación de productos agrícolas es ahora el tercer sector económico del país delante del textil quedando detrás de la extracción de minerales y de la pesquería industrial.

Desde los años 2000, Perú es el primer exportador mundial de espárragos con un promedio de 100,000 toneladas anual (más de US\$500 millones), delante de China y México.

Por esta razón y adentrándonos a las diferentes técnicas usadas por nuestros agricultores, hoy en día se utilizan formulados químicos y biológicos para ayudar al crecimiento de los diferentes cultivos; uno de ellos son los fertilizantes, con diferentes usos como son de ayuda para el crecimiento, fortalecimiento, abundancia de flores y frutos, entre otros. Es aquí que nos encontramos con el uso de las fitohormonas reguladoras de crecimiento: auxinas y giberelinas.

Hoy en día las técnicas de análisis de este tipo de hormonas son muy complejas más aún si se desean separar, sin embargo para productos con composición conocidas como los fertilizantes que se comercializan en el Perú, Por esto pretendemos hacer uso de una técnica de cuantificación que es a través del uso de las derivadas en espectroscopía UV-Visible.

A pesar que las técnicas de cromatografía son las más usadas en la actualidad, el uso de la espectroscopía UV-Visible nos permite cuantificar las hormonas de crecimiento vegetal, ya que emiten señales a longitudes de onda que se encuentran dentro del rango de trabajo de nuestro Espectrofotómetro UV-Vis. Y a su vez la derivación de espectros nos permitirá eliminar problemas de ruido y ayudará a realizar cuantificaciones múltiples.

En base a lo mencionado anteriormente se ha planteado el siguiente problema:

¿Será posible determinar las concentraciones del ácido indol acético (AIA) y el ácido giberélico (AG) mediante el uso de la metodología de espectroscopia ultravioleta aplicando la técnica de derivadas?

1.2. Antecedentes

A lo largo del tiempo podemos encontrar estudios realizados empleando la espectroscopía Uv visible, así tal tenemos los siguientes antecedentes:

En la medicina también se puede aplicar la técnica de las derivadas como es el caso del reconocimiento y cuantificación de anticuerpos monoclonales, aquí se utilizó la segunda derivada del espectro UV de los anticuerpos monoclonales, obteniéndose resultados confiables y rápidos en comparación a otras técnicas convencionales (Jaccoulet E., Schweitzer A., Toussaint B., Prognon P. y Caudron E., 2018).

El empleo de la espectroscopía derivada en la determinación de almidón en presencia de amilopectina es una técnica comparable con los métodos de calibración directa, a pesar de

contar con interferencias, la técnica de derivadas logró dar resultados más exactos (Carrasqueño A. y Navas P., 2015).

Se empleó el uso de las derivadas en espectroscopía UV-Visible para la determinación de aminoácidos insaturados en suplementos alimenticios, con el fin de calcular múltiples aminoácidos y eliminar los posibles interferentes mediante la derivación (Zambrano A., 2014).

La aplicación de la espectroscopía derivada es empleada para la evaluación de la degradación de compuestos tóxicos como lo es el 2-clorofenol, la derivación fue utilizada para eliminar interferencias y cuantificar concentraciones persistentes y tóxicas para la mayoría de sistemas biológicos (Pérez I., Aguilera I., Casals M., Ábalos A., y Pérez R., 2013).

Para lograr la determinación de vitaminas en productos farmacéuticos, se empleó la espectroscopía derivada, a pesar que las técnicas convencionales son las cromatográficas en esta metodología se realizaron las pruebas estadísticas corroborando que la técnica de derivada es totalmente confiable, del mismo modo se aplicaron las derivaciones para obtener mejores señales para cuantificar y eliminar las interferencias del medio (Tello M., 2006).

En el empleo de nuevas técnicas de cuantificación de proteínas se hizo el empleo de la derivación de los espectros UV Visibles y se utilizaron técnicas de alta presión, obteniéndose de esta manera mejores resultados al momento de la cuantificación (Lange R., y Balny C., 2002).

1.3. Objetivos

Se plantearon los siguientes objetivos generales y específicos respectivamente:

- **Objetivos Generales**

- Determinar las concentraciones del ácido indol acético (AIA) y el ácido giberélico (AG) mediante el uso de la metodología de espectroscopia ultravioleta aplicando la técnica de derivadas en formulados agroquímicos.

- **Objetivos Específicos**

- Obtener el orden de derivada que mejor defina los espectros obtenidos en el análisis del ácido indol acético (AIA) y el ácido giberélico (AG).
- Definir la mejor metodología para el tratamiento de las muestras.
- Realizar la cuantificación de ambas hormonas simultáneamente.

1.4. Justificación

El método de las derivadas por espectrofotometría de UV-Vis, es empleada para aumentar la estructura fina de las curvas espectrales. Consiste en calcular la primera, segunda o derivadas de orden superior de la intensidad o absorbancia respecto a la longitud de onda, lo cual para este método propuesto es muy importante para la obtención de los resultados que se desean obtener.

El conocimiento del contenido de hormonas en los formulados fertilizantes es muy importante debido a su importancia en el control del crecimiento en los diferentes cultivos que se expanden a lo largo de todo el territorio peruano. En muchos casos diversos fabricantes de los fertilizantes indican que sus productos poseen estas hormonas encareciendo los productos, sin embargo en muchos casos esto no se cumple de tal forma que realizar la medición del contenido de las hormonas viene a ser un punto importante

dentro del control de Fertilizantes y como apoyo al agricultor para no ver estropeado sus cultivos y no tener que realizar gastos innecesarios para complementar el déficit de estas hormonas.

Si bien es cierto existen metodologías que analizan a cada una de las hormonas por separado por medio de equipos muy costosos y que a la vez emplean reactivos de alto costo, este estudio llevará a proporcionar el método para realizar un análisis conjunto para obtener resultados rápidos, exactos, precisos y de bajo costo.

1.5. Hipótesis

Para la presente tesis se ha planteado la siguiente hipótesis:

La metodología de espectroscopia ultravioleta aplicando la técnica de derivadas es aplicable para la determinación del ácido indol acético (AIA) y el ácido giberélico (AG).

CAPITULO 2

MARCO TEORICO

2.1. Espectroscopía UV-Visible

La radiación ultravioleta y visible interactúa con la materia que causa las transiciones electrónicas (promoción de electrones desde el estado fundamental a un estado de alta energía). La región ultravioleta cae en el rango entre 190 a 380 nm, y la región visible caída entre 380-750 nm.

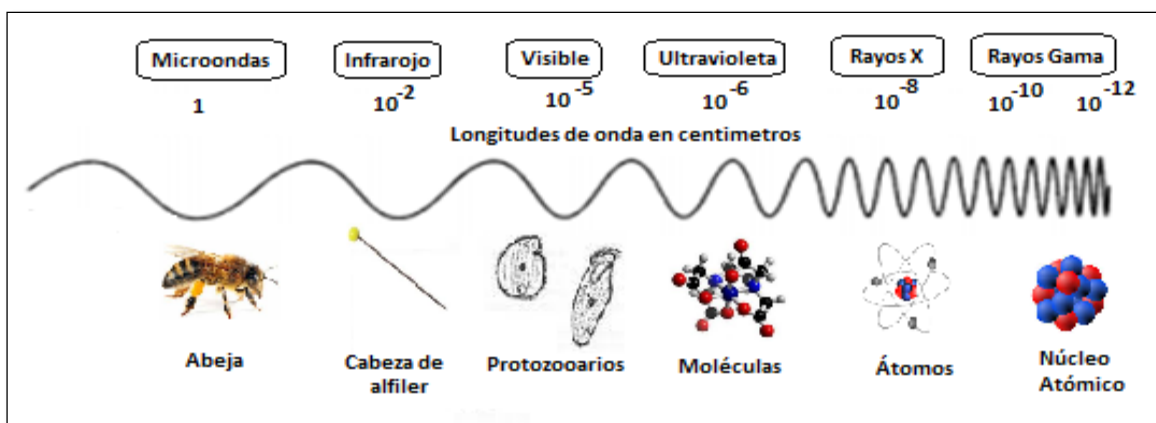


Figura 1. Longitud de onda expresada en centímetros.

- **Transiciones electrónicas:**

Tenemos tres tipos de transiciones electrónicas los cuales se producen por la absorción de radiación ultravioleta o visible, los cuales se dan por la excitación de los electrones externos.

- a) Transiciones del tipo π , σ , y n electrones.
- b) Del tipo de transferencia de carga.
- c) Aquellos en los que intervienen los electrones d y f (no cubiertos en esta unidad)

Debido a la absorción de energía de un átomo o molécula, sus electrones sufren un cambio a nivel energético pasando de un estado basal a la excitación.

Pueden ocurrir fenómenos dentro de una molécula, como lo es la vibración y giros de los átomos que lo conforman. Estos fenómenos pueden pasar en diferentes niveles, los cuales podrían ser considerados como empaquetados en la parte más alta de cada nivel electrónico.

En este punto comentaremos sobre las moléculas orgánicas, las cuales se restringen a ciertos grupos funcionales (cromóforos), que poseen electrones de valencia de energía baja de excitación. La radiación absorbida por este tipo de moléculas es compleja

Se dice compleja debido a que ambos fenómenos de vibración y rotación se superponen en sus transiciones electrónicas, generándose de esta forma una combinación de líneas las cuales se encuentran superpuestas.

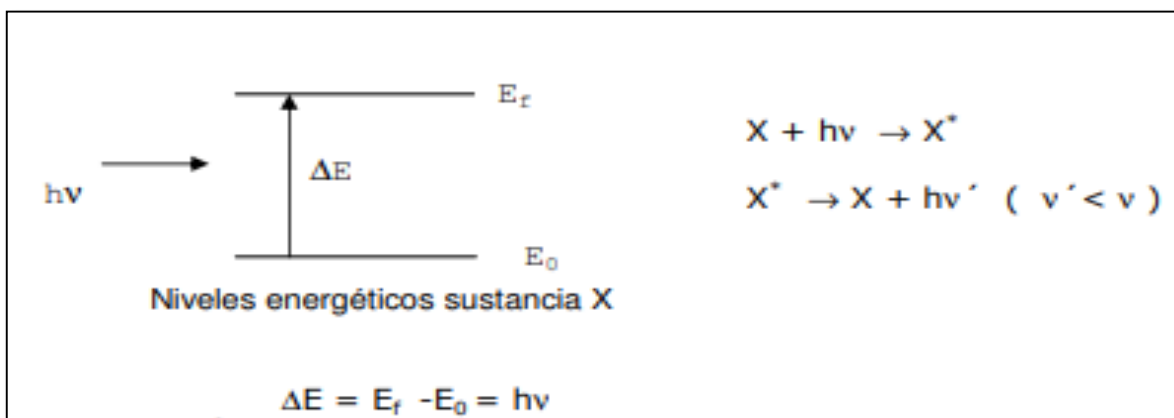


Figura 2. Niveles energéticos de una sustancia X.

ΔE es propio para cada tipo de sustancia, lo cual utilizaremos para realizar un ensayo cualitativo de un activo en una solución cualquiera. De este modo podemos utilizar los resultados obtenidos para realizar cualquier tipo de ensayo cuantitativo, debido a que tenemos que la energía absorbida o transmitida es directamente proporcional a la concentración.

Teniendo en cuenta la ley de Lambert Beer, reafirmamos que la intensidad de luz absorbida o transmitida es directamente proporcional a su concentración.

2.1.1. Ley de Lambert-Beer

Esta Ley nos permite explicar matemáticamente lo que sucede con las moléculas al ser irradiadas con energía, obteniendo así espectros característicos para cada compuesto. De manera general cumple para cada proceso de absorción en cualquier zona espectral, de este modo cada unidad de longitud por la cual pasa la radiación, absorbe la misma fracción de radiación. Entonces, si un haz de luz de tipo monocromática, “ I_0 ”, pasase a través de una materia de espesor, “ l ”, la reducción en la intensidad de luz transmitida, “ I_t ”, sería proporcional al recorrido y a la concentración de la sustancia absorbente, “ c ”.

$$I = I_0 \cdot e^{-\varepsilon \cdot l \cdot c} \quad \dots\dots (I)$$

Se denominará a “ ε ”, como el factor de proporcionalidad que representa la absorptividad molar y que nos brinda una relación entre la probabilidad de la radiación absorbida por parte de la solución en análisis. Así de esta manera aplicaremos los logaritmos para moldear la siguiente ecuación:

$$\text{Log} \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad \dots\dots (II)$$

Tenemos:

$\text{Log} \frac{I_0}{I}$: Absorbancia (A).

Digamos que tenemos una sustancia X, la cual nos emitirá una señal en el rango del ultravioleta, en este caso no poseerá una sola energía debido al tipo de configuración electrónica, pudiendo absorber a diferentes energías y con una distinta eficiencia en cada una, de esta manera es como explicaremos como el espectro de absorción posee curvas con

diferentes amplitudes, es decir señales en diferentes longitudes de onda los cuales forman un espectro.

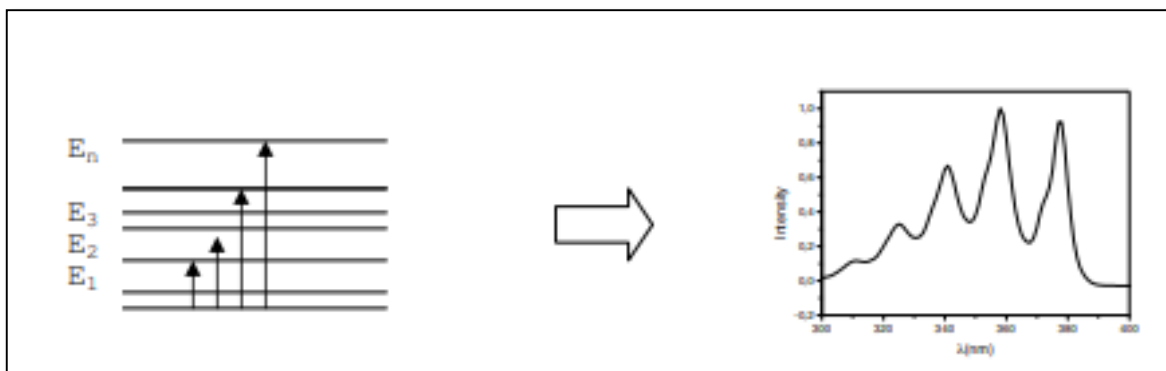


Figura 3. Cambios energéticos representados en señales analíticas.

Cada una de las sustancias posee un espectro de absorción característico, como si fuera una huella digital, el cual se verá afectado por su configuración electrónica de la molécula, átomo o ión y también de las transiciones electrónicas que se puedan dar debido a la radiación que incide sobre ella.

2.2. Aplicaciones de la espectroscopia de absorción

2.2.1. Análisis cualitativo

Podemos definir como cromóforo a una parte de la molécula que cumple con ciertas características y que presentan una absorción aproximada entre 190 y 1400 nm, por ejemplo los grupos carbonilo, nitroso, nitrilo, etc., de esta forma el grupo carbonilo produce que el ácido acético presente un pico de absorción máximo a 279 nm. La intensidad de absorción de los grupos cromóforos varía ampliamente entre uno y otro, así mismo se puede tener que en una molécula existan distintos grupos cromóforos que produzcan señales de absorción con diferentes formas e intensidades y situadas en rangos de longitudes de onda determinadas,

con frecuencia es posible la identificación y detección de estos grupos en la región ultravioleta del espectro.

De esta forma, la mayoría de los miembros de los compuestos que contienen un único grupo cromóforo, poseerán sus bandas de absorción dentro de un rango espectral relativamente pequeño, tomaremos como ejemplo los ácidos carboxílicos saturados, desde el fórmico al esteárico (18 carbonos), poseen señales de absorción en un rango definido entre los 270 y 280 nm aproximadamente. Debido a que puede existir más de un grupo cromoforo en una misma molécula, y esta puede originar algún tipo de interacción entre ellos, se han formulado reglas generales. Por ejemplo:

A) Si los grupos cromóforos se encuentran separados por más de un átomo en la molécula, esto lleva a decir que el espectro obtenido debe ser igual a la suma de los espectros obtenido de cada cromoforo por separado.

B) Si los grupos cromóforos se encuentran en átomos seguidos uno del otro, se ve afectado el máximo de absorción de tal manera que pasa a una longitud de onda mayor y la intensidad de banda se incrementa comparándolos con el espectro de absorción de compuestos conteniendo los mismos cromóforos situados en carbonos no adyacentes. La presencia de grupos conjugados se acompaña usualmente de un desplazamiento del máximo de absorción hacia longitudes de onda mayores, a este desplazamiento se le llama efecto batocrómico.

2.2.2. Análisis cuantitativo

Daremos como definición que el total de luz absorbida por una materia es directamente proporcional al número de moléculas existentes en la misma, es decir, notaremos que existe una dependencia con la concentración del absorbente (A es proporcional a “ c ”, ley de Beer) y del recorrido que el haz luminoso tiene a través de la solución (A es proporcional a l , ley

de Bouguer). La proporción de radiación incidente que es absorbida por cualquier tipo de medio no depende de la potencia radiante y así, tenemos que cada capa absorbe la misma fracción de radiación siempre y cuando sean del mismo espesor. Esta secuencia de relaciones y de anotaciones se expresan a través de la conocida ley de Beer-Lambert-Bouguer, la cual relaciona la energía absorbida y su concentración, la cual viene dada cuando la radiación de la energía absorbida por la sustancia se ve afectada por una radiación monocromática, expresaremos matemáticamente de la siguiente manera:

$$P_{tr} = P_0 10^{-abc} \dots\dots (III)$$

Donde P_{tr} la denominaremos como la potencia de radiación transmitida que atraviesa una solución, P_0 es el potencial de radiación incidente; a, como un coeficiente de la absorción lineal (decimal), y es una característica del absorbente y de aquella longitud producida por la radiación incidente; b, es la longitud de paso de dicha radiación que atraviesa la solución del absorbente y c, representa a la concentración que posee el absorbente.

Teniendo lo siguiente:

$$\text{Log} \left(\frac{P_0}{P_{tr}} \right) = abc ; A = abc \dots\dots (IV)$$

Donde A representa a la absorbancia, normalmente es un numero decimal, e indica la disminución del potencial de radiación con respecto a la absorción. De esta forma encontramos en la ecuación lo siguiente: que si expresamos en moles/litros la concentración obtenida de la sustancia, se convierte en la expresión más conocida:

$A = \epsilon \cdot c \cdot l$; y donde ϵ = coeficiente de absorción molar (lineal) (decimal) ($m^2 \text{ mol}^{-1}$).

C = concentración del absorbente expresada como moles/litro y l = distancia de paso óptico.

Si deseamos cumplir con la ley de Beer, debemos definir las correctamente las condiciones: que la radiación incidente sea una radiación monocromática, tener un medio isótopo,

homogéneo, evitar la luminiscencia, que no sea difusor. Las cubetas de medición deben permitir que el haz de luz pueda atravesar sus paredes y además las caras de la cubeta deben encontrarse paralelamente uniformes.

Debemos elaborar una curva de calibración la cual nos permitirá cuantificar a través de la ecuación obtenida en su construcción, de esta manera podremos obtener la concentración del absorbente.

En los métodos cuantitativos clásicos, normalmente se utiliza la señal de mayor absorbancia, esta señal se encuentra asociada a una longitud de onda, esta longitud es utilizada por dos razones: Primero, al encontrarse en esta longitud la señal de absorbancia más alta, esto nos ayuda a reducir la relación de señal/ruido que podemos encontrar en el espectro, de esta manera obtenemos una mayor sensibilidad. Segundo, si trabajamos con la señal más alta, en este caso la absorbancia no se ve muy afectada con algún posible cambio de longitud, y hasta utilizando espectrofotómetros que poseen baja reproducibilidad de longitud de onda nos brindarían mejores resultados (siempre y cuando el pico máximo no sea demasiado abrupto). Cada vez que aplicamos la Ley de Beer, obtenemos una ecuación lineal la misma que nos permite relacionar las absorbancias con las concentraciones de una solución; sin embargo podemos encontrarnos con algunos casos en los cuales la linealidad se puede ver afectada, y por lo general se trata de desviaciones físicas:

- 1) Cuando la concentración del absorbente es muy elevada.
- 2) La radiación incidente no es monocromática.
- 3) Varía el índice de refracción con la concentración de absorbente.

Desviaciones químicas: Cuando la matriz que contiene a los analitos interfiere dándose interacciones entre ellos, y desviaciones instrumentales, producida por factores físicos como

la dispersión de la radiación, ruidos de fondo por cambios de energía en el equipo, la falta de limpieza o ralladuras en las cubetas, entre otros.

2.2.3. Análisis de mezclas multicomponentes

En espectrometría de absorción hemos asumido que en la determinación de ciertos analitos podemos eliminar otras absorbancias por medio de un blanco.

Ahora, si tenemos una solución con una mezcla de analitos de tal forma que sus señales no se ven afectadas ni superpuestas entonces podríamos analizarlas independientemente.

Sin embargo, en el caso que se superpongan las señales de cada analito, debemos tener en cuenta que las absorbancias se estarían sumando debido a su propiedad aditiva, de tal forma entendemos que a cierta longitud de onda tendríamos una suma de absorbancias de cada analito. Entonces para este tipo de casos que tuviéramos dos analitos y a una misma longitud de onda, expresaríamos matemáticamente la ecuación de la siguiente manera:

$$A = A_1 + A_2; \quad A = a_1 \cdot b \cdot c_1 + a_2 \cdot b \cdot c_2;$$

Tenemos que:

A_1 : Absorbancia del analito 1, A_2 : absorbancia del analito 2

Debemos considerar algunos puntos importantes para poder cumplir con lo mencionado anteriormente:

- a) No haya interacción entre los absorbentes.
- b) Cada componente debe cumplir con la ley de Beer.
- c) Debemos tener como mínimo una señal en la cual difieran ambos analitos.

La resolución de este tipo de sistemas se efectúa haciendo la medición de la absorbancia pero tomando dos señales distintas (longitudes de onda), obteniendo la siguiente expresión:

$$A_{l1} = a_{1l1} \cdot b \cdot c_1 + a_{2l1} \cdot b \cdot c_2$$

multicomponentes, sin embargo estas son aún más complejas. Para realizar este tipo de análisis debemos agregar uno a uno cada analito individual hasta obtener un espectro equivalente al de la mezcla con esta proporción se determinan matemáticamente por técnicas de regresión. Para aplicar este método es necesario que:

- a) Cada analito por separado cumpla con la ley de Beer.
- b) Saber qué tipo de analito compone esta mezcla.
- c) Trabajar con los estándares de cada analito para lograr tener un espectro individual de cada uno con la mejor resolución.

Como observamos este método utiliza espectros, por lo tanto haremos uso de un mayor número de puntos que en la determinación de una mezcla multicomponente clásico. Y es por este mayor número de puntos, que nos permite cuantificar mezclas complejas.

Si queremos explicar de mejor manera esta técnica podemos tomar como ejemplo la cuantificación simultánea que se realizó en la hemoglobina en sangre (cinco derivados) y que fue empleado por Zwart y col. Resolver este tipo de matriz es muy complicado, debido que la hemoglobina: deoxihemoglobina, oxihemoglobina, carboxihemoglobina, metahemoglobina y cianometahemoglobina, emiten señales de absorción máximas, los cuales se encuentran en la banda de Soret en un intervalo de 500 y 630 nm, los cuales presentan interferentes entre ellos teniendo superposiciones. La determinación de una mezcla con varios componentes es, en definitiva, una poderosa técnica y más aún cuando también es utilizada con espectroscopia derivada (Owem T., 1987).

2.3. Derivación de espectros

2.3.1. Propiedades básicas

Denominaremos como espectro derivado al cociente diferencial de la derivación de la expresión matemática de la Absorción de energía con respecto a la longitud de onda $dA/d\lambda$. Realizando la derivación de los nuevos espectros obtenemos la primera derivada $dA/d\lambda$, la segunda $d^2A/d^2\lambda$ y así sucesivamente.

Una curva de absorción simple posee dos puntos de inflexión y un máximo de absorción a longitudes de onda características que no son dependientes de la concentración. En consecuencia, la función $dA/d\lambda$ pasa por un máximo y un mínimo en los puntos de inflexión y vale cero en el máximo. La distancia vertical entre el máximo y el mínimo de la derivada se denomina "amplitud" y suele ser el parámetro analítico que se usa para relacionarlo de forma proporcional con la concentración.

La primera derivada es utilizada para la determinación exacta del máximo de absorción, especialmente cuando se trata de picos anchos.

El espectro de la segunda derivada presenta dos máximos correspondientes a los puntos de inflexión del espectro de la primera derivada, mientras que el máximo de absorción del espectro de orden cero aparece ahora como un mínimo. En una curva de absorción compleja los puntos de inflexión negativos de los picos de absorción coinciden a menudo con los máximos de las bandas individuales de los componentes (Heales S., Bennett J., 1985).

En principio, en la segunda derivada, las alturas entre los máximos (D) son proporcionales a la concentración del analito (figura 4).

La espectrofotometría de derivadas aumenta generalmente la resolución, ya que es sabido que un espectro es la suma de absorbancias de una sustancia en la misma región, bien por las

características del espectrofotómetro, o bien, porque se trata de una estructura fina, y no es posible trabajarlas individualmente. Éste es el caso del óxido de holmio cuyo espectro de absorción presenta dos pequeños máximos muy próximos entre 475.0 y 500.0 nm. Realizando la segunda derivada es posible hacer un mejor análisis.

La diferenciación discrimina bandas estrechas frente a bandas anchas. La amplitud D_n de la derivada de orden n , está relacionada con la n -ésima potencia de la inversa del ancho de banda W del espectro de orden cero.

$$D_n \propto \left(\frac{1}{W}\right)^n$$

Lo cual significa que para dos bandas coincidentes de igual intensidad, la amplitud de la n -ésima derivada de una banda estrecha X es mayor que la de una banda ancha y en un factor $(W_y/W_x)^n$. Esto hace posible la determinación de un componente que presente una banda estrecha en presencia de otro que se encuentra en exceso (matriz), lo que originará, por tanto, un espectro ancho (Kus S. et al., 1996).

2.3.2. Análisis cualitativo por utilización de espectros derivados

Como mencionamos anteriormente un espectro de absorción nos puede ayudar a identificar un analito, solo con la obtención de su máxima absorción, sin embargo en espectros con puntos máximos que no son muy claros y no nos ayudan a determinar una molécula podemos emplear la derivación para así poder estimar un punto máximo o mínimo el cual utilizaremos para identificar a la molécula en estudio.

Cabe destacar que al realizar las derivaciones observaremos una relación que existe en los puntos máximos y mínimos, los cuales no son dependientes de la concentración, obteniendo

de esta manera más puntos a considerar al momento de la identificación cualitativa (Gamboa N., 1991).

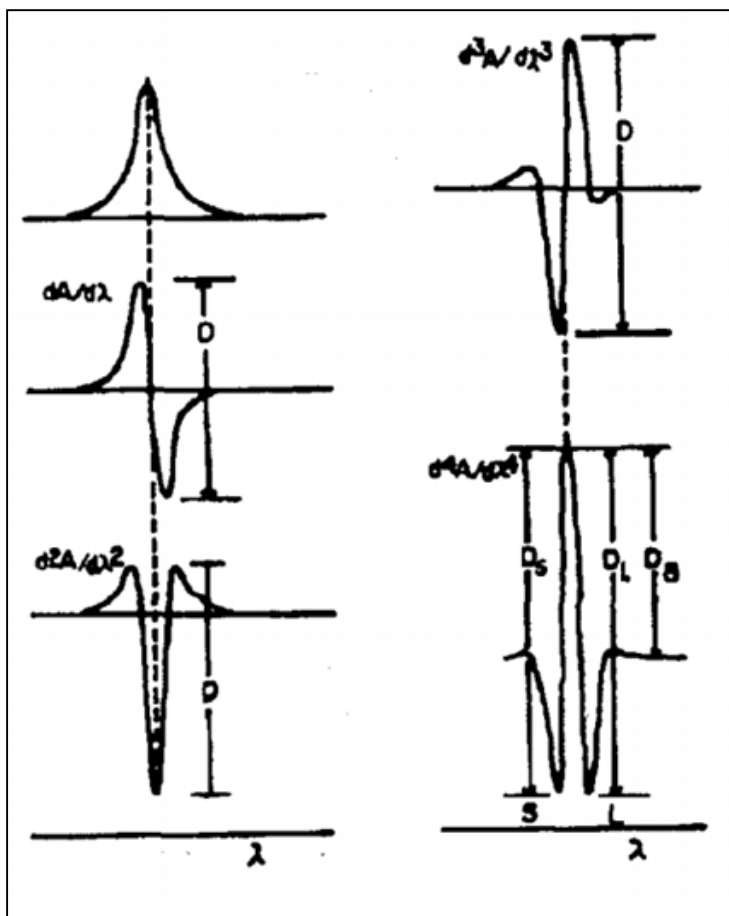


Figura 4. Derivación de una curva hasta el cuarto orden.

Hemos mencionado reiteradamente que cada solución que pueda absorber energía en una longitud dada, cumple con la ley de Beer teniendo como consecuencia que la absorbancia y la concentración son proporcionales ($A = \epsilon \cdot b \cdot C$). Ahora si haríamos que la concentración sea una constante, y la absorbancia de la solución se encuentre en función de la longitud de onda dada, ya que $\epsilon = f(\lambda)$. Realizaríamos la derivación de la función con respecto a la longitud de onda, obtendríamos que:

$$\frac{dA}{d\lambda} = -0.434 \cdot \frac{1}{I} \frac{dI}{d\lambda} = b \cdot C \frac{d\varepsilon}{d\lambda}$$

Suponiendo $dI_0/d\lambda = 0$

Como podremos observar el término $d\varepsilon/d\lambda$ es una variable que emplearemos a lo largo del estudio de nuestra tesis, denominándola como una constante, de esta manera esta constante también puede ser expresada como: $dA/d\lambda = K \cdot C$. Esto quiere decir que cuando utilicemos una longitud de onda cualquiera, la pendiente de esta ecuación (espectro) será una función lineal de la concentración. En el caso de la sensibilidad básicamente no dependerá del valor de ε , lo que pasaría en un estudio de espectrometría normal, en el caso de la derivación dependeremos de la variación de ε con la longitud de onda.

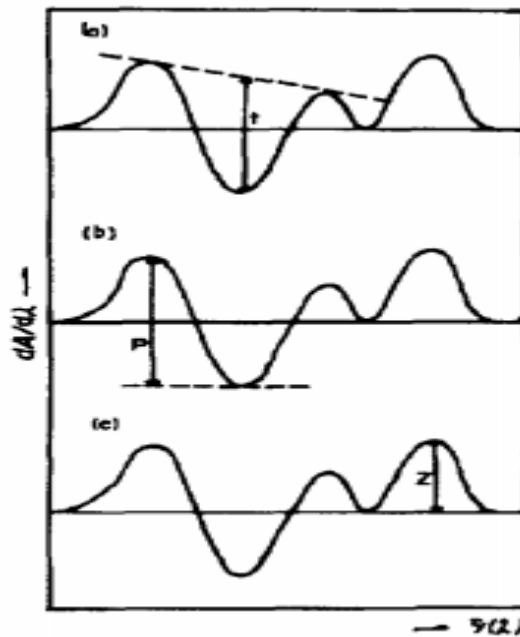


Figura 5. Técnica para cuantificar utilizando la amplitud.

Una vez realizada la derivación de los espectros la elección de la mejor curva obtenida debe ser aquella que cumpla con los siguientes requisitos: que la amplitud de la señal sea proporcional a la concentración del analito, que no sufra cambios en sus características como ancho alto o forma de la curva con respecto a la concentración sino que mantenga su misma forma y que no se vea afectada por las otras curvas dentro del espectro.

2.3.3. Análisis cuantitativo por utilización de espectros derivados

Si queremos determinar el parámetro analítico para el cálculo de nuestras operaciones debemos seguir los siguientes procedimientos:

a) Trazo de la tangente: En este caso trazamos una tangente que pase entre dos de los puntos máximos adyacentes y procedemos a medir en la dirección paralela al eje de ordenadas, la medida que encontramos entre la tangente trazada y el punto mínimo que se encuentra entre los dos puntos máximos. Con este método podríamos eliminar de cierta manera algún tipo de influencia que pueda darnos la absorción de fondo.

b) Distancia entre puntos máximos y mínimos: Este método se basa en realizar la medida de la distancia entre dos puntos: un máximo y un mínimo, que se encuentren adyacentes y que se mantengan proporcionales con respecto a la concentración, este método es muy utilizado para cuantificar ya que nos ayuda a eliminar interferentes producto de turbidez o si hubiese una absorción de fondo que no se encuentre bien definida (Merrick M., Pardue H., 1986).

c) Medida de la altura hasta la línea base. En este método realizaremos la medida de un punto máximo y la línea base (figura 5). Realizando el cálculo de la segunda derivada de la ley de Lambert Beer, tenemos lo siguiente:

$$\frac{d^2A}{d\lambda^2} = 2.303 \cdot C^2 \cdot \lambda^2 \cdot \left(\frac{d\varepsilon}{d\lambda}\right)^2 - 0.434 \cdot \frac{1}{I} \cdot \frac{d^2I}{d\lambda^2} = C \cdot \frac{d^2\varepsilon}{d^2\lambda}$$

Al igual que en la formula anterior tendremos que $d^2\varepsilon/d\lambda^2$ para una longitud especifica será constante. En este espectro que ahora tendrá dos máximos y un mínimo adyacente, se cumplirá que la amplitud de los picos obtenidos serán proporcionales a la concentración de la solución en estudio (Seco L., 1995).

2.4.Aspectos importantes en el análisis de derivación de espectros

2.4.1. Efecto de la derivación sobre los picos de absorción solapados

Las ventajas que se obtienen en la derivación de los espectros con respecto a un espectro simple ya han sido mostrados a lo largo de la teoría antes mencionada, sin embargo todo esto cambia de manera radical cuando tenemos dos picos de absorción solapados en el espectro de orden cero. Si bien es cierto este traslape complica la derivación no la hace imposible, de esta manera observaremos que derivando este tipo de espectros solapados podremos utilizar alguna característica que no será útil en la cuantificación, por ejemplo podemos encontrar pequeños hombros los cuales pueden servir para identificar y hasta para cuantificar a los analitos. De la misma manera también encontraremos concentraciones pequeñas de componentes en la solución que pueden absorber en la misma zona, los cambios que podemos encontrar son el número, la posición o la forma de los máximos y mínimos presentes en el espectro derivado. Lo mencionado anteriormente podremos observarlo gráficamente en la figura 6. De esta manera podemos concluir que el uso de la derivada en un espectro solapado puede ayudar en la determinación de la concentración de un analito, ahora se han realizado algunos estudios y se ha determinado que la primera derivada es la más adecuada en estos casos ya que se encuentra con menor error sistemático (Walters M., Thorton D., 1986).

2.4.2. Factores que interfieren al cálculo de derivadas

Siempre que empleamos la derivación de un espectro, lo que buscamos es reducir al máximo la relación de señal/ruido. La ecuación antes señalada, indica que el ruido aumentará conforme lo haga el orden de la derivada. Esta disminución de la relación señal/ruido, se puede obviar promediando el cálculo de la derivada sobre una zona de longitudes de onda que sea grande comparada con la estructura del ruido, esto es empleando un (incremento de longitud de onda) mayor para calcular la derivada. Sin embargo, al aumentar el intervalo de longitudes de onda la derivada estará cada vez más distorsionada. A continuación, se comentarán estos dos aspectos, la distorsión y la relación señal/ruido (Zwart A., et al., 1984).

2.4.2.1. Distorsión

Cuando se tiene una curva que ha sido derivada en base a cálculos realizados bajo un incremento de longitud de onda finito, podemos encontrar una disminución de la señal derivada y una disminución en la resolución los cuales llevan a una distorsión. Vamos a notar que la disminución es considerable en la señal derivada esto lo podremos definir mejor obteniendo el factor de distorsión $F_{n,\lambda}$, el cual se define como la máxima medida obtenida de máximo a mínimo calculada con una longitud de onda finita ($\Delta\lambda$) dividida por la calculada exactamente ($d\lambda$):

$$F_{n,\lambda} = \frac{H_{n,\lambda}}{H_n} d\lambda$$

Se debe tener en cuenta que la distorsión que se pueda originar en la derivación no influye en la linealidad, pues λ^n es un operador lineal.

2.4.2.2. Relación señal-ruido

Al hablar de la relación de señal/ruido (S/N), notaremos que conforme el orden de la derivada aumente la relación S/N disminuirá. De otro lado podemos definir al ruido presente en un espectro normal como la desviación estándar producida por la absorbancia del blanco ϑ_0 . Para una n-ésima derivada, la desviación estándar, ϑ_n , se calcula a partir de ϑ_0 , empleando las reglas de propagación de errores. Debemos tener en cuenta que la forma del espectro influenciará bastante en la relación señal/ruido. Asumamos que la banda es de tipo gaussiana y que la relación S/N es 1 para el espectro de orden cero, en el espectro de primer orden sería $2.02/M$, para el de segundo orden $3.26/M^2$, el de tercer orden $8.10/M^3$, el cuarto orden $17.8/M^4$, etcétera, definiremos a M como la cantidad de puntos a mitad de altura en el pico (Seco L., 1995).

Debido a la reducción de la relación S/N, Al aplicar las derivadas empleamos técnicas para controlar el incremento del ruido estas son de filtrado y suavizado. El proceso de suavizado supone la convolución de la serie de datos mediante una función de filtrado, función que consiste en un conjunto de coeficientes de peso. Los diferentes métodos de suavizado o filtrado existentes difieren en la forma de cálculo de los coeficientes.

El efecto de suavizado depende de dos variables:

- a) la razón de suavizado, que es el cociente de la anchura del pico suavizado con el número M de puntos de anchura a mitad de altura.
- b) Del número de veces que se efectúa el suavizado.

El cociente de la relación S/N de n-ésima derivada no suavizada $(RSN)_n$, a la relación S/N normal no suavizada $(RSN)_0$ viene dado por:

$$\frac{(RSN)_n}{(RSN)_0} = \alpha_n \cdot C_n \cdot r^{(n+0.5)} \cdot \sqrt{M}$$

donde C_n , es una constante que aumenta con el orden de la derivada y α_n es el factor de atenuación de la n-ésima derivada para un cociente de suavizado r .

Los cocientes de la relación S/N se incrementan con el valor de r , pero tienden a converger a altos valores. En consecuencia la disminución de la relación S/N habitualmente observada al diferenciar, se puede obviar si se suaviza suficientemente (Zwart A., et al., 1984).

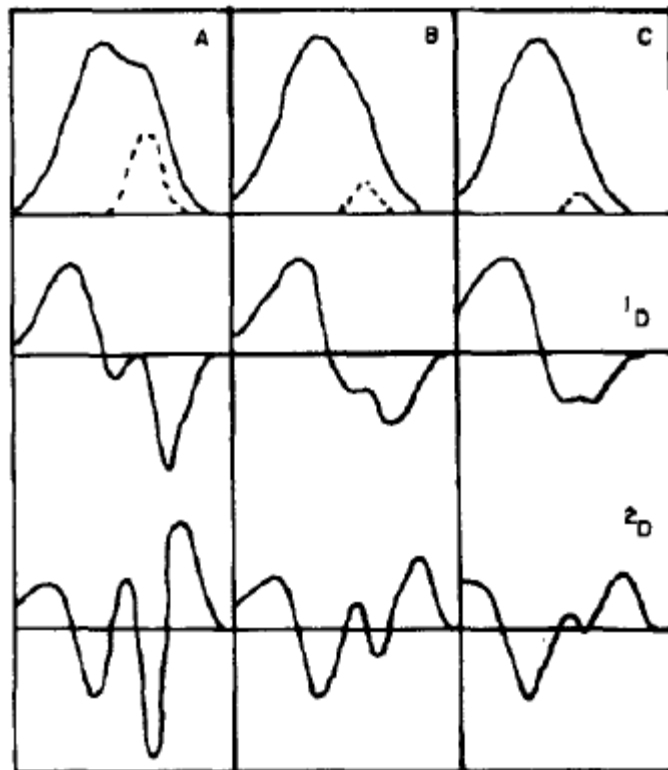


Figura 6. Derivación de dos picos solapados.

2.5. Ventajas de la derivación de espectros

2.5.1. Determinación de la longitud de onda máxima

La primera derivada del espectro es muy útil para determinar la posición exacta de los máximos de absorción del espectro normal. Si el espectro se presenta como una banda ancha, la posición del máximo sólo se fija de manera aproximada; sin embargo, en el espectro derivado, el máximo viene determinado exactamente por el corte con el eje de abscisas. En la práctica, puede ser necesario corregir un pequeño desplazamiento de longitud de onda dependiendo de las condiciones de registro utilizadas (Lopez P. y Lopez L., 1993).

2.5.2. Resolución de los espectros mejorados

La estructura fina de un espectro, que normalmente es difícil de ver en un espectro de orden cero, suele resolverse mejor en espectros derivados. Suele ser más conveniente emplear la segunda derivada ya que los máximos y mínimos del espectro normal y los de la segunda derivada aparecen casi a las mismas longitudes de onda y la estructura fina del espectro se pone mejor de manifiesto que en la primera derivada.

2.5.3. Análisis en muestras turbias

Las disoluciones turbias presentan habitualmente un aumento continuo de absorbancia hacia longitudes de onda más cortas y no originan ninguna variación espectral apreciable en la primera y segunda derivada. Al operar con espectros derivados de muestras turbias, se elimina el efecto de la absorción de fondo debido a la turbidez, aunque hay que mantener ésta a un nivel razonable (Parks J., 1985).

2.5.4. Cuantificación de soluciones con mezcla de varios componentes

Es su aplicación más importante y generalizada, como se pondrá de manifiesto posteriormente. La aplicación cuantitativa de máximos solapados es difícil sobre todo si son pequeños en relación con el espectro total. Sin embargo, la espectroscopía derivada permite su análisis con errores sistemáticos aceptables.

La espectroscopía de derivadas permite determinar sustancias con bandas de absorción relativamente estrechas que estén solapadas con una banda ancha de un segundo componente. Se supone que el componente que se desea determinar sólo sea visible en el espectro de la mezcla por un pequeño pico o un hombro. La determinación de un componente por espectroscopía convencional en estas condiciones sólo puede efectuarse aceptando grandes errores sistemáticos. La utilización de la derivada de un espectro permite, bajo ciertas condiciones, hacer determinaciones cuantitativas con errores pequeños.

Se han empleado diversos métodos con objeto de resolver mezclas. En unos casos se ha propuesto medir a una longitud de onda a la cual no contribuya el compuesto interferente. En otros, se resuelve el problema planteando un conjunto de ecuaciones de cuya solución se obtengan las concentraciones deseadas. (Zwart A., et al., 1984).

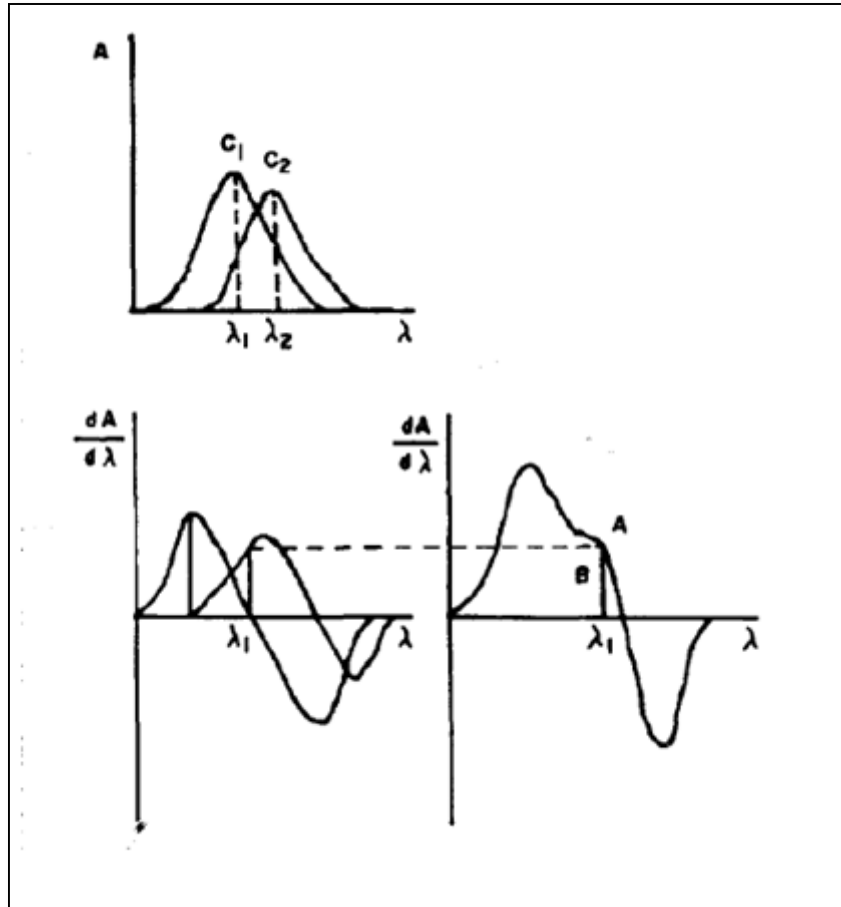


Figura 7. Aplicación de la técnica del zero crossing.

2.5.4.1. Técnica para medición: zero-crossing

Esta técnica de medida utiliza el valor absoluto del espectro derivado del orden que se esté utilizando, a un valor de abscisa correspondiente a una longitud de onda a la que presente valor cero el espectro derivado del componente cuya interferencia se desee evitar. Las medidas realizadas a esa longitud de onda en el espectro mezcla podrán ser función solamente de la concentración del componente que se analiza (Taulier A., Levillain P., Lemonnier A., 1987)

Si se considera una mezcla de dos componentes 1 y 2 que se encuentran en concentración C_1 y C_2 . Como la absorbancia es una propiedad aditiva, se cumplirá:

$$A_1 = \varepsilon_1 \cdot C_1 \quad \text{y} \quad A_2 = \varepsilon_2 \cdot C_2$$
$$A = \varepsilon_1 \cdot C_1 + \varepsilon_2 \cdot C_2, \quad \text{si } b = 1$$

siendo ε_1 y ε_2 las absorptividades molares de las sustancias respectivas. Si se derivan respecto a la longitud de onda, se obtiene la primera derivada del espectro suma, es decir:

$$\frac{dA}{d\lambda} = C_1 \cdot \frac{d\varepsilon_1}{d\lambda} + C_2 \cdot \frac{d\varepsilon_2}{d\lambda}$$

Es decir, la pendiente de la curva espectral de la mezcla, es la suma de las pendientes individuales de cada componente. Si se opera a una longitud de onda tal que se verifique que $d\varepsilon_1/d\lambda = 0$, es decir, a la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción del componente 1, se podrá determinar la concentración del componente 2. En efecto, en este caso se cumplirá que:

$$\frac{dA}{d\lambda} = C_2 \cdot \frac{d\varepsilon_2}{d\lambda}$$

El único requisito para la determinación, es que las longitudes de onda correspondientes a los máximos de absorción de los dos componentes estén suficientemente diferenciadas (figura 7).

Operando a la longitud de onda λ_1 la medida de la distancia AB permite determinar la concentración C_2 . Un razonamiento análogo, permite determinar la concentración C_1 , o bien, utilizar la segunda derivada del espectro suma. La exactitud conseguida en la mezcla de componentes, depende de los parámetros siguientes:

- a) Relación de la altura de la banda que interfiere y de la banda de interés analítico.
- b) Lo mismo respecto a la anchura medida.
- c) Separación entre los máximos de absorción de los componentes.

2.5.4.2. Método de derivadas de espectros divididos

Recientemente se ha obtenido una nueva forma de cálculo por Salinas, Berzas y Espinosa-Mansilla, la cual se obtiene operando los cocientes de dos espectros de absorción. Como requisito debemos tener que se cumpla la ley de Lambert Beer, ($b=1$), entonces tenemos:

$$A_{1,\lambda} = \varepsilon_{1,\lambda} \cdot C_1 + \varepsilon_{2,\lambda} \cdot C_2$$

Así tenemos la siguiente descripción:

$A_{1,\lambda}$: Absorbancia de la mezcla a una cierta longitud de onda.

$\varepsilon_{1,\lambda}$ y $\varepsilon_{2,\lambda}$: Absortividades molares

Si la anterior ecuación se divide por la ecuación del espectro de una disolución patrón de 1, de concentración C_1^0 , Tendríamos lo siguiente:

$$\frac{A_{1\lambda}}{\varepsilon_{1,\lambda} \cdot C_1^0} = \frac{C_1}{C_1^0} + \frac{\varepsilon_{2,\lambda} \cdot C_2}{\varepsilon_{1,\lambda} C_1^0}$$

que se puede simplificar en:

$$\frac{A_{1,\lambda}}{\varepsilon_{1,\lambda}} = C_1 + C_2 \cdot \frac{\varepsilon_{2,\lambda}}{\varepsilon_{1,\lambda}}$$

Representando $A_{1,\lambda}/\varepsilon_{1,\lambda}$, en función de $\varepsilon_{2,\lambda}/\varepsilon_{1,\lambda}$ se obtiene una línea recta. La ordenada en el origen da el valor de C_1 y la pendiente C_2 .

También se puede calcular la concentración del componente 2 en presencia de 1, utilizando la primera derivada de la ecuación anterior:

$$\frac{d}{d\lambda} \left(\frac{A_{1,\lambda}}{\varepsilon_{1,\lambda} \cdot C_1^0} \right) = \left(\frac{C_2}{C_1^0} \right) \frac{d}{d\lambda} \left(\frac{\varepsilon_{2,\lambda}}{\varepsilon_{1,\lambda}} \right)$$

En la siguiente ecuación tenemos que la derivada del cociente de espectros para la mezcla Ecuación que señala que la derivada del cociente de espectros para la mezcla sólo depende de los valores de C_2 y C_1^0 y es independiente del valor de C_1 en la mezcla.

Para establecer la curva de calibración, se registran y almacenan espectros de disoluciones de diferentes concentraciones de 2 y el espectro de una disolución de 1 pura, de concentración C_1^0 . Las amplitudes para 2 serán entonces divididas por las correspondientes de 1 para cada longitud de onda, operando como antes se ha dicho; esto es, diferenciando el cociente de espectros así obtenidos, y representando para una determinada longitud de onda frente a C_2 . Análogamente se puede calcular el componente 1 (Mason W. and Henry R., 1980).

2.6. Fitohormonas

Vinculadas con todas las respuestas morfogénicas durante la ontogenia de las plantas, son relativamente escasas en número. Un análisis conjunto de todas ellas, desde su descubrimiento en la década de 1930, se resumen de la siguiente manera:

- Como se mencionó son pocas (menor a diez), se encuentran sin embargo en todas las plantas terrestres y acuáticas de aguas dulces, de diferentes formas, hábitats, ciclos y

formas de vida, ya sea en plantas geófitas, arbustivas como igualmente en árboles de gran altura y en todas las especies distribuidas en las más diferentes familias botánicas.

- La interacción de las fitohormonas permite regular todas las respuestas de crecimiento y desarrollo durante la ontogenia de las plantas.
- Se trata de compuestos de estructura química relativamente simple; que no cuentan con grupos proteicos asociados. Uno de ellos, el etileno, es además de naturaleza gaseosa.
- Pueden generar diversas respuestas en las plantas, no necesariamente son de respuesta específica, con lo cual podremos observar diversos efectos a corto o largo plazo.
- En algunos casos, la presencia y acción conjunta de dos fitohormonas (por ejemplo auxinas y citocininas) puede inducir y fijar un tipo determinado de expresión morfogénica de acuerdo a los niveles relativos entre sí, o de cada una de ellas, en un tejido. Así por ejemplo, auxinas y citocininas, de acuerdo a su nivel relativo pueden conducir a la formación de brotes, alternativamente de raíces y/o a la proliferación de masas celulares sin mayor organización (Bak S., et al., 2001).
- Algunas parecen tener sitios o receptores comunes a nivel de membrana.
- Existen compuestos denominados “reguladores de crecimiento”, que pueden ser de naturaleza química diferente a algunas hormonas y/o “desconocidas o nunca codificadas” por el metabolismo celular, que pueden igualmente desarrollar efectos semejantes a hormonas endógenas naturales. Algunas de ellas provocan respuestas más intensas que los compuestos naturales a igual concentración molar. Al mismo tiempo algunas de estas sustancias sintéticas de acción afín también pueden ser reconocidos por receptores específicos de hormonas naturales; por ejemplo: auxina y reguladores no naturales del “tipo auxina” (Jordán M. y Casaretto J., 2006).

2.6.1. Auxinas

Las auxinas fueron las primeras fitohormonas identificadas y es precisamente el ácido indol acético (AIA), la principal auxina endógena en la mayoría de las plantas. La mayoría de las moléculas que integran este grupo son derivados indólicos, aunque también se encuentran algunos compuestos fenoxiacéticos, benzoicos o picolínicos con actividad auxínica.

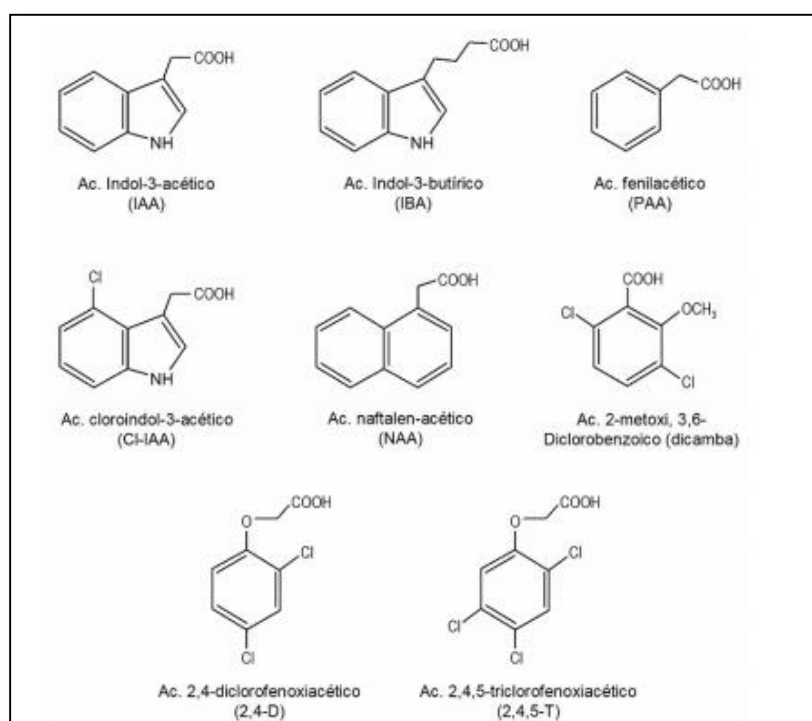


Figura 8. Estructuras de auxinas.

Las auxinas se encuentran en la planta en mayores cantidades en las partes donde se presentan procesos activos de división celular, lo cual se relaciona con sus funciones fisiológicas asociadas con la elongación de tallos y coleoptilos, formación de raíces adventicias,

inducción de floración, diferenciación vascular, algunos tropismos y promoción de la dominancia apical

Dado que los niveles endógenos de auxina son mucho mayores en tejidos jóvenes, es razonable sospechar que éste es su sitio de síntesis; sin embargo, esta hipótesis no ha podido ser probada, debido a que las vías de biosíntesis aún no están completamente entendidas, pues se conocen múltiples y complejas vías de síntesis, algunas dependientes del triptófano y otras independientes de este amino ácido, sin que en la actualidad se haya podido establecer ninguna vía completa de síntesis de auxinas. Por el contrario, se tiene suficiente certeza sobre sus roles fisiológicos, sus vías de señalización y sus mecanismos de transporte, pero aún se desconoce cómo lo produce la planta. En los últimos avances que se han hecho, se han descubierto varios genes claves en la biosíntesis de auxinas, pero aún se requiere integrar estudios genéticos con análisis bioquímicos para llenar los vacíos que subsisten (Garay A. et al., 2014).

2.6.1.1.Efectos fisiológicos de las auxinas

- Crecimiento y formación de raíces.
- Regulación de tropismos.
- Dominancia apical.
- Abscisión de órganos.
- Desarrollo de flores y frutos.
- Diferenciación vascular.

2.6.1.2.Mecanismos de acción

- Crecimiento y elongación celular.

2.6.2. Giberelinas

Las giberelinas (GAs) son hormonas de crecimiento diterpenoides tetracíclicas involucrados en varios procesos de desarrollo en vegetales. A pesar de ser más de 100 el número hallado en plantas, sólo son unas pocas las que demuestran actividad biológica. Su descubrimiento en plantas se remonta a la época de los años 30, cuando científicos japoneses aislaron una sustancia promotora del crecimiento a partir de cultivos de hongos que parasitaban plantas de arroz causando la enfermedad del “*bakanae*” o “subida de las plantas”. El compuesto activo se aisló del hongo *Gibberella fujikuroi* por Eichi Kurosawa en 1926 por lo que se denominó “giberelina”. El efecto del hongo sobre las plantas afectadas consistía en un notable incremento en altura aunque con fuerte merma en la producción de grano. El mayor crecimiento se debió al alto contenido de este factor de crecimiento producido por el ataque fúngico (Ortega L. et al., 2005).

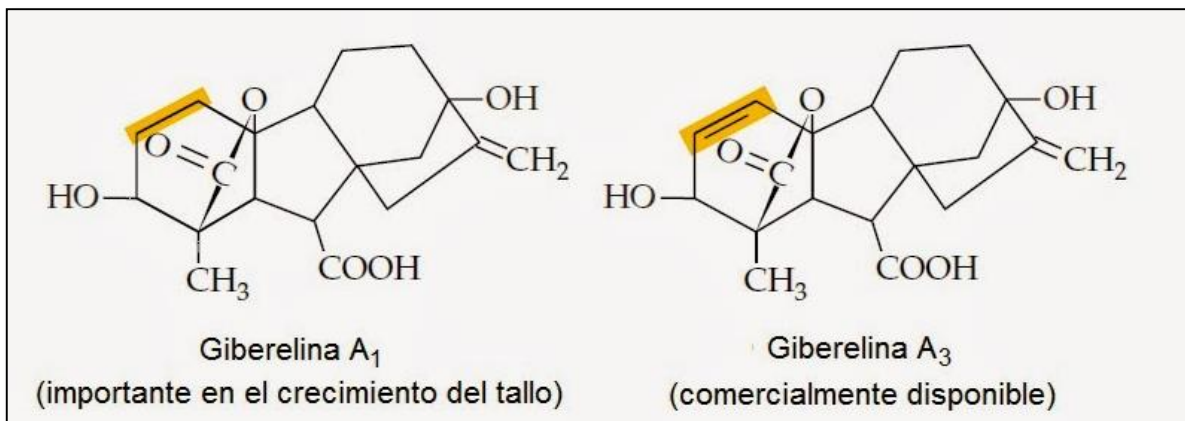


Figura 9. Estructuras de Giberelinas.

2.6.2.1.Efectos fisiológicos

- A nivel de la elongación en tallos
- A nivel de la movilización de reservas en semillas al inicio del proceso de germinación.

CAPITULO 3

METODO

3.1. Tipo de Investigación

Debido a que nuestro objetivo principal se basa en resolver problemas prácticos utilizando teorías existentes, definiremos nuestro tipo de investigación como:

- Investigación experimental.

3.2. Variables

3.2.1. Variables Independientes

- Orden de la derivada

- Resolución del espectro

3.2.2. Variables Dependientes

- Concentración de las hormonas reguladoras de crecimiento: ácido indol acético y ácido giberélico.

- Longitud de onda.

3.3. Población y Muestras

3.3.1. Población

El universo de la investigación está conformado por los diferentes formulados fertilizantes reguladores de crecimiento que se encuentran en el mercado peruano.

3.3.2. Muestra

Reguladores de crecimiento en líquidos solubles comercializados en Lima Metropolitana.

Para la presente tesis se han considerado los siguientes productos: Plentiphos, Gibbex y Fithor de la empresa Comercial Andina Industrial.

3.4. Instrumentos

3.4.1. Materiales

Para realizar las diferentes pruebas en el laboratorio como es el caso de las preparaciones de cada solución se utilizarán los siguientes materiales:

- Fiolas calibradas (1000mL, 100mL, 50mL)
- Pipetas volumétricas (0,5mL, 1mL, 2mL, 3mL, 4mL, 6mL, 7mL, 8mL, 9mL, 10mL, 15mL, 20mL, 25mL, 30mL)
- Vasos precipitados (50 mL, 100 mL)
- Celdas de cuarzo
- Embudo de vidrio
- Papel watman N°42
- Espátula metálica

3.4.2. Equipos

Se emplearon los siguientes equipos en el desarrollo de la parte experimental.

3.4.2.1. Espectrofotómetro

El análisis se realizó en un espectrofotómetro UV-VIS de doble haz, marca Thermo Insight 200 el cual fue prestado por el laboratorio de Química Instrumental de la Universidad Nacional Federico Villarreal. Las muestras fueron analizadas por un barrido en el espectrofotómetro realizado en un rango de 248 a 320 nm.



Figura 10. Espectrofotómetro UV-VIS Thermo Insight Evolution 200.

3.4.2.2. Balanza Analítica

El adecuado pesaje de los estándares y las muestras fueron realizados en una balanza analítica de 4 decimales marca RADWAG AS 220 C2 con una carga máxima de 220 gramos y una exactitud de 0,1 miligramo.



Figura 11. Balanza Analítica RADWAG AS220 C2.

3.4.3. Estándares y Muestras Comerciales

a. Estándares de referencia:

Ácido Giberélico 99.8%, lote 22012018

Ácido Indol Acético 99.0%, lote 17082017

b. Muestras Comerciales

Se realizó el estudio en cuatro muestras comerciales; Plentypfos Concentrado Soluble presentación de 1 litro (lote EC01180231), Gib-bex Concentrado Soluble presentación de 1 litro (lote EC01180231 y Fithor Concentrado Soluble presentación de 1 litro (lote EC10170321).

3.5. Procedimientos

3.5.1. Muestreo

Para las muestras analizadas se han considerado los siguientes principios:

Número de Lote, Fecha de Fabricación, Vencimiento y Presentación.

Debido que los productos son líquidos y son muestras representativas de lotes de producciones masivas se procedió a tomar por número de lote 10 muestras de diferentes envases.

3.5.2. Evaluación del solvente adecuado

Se preparó soluciones de las hormonas en agua, alcohol etílico, alcohol Isopropílico y con una mezcla de alcohol etílico: alcohol Isopropílico (3:1), para esto se pesó 0.25 gramos de ácido giberélico y se utilizó 100 mililitros de cada solución antes mencionada. Luego se pesó 0,01

gramos de ácido indol acético y se disolvió de la misma manera con cada solución. Se revisó el parámetro de la solubilidad y la resolución que brinda el equipo con cada tipo de solvente.

3.5.3. Preparación de las soluciones stock

a. Solución stock de Ácido Giberélico 2500 mg/L

Se pesó 2,505 gramos del estándar de ácido giberélico y se llevó a una fiola calibrada de 1000 mL, se agregó la mezcla de alcoholes etanol: Isopropílico (3:1) y una vez enrazada la fiola se procedió a agitar para homogenizar la solución, cuando solubilizó el total del estándar se procedió a trasvasar a un recipiente de vidrio ámbar, se utilizó un embudó y un papel watman N° 42 para filtrar posibles impurezas, esta solución fue rotulada y guardada a una temperatura de 20 °C.

b. Solución stock de Ácido Indol Acético 100 mg/L

Se pesó 0,1010 gramos del estándar de ácido indol acético y se llevó a una fiola calibrada de 1000 mL, se agregó la mezcla de alcoholes etanol: Isopropílico (3:1) y una vez enrazada la fiola se procedió a agitar para homogenizar la solución, cuando solubilizó el total del estándar se procedió a trasvasar a un recipiente de vidrio ámbar, se utilizó un embudó y un papel watman N° 42 para filtrar posibles impurezas, esta solución fue rotulada y guardada a una temperatura de 20 °C.

3.5.4. Preparación de las curvas de calibrado

Con las soluciones stock preparadas de ácido giberélico de 2500 mg/L y ácido indol acético 100 mg/L, se procedió a realizar las curvas de calibrado.

a. Ácido Giberélico

Se preparó 10 soluciones de ácido giberélico con las siguientes concentraciones: 1000 mg/L, 1100 mg/L, 1150 mg/L, 1200 mg/L, 1250 mg/L, 1300 mg/L, 1350 mg/L, 1400 mg/L, 1450 mg/L y 1500 mg/L. Para esto se utilizaron pipetas volumétricas y fiolas calibradas. Para seguir la misma secuencia de las muestras se filtraron cada una de las soluciones con papel watman N°42.

b. Ácido Indol Acético

Se preparó 10 soluciones de ácido indol acético con las siguientes concentraciones: 16 mg/L, 18 mg/L, 20 mg/L, 22 mg/L, 24 mg/L, 26 mg/L, 28 mg/L, 30 mg/L, 32 mg/L y 34 mg/L. Para esto se utilizaron pipetas volumétricas y fiolas calibradas. Para seguir la misma secuencia de las muestras se filtraron cada una de las soluciones con papel watman N°42.

3.5.5. Acondicionamiento de las muestras comerciales

a. Plentyphos

Se tomó 12 mL del producto con pipetas volumétricas de 10 mL y 2 mL, y se llevó a una fiola de 100 mL. Se usó la solución de etanol:Alcohol Isopropílico(3:1) para enrazar la fiola. Para ser llevado a lectura la solución obtenida se filtró con embudo de vidrio y papel watman N°42.

b. Gib-bex

Se tomó 12 mL del producto con una pipeta volumétrica 10 mL y 2 mL, se llevó a una fiola de 100 mL. Se usó la solución de etanol:Alcohol Isopropílico(3:1) para enrazar la fiola. Para ser llevado a lectura la solución obtenida se filtró con embudo de vidrio y papel watman N°42.

c. Fithor

Se tomó 0,5 mL del producto con una pipeta volumétrica de 0,5 mL y se llevó a una fiola de 1000 mL. Se usó una solución de etanol:alcohol isopropílico (3:1) a la cual se le agregó 1,22 gramos de ácido giberélico como adición estándar. Para ser llevado a lectura la solución final se filtró con embudo de vidrio y papel watman N° 42.

3.5.6. Procedimiento de lectura en el espectrofotómetro UV-Visible

- a) Se verificó que las condiciones ambientales se encuentren óptimas para el buen funcionamiento del equipo.
- b) Se encendió el sistema eléctrico, el estabilizador del espectrofotómetro UV-VIS.
- c) Seguidamente, se procedió a encender el espectrofotómetro y la computadora para ingresar al software.
- d) Una vez dentro del software se observó si el equipo había realizado su verificación interna correctamente buscando el icono de check en color verde en la parte inferior de la ventana del software.
- e) Luego de confirmar la verificación interna, se realizó una corrección de línea base, presionando el botón “Base Line”, con esta opción nos ayudamos a reducir el ruido producido por las condiciones internas o externas al equipo.
- f) Terminado los pasos anteriores se empezó con las mediciones, antes de correr una muestra primero se colocó un blanco que representa los solventes utilizados para disolver los analitos a determinar, y finalmente se corrieron las muestras problemas.

3.5.7. Derivatización de los espectros de absorbancia

Con los espectros obtenidos se procedió a realizar las derivadas de cada una de las hormonas.

Se derivó los espectros secuencialmente hasta llegar a la cuarta derivada con el fin de encontrar la mejor resolución y la mejor posición del pico referente para la cuantificación.

Para las muestras se realizó la misma secuencia y se cuantificó en base a la derivada elegida.

CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1. Evaluación del solvente adecuado

Una vez realizadas las pruebas de solubilidad y lecturas en el espectrofotómetro se obtuvieron los siguientes resultados con cada solvente:

- **Agua**

Ácido Giberelico: Insoluble en agua

Ácido Indol Acético: Parcialmente soluble en agua

Espectro de Barrido: No determinado

Tiempo de disolución: No determinado

- **Etanol**

Ácido Giberelico: Soluble

Ácido Indol Acético: Soluble

Espectro de Barrido: Ver figura 12.

Tiempo de disolución: 5 minutos

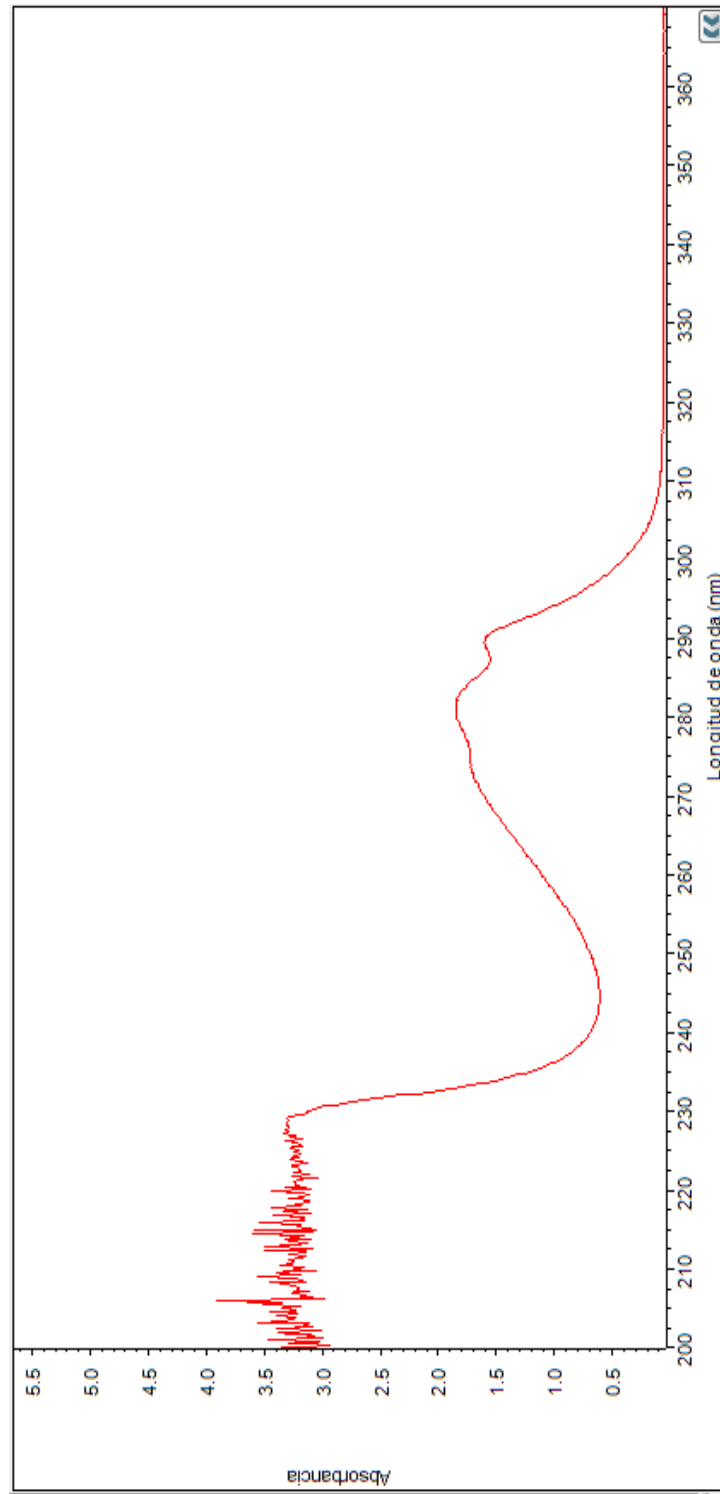


Figura 12. Espectro de barrido del ácido indol acético disuelto en etanol.

- **Alcohol Isopropílico**

Ácido Giberélico: Soluble

Ácido Indol Acético: Soluble

Espectro de Barrido: Ver figura 13.

Tiempo de disolución: 20 minutos

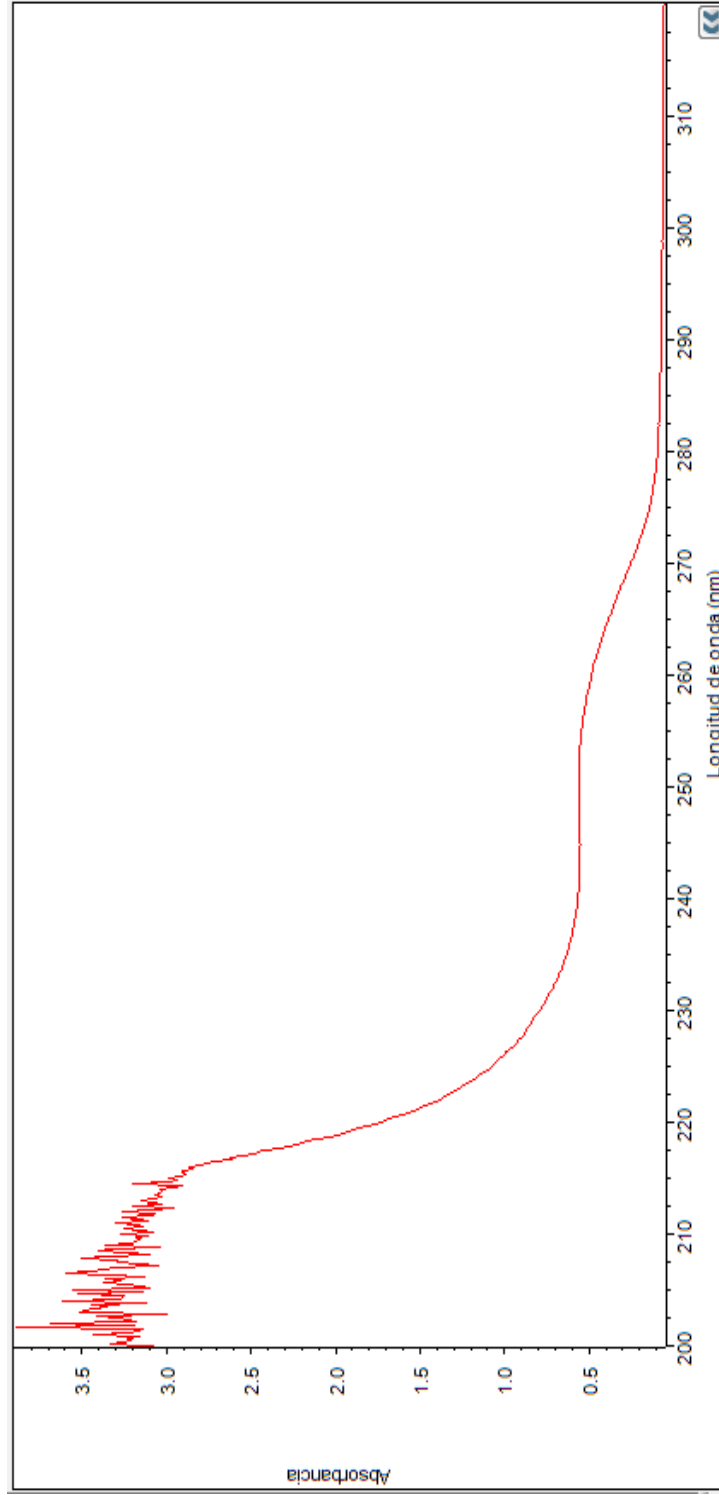


Figura 13. Espectro de barrido del ácido giberélico disuelto en alcohol isopropílico.

- **Etanol:Alcohol Isopropílico (3:1)**

Ácido Giberélico: Soluble

Ácido Indol Acético: Soluble

Espectro de Barrido: Ver figura 14.

Tiempo de disolución: 2 minutos

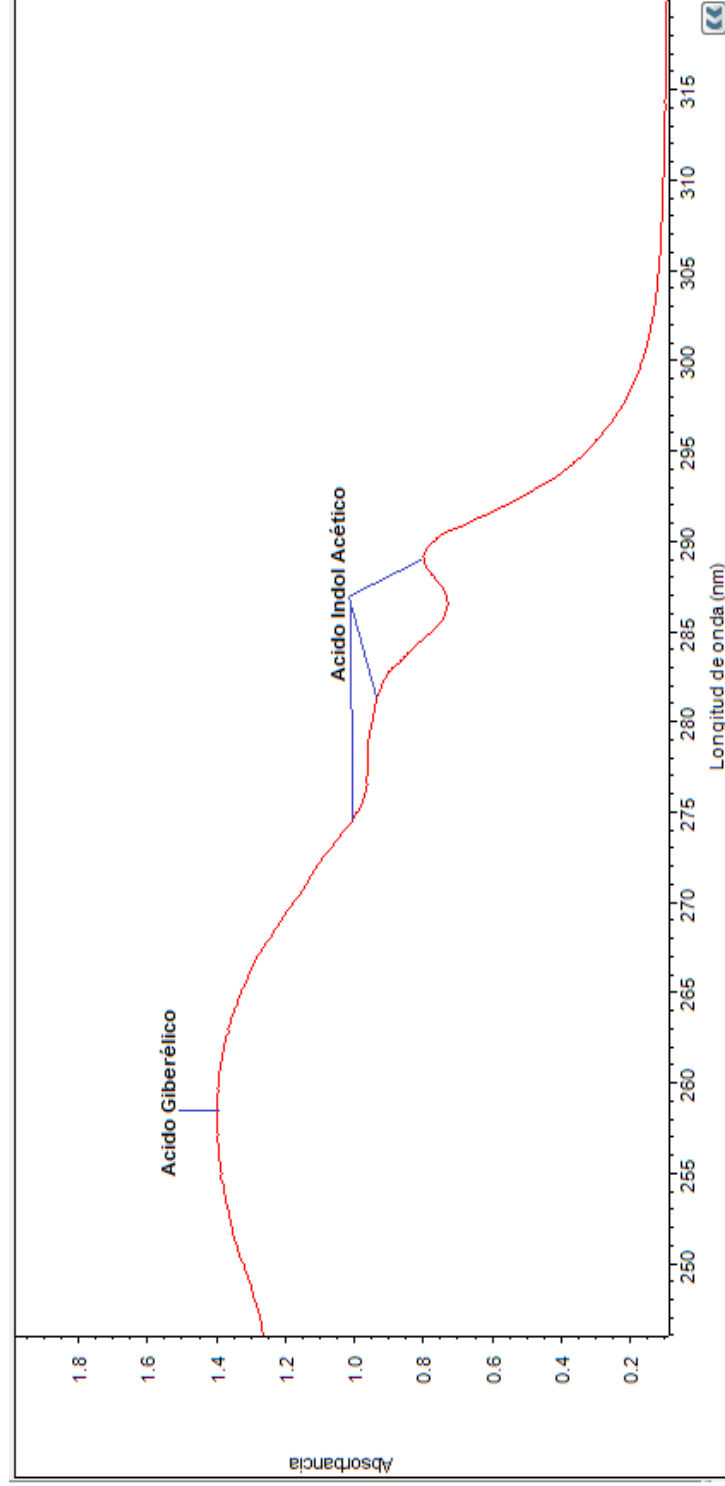


Figura 14. Espectro de barrido de las hormonas disueltas en etanol:alcohol Isopropílico (3:1).

4.2. Derivación de los espectros de absorción

4.2.1. Ácido Giberélico

4.2.1.1. Espectro de absorción de orden cero

Equipo: Espectrofotómetro UV/V

Marca: Thermo INSIGHT

Longitud de onda: 251 nm

Estándar: Ácido Giberélico

Tabla 1.

Concentraciones y Absorbancias del ácido giberélico en orden cero a una longitud de onda de 251 nm.

CONCENTRACIÓN (mg/L)	ABSORBANCIA	CONCENTRACIÓN (mg/L)	ABSORBANCIA
1000	0,59995	1300	0,89981
1100	0,69991	1350	0,95000
1150	0,75003	1400	0,99984
1200	0,79983	1450	1,05001
1250	0,85000	1500	1,09987

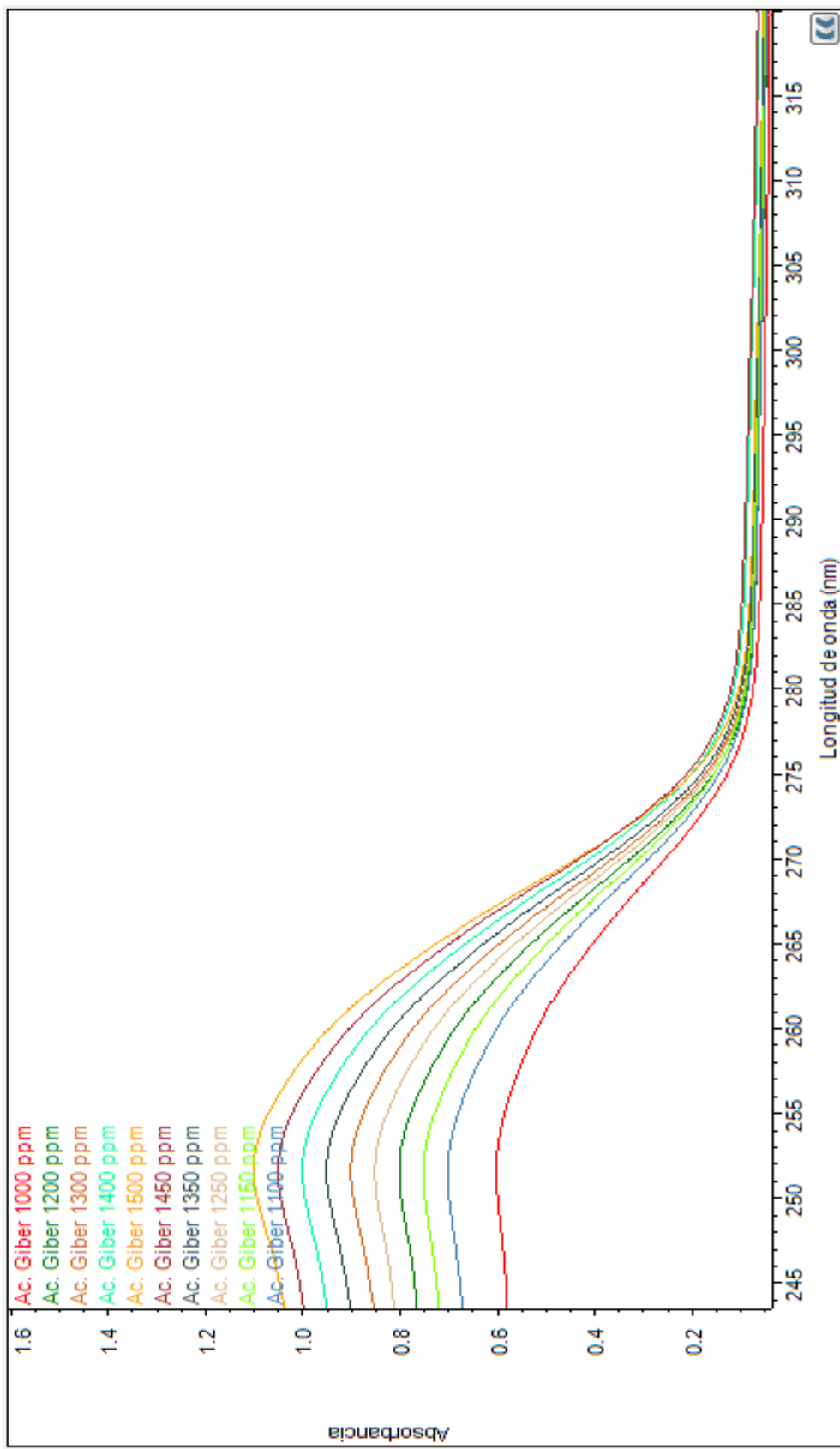


Figura 15. Espectros del ácido giberélico de orden cero.

4.2.1.2. Espectro de Absorción de primer orden

Equipo: Espectrofotómetro UV/V

Marca: Thermo INSIGHT

Longitud de onda: 248 nm y 268 nm

Estándar: Ácido Giberélico

Tabla 2.

Concentraciones y Absorbancias del ácido giberélico de primer orden a 248 nm.

Concentración (mg/L)	1000	1100	1150	1200	1250
Absorbancia	0,00374	0,00469	0,00502	0,00595	0,00632
Concentración (mg/L)	1300	1350	1400	1450	1500
Absorbancia	0,00712	0,00752	0,00790	0,00829	0,00963

Tabla 3.

Concentraciones y Absorbancias del ácido giberélico de primer orden a 268 nm.

Concentración (mg/L)	1000	1100	1150	1200	1250
Absorbancia	0,03085	0,03616	0,03875	0,04196	0,04459
Concentración (mg/L)	1300	1350	1400	1450	1500
Absorbancia	0,04763	0,05028	0,05223	0,05485	0,05906

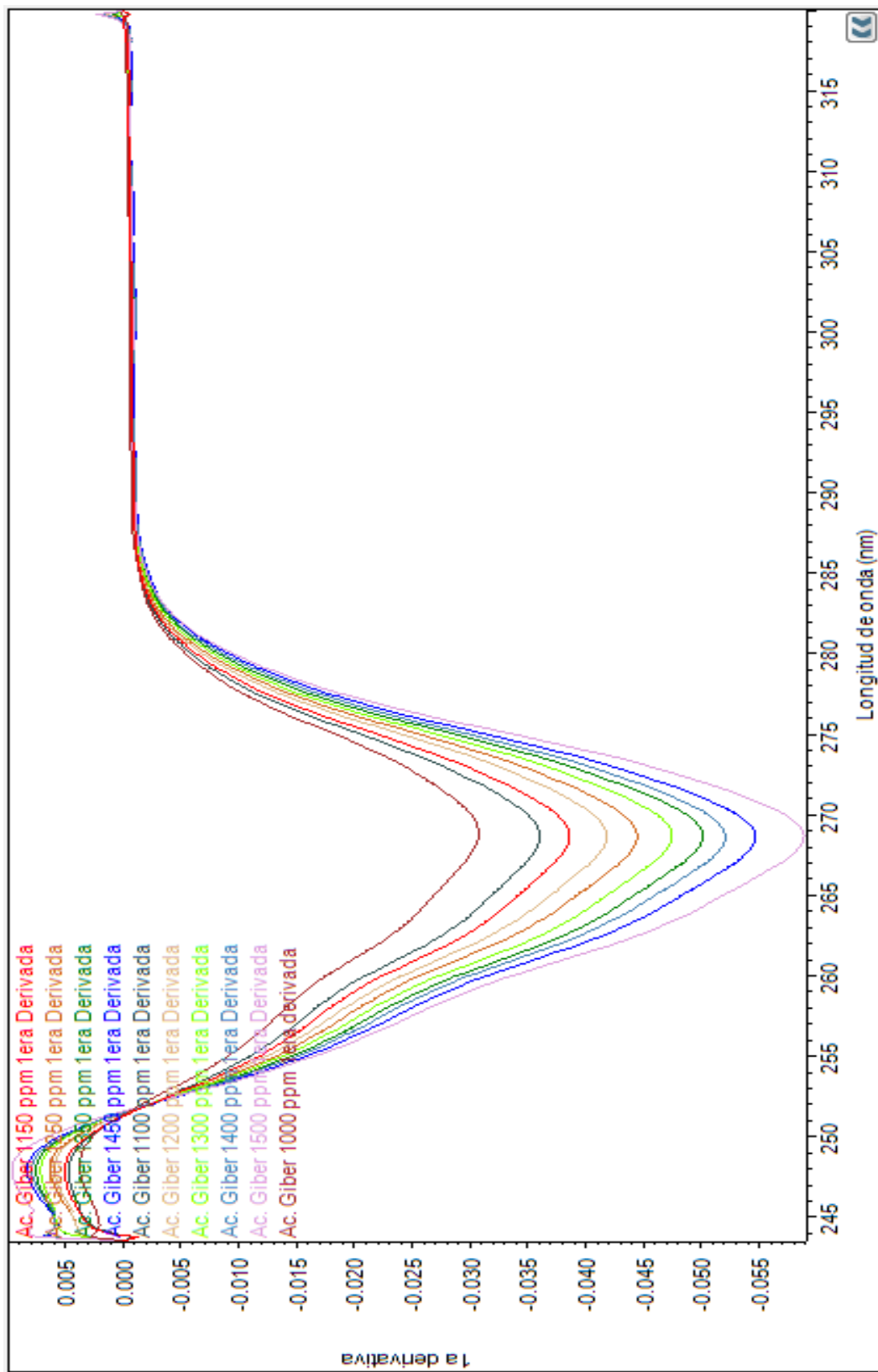


Figura 16. Espectros del ácido giberólico de primer orden.

4.2.1.3. Espectro de absorción de segundo orden

Equipo: Espectrofotómetro UV/V

Marca: Thermo INSIGHT

Longitud de onda: 252 nm y 257 nm – 260 nm y 275 nm

Estándar: Ácido Giberélico

Tabla 4.

Concentraciones y Absorbancias del ácido giberélico de segundo orden a 260 nm.

Concentración (mg/L)	1000	1100	1150	1200	1250
Absorbancia	0,00213	0,00253	0,00271	0,00291	0,00309
Concentración (mg/L)	1300	1350	1400	1450	1500
Absorbancia	0,00335	0,00354	0,00365	0,00384	0,00418

Tabla 5.

Concentraciones y Absorbancias del ácido giberélico de segundo orden a 275 nm.

Concentración (mg/L)	1000	1100	1150	1200	1250
Absorbancia	0,00318	0,00366	0,00392	0,00429	0,00456
Concentración (mg/L)	1300	1350	1400	1450	1500
Absorbancia	0,00485	0,00512	0,00532	0,00559	0,00609

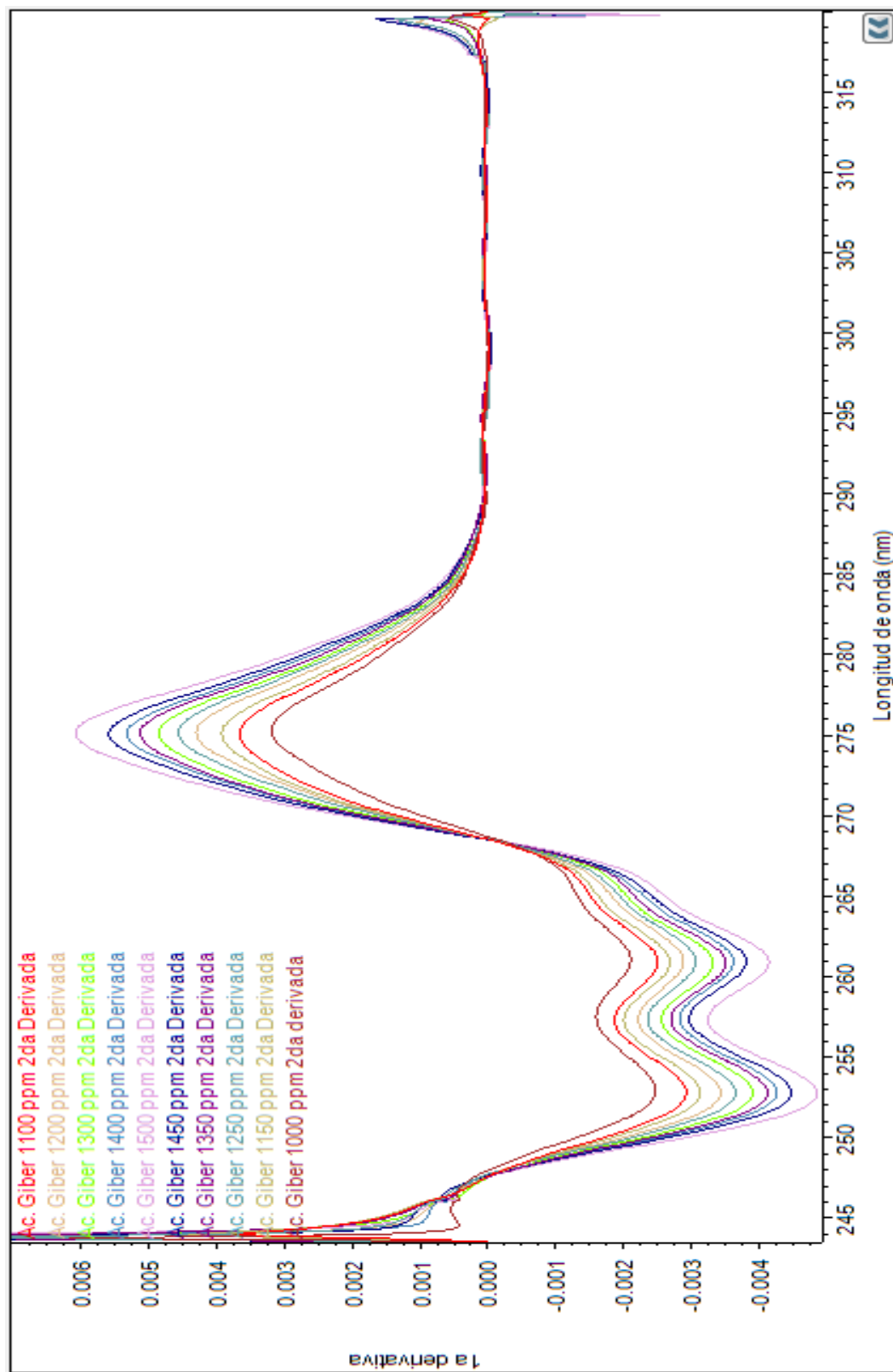


Figura 17. Espectros del ácido giberólico de segundo orden.

4.2.1.4. Espectro de absorción de tercer orden

Equipo: Espectrofotómetro UV/V

Marca: Thermo INSIGHT

Longitud de onda: 246 nm y 249 nm – 255 nm y 259 nm – 269 nm y 278 nm

Estándar: Ácido Giberélico

Tabla 6.

Concentraciones y Absorbancias del ácido giberélico de tercer orden a 269 nm.

Concentración (mg/L)	1000	1100	1150	1200	1250
Absorbancia	0,00068	0,00081	0,00087	0,00092	0,00097
Concentración (mg/L)	1300	1350	1400	1450	1500
Absorbancia	0,00107	0,00113	0,00114	0,00120	0,00130

Tabla 7.

Concentraciones y Absorbancias del ácido giberélico de tercer orden a 278 nm.

Concentración (mg/L)	1000	1100	1150	1200	1250
Absorbancia	0,00040	0,00046	0,00049	0,00053	0,00057
Concentración (mg/L)	1300	1350	1400	1450	1500
Absorbancia	0,00060	0,00064	0,00065	0,00068	0,00075

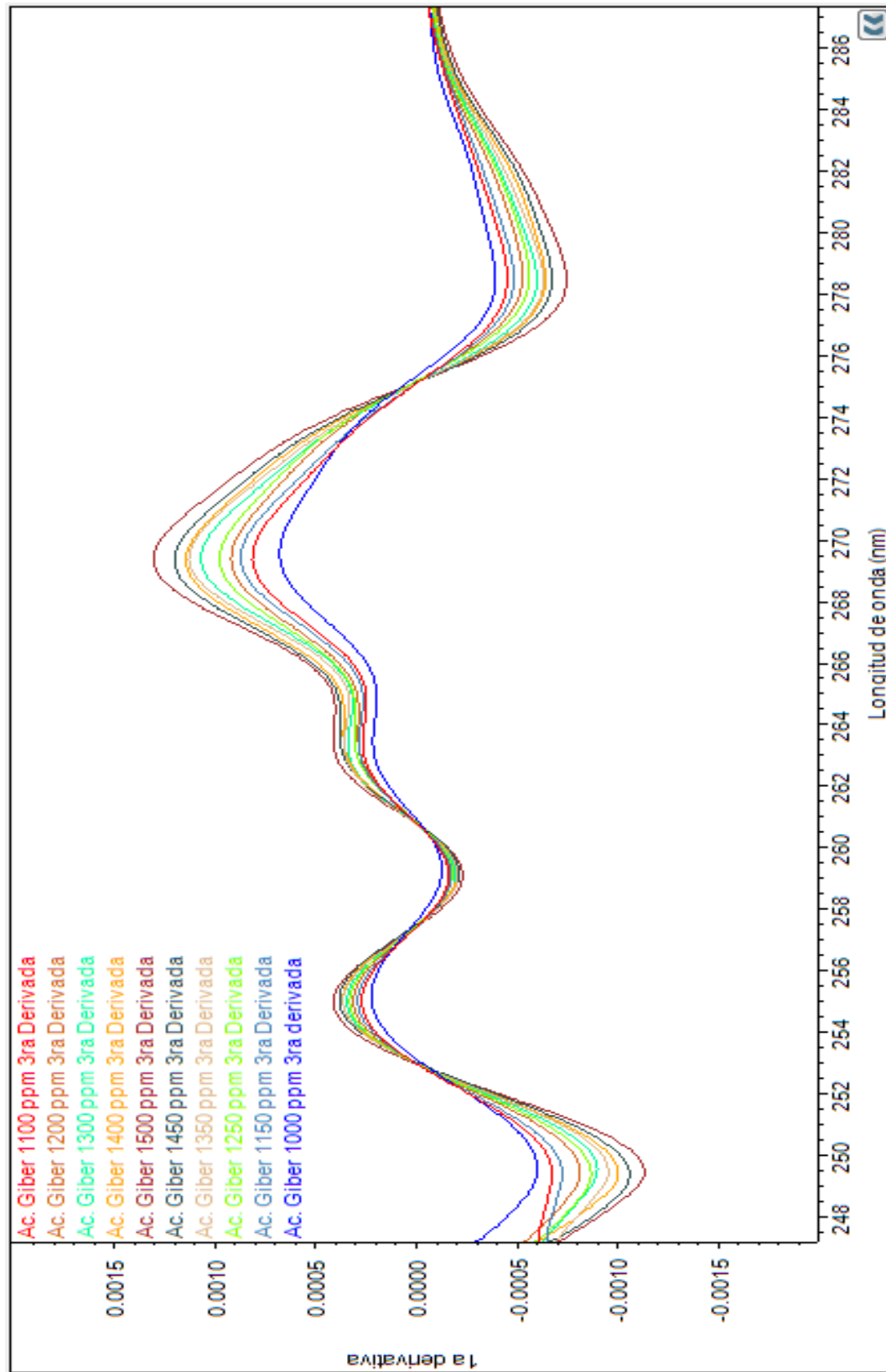


Figura 18. Espectros del ácido giberólico de tercer orden.

4.2.1.5. Espectro de Absorción de cuarto orden

Equipo: Espectrofotómetro UV/V

Marca: Thermo INSIGHT

Longitud de onda: 248 nm y 252 nm – 256 nm y 261 nm – 263 nm y 267 nm – 274 nm y 283 nm

Estándar: Ácido Giberélico

Tabla 8.

Concentraciones y Absorbancias del ácido giberélico de cuarto orden a 267 nm.

Concentración (mg/L)	1000	1100	1150	1200	1250
Absorbancia	0,00012	0,00014	0,00016	0,00016	0,00017
Concentración (mg/L)	1300	1350	1400	1450	1500
Absorbancia	0,00019	0,00020	0,00020	0,00021	0,00023

Tabla 9.

Concentraciones y Absorbancias del ácido giberélico de cuarto orden a 274 nm.

Concentración (mg/L)	1000	1100	1150	1200	1250
Absorbancia	0,00018	0,00019	0,00021	0,00023	0,00025
Concentración (mg/L)	1300	1350	1400	1450	1500
Absorbancia	0,00026	0,00028	0,00029	0,00030	0,00033

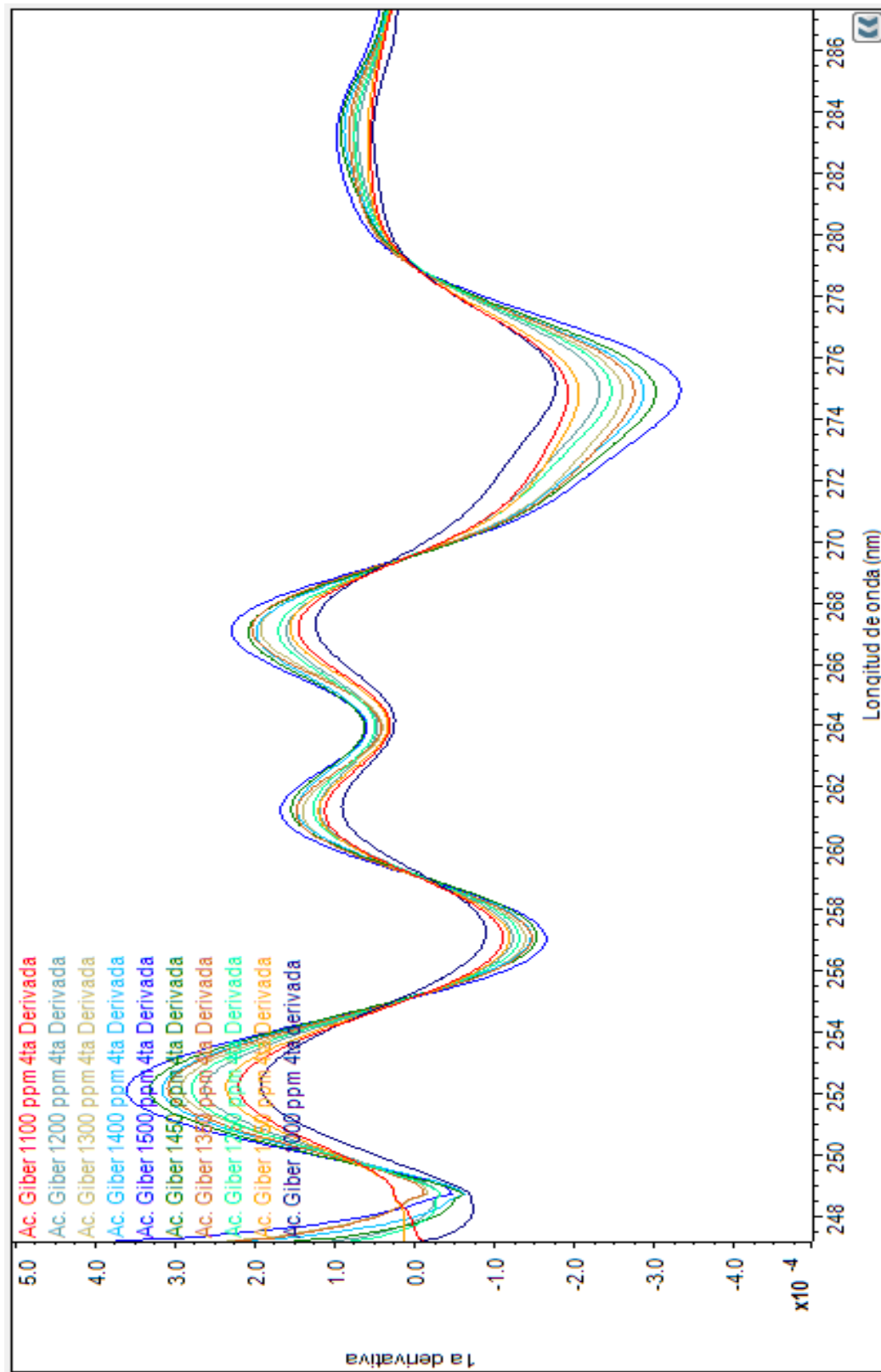


Figura 19. Espectros del ácido giberéico de cuarto orden.

4.2.2. Ácido Indol Acético

4.2.2.1. Espectro de absorción de orden cero

Equipo: Espectrofotómetro UV/V

Marca: Thermo INSIGHT

Longitud de onda: 272 nm , 279 nm y 289 nm

Estándar: Ácido Indol Acético

Tabla 10.

Concentraciones y Absorbancias del ácido indol acético de orden cero a 279 nm.

Concentración (mg/L)	16	18	20	22	24
Absorbancia	0,69163	0,75962	0,82644	0,89443	0,96125
Concentración (mg/L)	26	28	30	32	34
Absorbancia	1,02924	1,09606	1,16288	1,23087	1,29769

Tabla 11.

Concentraciones y Absorbancias del ácido indol acético de orden cero a 289 nm.

Concentración (mg/L)	16	18	20	22	24
Absorbancia	0,59000	0,64800	0,70500	0,76300	0,82000
Concentración (mg/L)	26	28	30	32	34
Absorbancia	0,87800	0,93500	0,99200	1,05000	1,10700

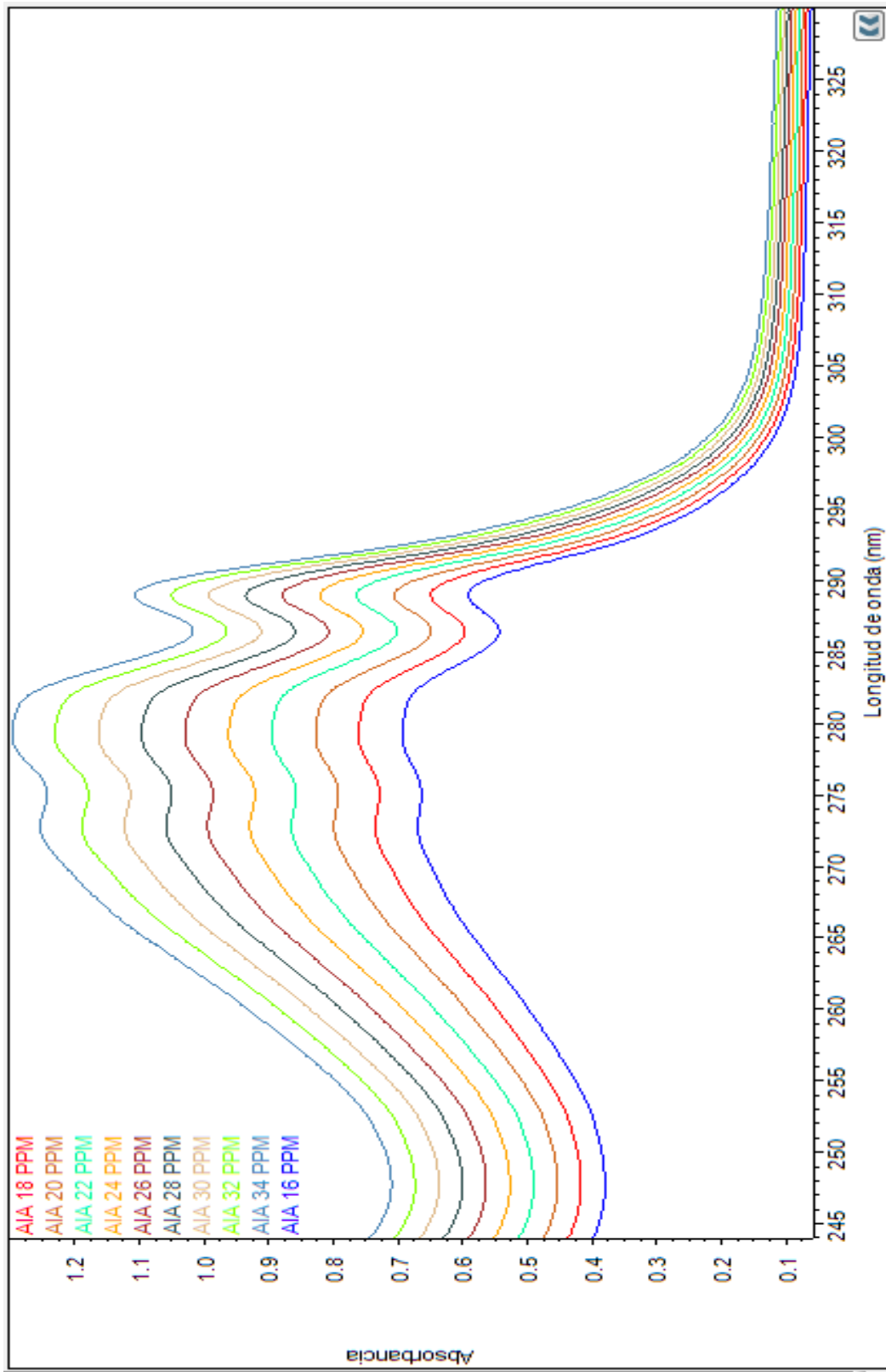


Figura 20. Espectros del ácido indol acético de orden cero.

4.2.2.2. Espectro de absorción de primer orden

Equipo: Espectrofotómetro UV/V

Marca: Thermo INSIGHT

Longitud de onda: 263 nm y 273 nm – 277 nm y 284 nm – 287 nm y 291 nm

Estándar: Ácido Indol Acético

Tabla 12.

Concentraciones y Absorbancias del ácido indol acético de primer orden a 287 nm.

Concentración (mg/L)	16	18	20	22	24
Absorbancia	0,00868	0,00953	0,01037	0,01122	0,01206
Concentración (mg/L)	26	28	30	32	34
Absorbancia	0,01291	0,01375	0,01459	0,01544	0,01628

Tabla 13.

Concentraciones y Absorbancias del ácido indol acético de primer orden a 291 nm.

Concentración (mg/L)	16	18	20	22	24
Absorbancia	0,07211	0,07920	0,08617	0,09326	0,10023
Concentración (mg/L)	26	28	30	32	34
Absorbancia	0,10731	0,11428	0,12125	0,12834	0,13530

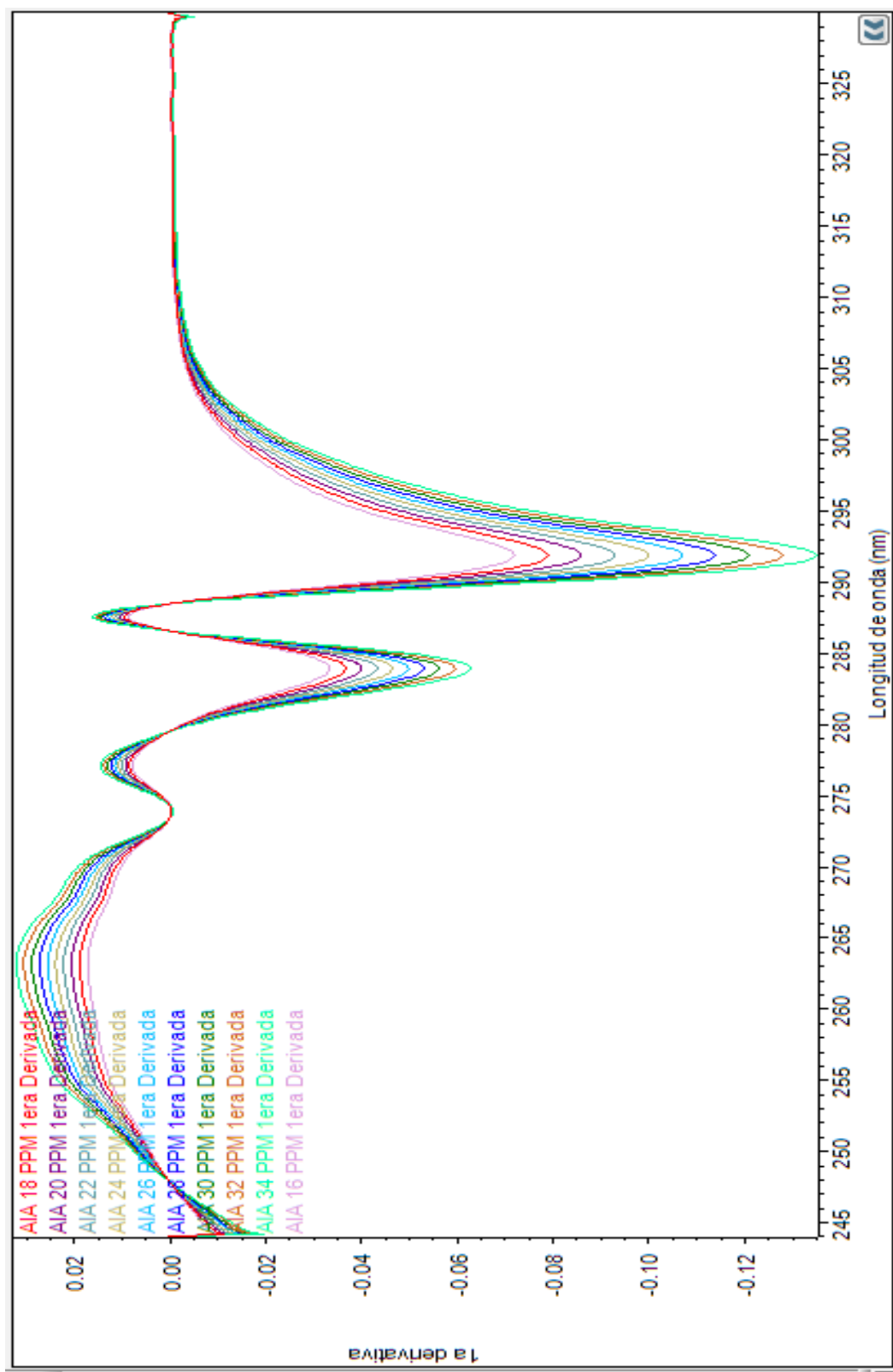


Figura 21. Espectros del ácido indol acético de primer orden.

4.2.2.3. Espectro de absorción de segundo orden

Equipo: Espectrofotómetro UV/V

Marca: Thermo INSIGHT

Longitud de onda: 271 nm y 275 nm – 281 nm y 285 nm – 289 nm y 294 nm

Estándar: Ácido Indol Acético

Tabla 14.

Concentraciones y Absorbancias del ácido indol acético de segundo orden a 289 nm.

Concentración (mg/L)	16	18	20	22	24
Absorbancia	0,02098	0,02304	0,02507	0,02713	0,02916
Concentración (mg/L)	26	28	30	32	34
Absorbancia	0,03122	0,03324	0,03527	0,03733	0,03936

Tabla 15.

Concentraciones y Absorbancias del ácido indol acético de segundo orden a 294 nm.

Concentración (mg/L)	16	18	20	22	24
Absorbancia	0,01025	0,01126	0,01225	0,01326	0,01425
Concentración (mg/L)	26	28	30	32	34
Absorbancia	0,01526	0,01625	0,01724	0,01825	0,01924

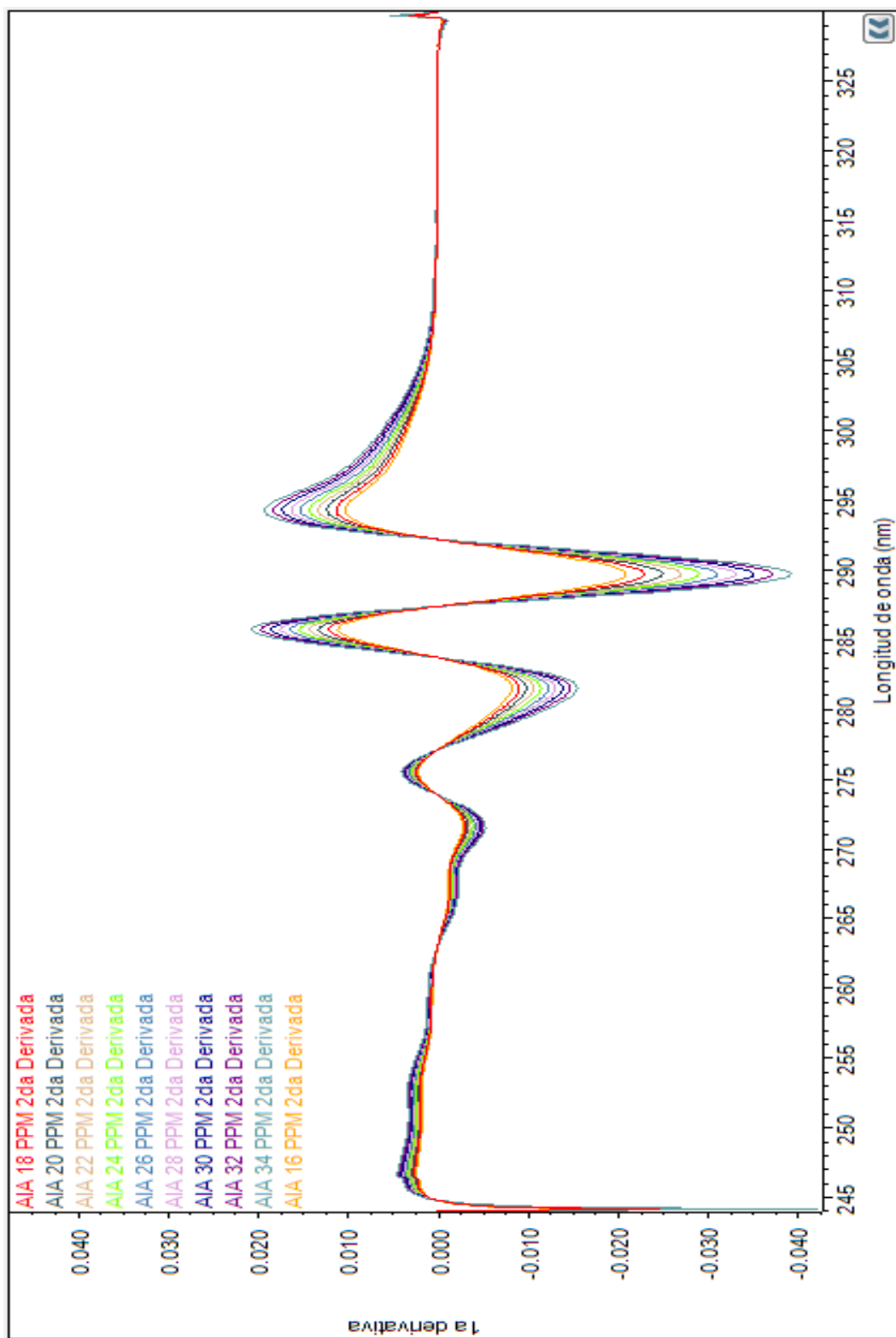


Figura 22. Espectros del ácido indol acético de segundo orden.

4.2.2.4. Espectro de absorción de tercer orden

Equipo: Espectrofotómetro UV/V

Marca: Thermo INSIGHT

Longitud de onda: 269 nm y 273 nm – 278 nm y 283 nm – 287 nm y 291 nm

Estándar: Ácido Indol Acético

Tabla 16.

Concentraciones y Absorbancias del ácido indol acético de tercer orden a 287 nm.

Concentración (mg/L)	16	18	20	22	24
Absorbancia	0,00841	0,00924	0,01005	0,01088	0,01169
Concentración (mg/L)	26	28	30	32	34
Absorbancia	0,01252	0,01333	0,01414	0,01497	0,01578

Tabla 17.

Concentraciones y Absorbancias del ácido indol acético de tercer orden a 291 nm.

Concentración (mg/L)	16	18	20	22	24
Absorbancia	0,00798	0,00877	0,00954	0,01032	0,01109
Concentración (mg/L)	26	28	30	32	34
Absorbancia	0,01188	0,01265	0,01342	0,01421	0,01498

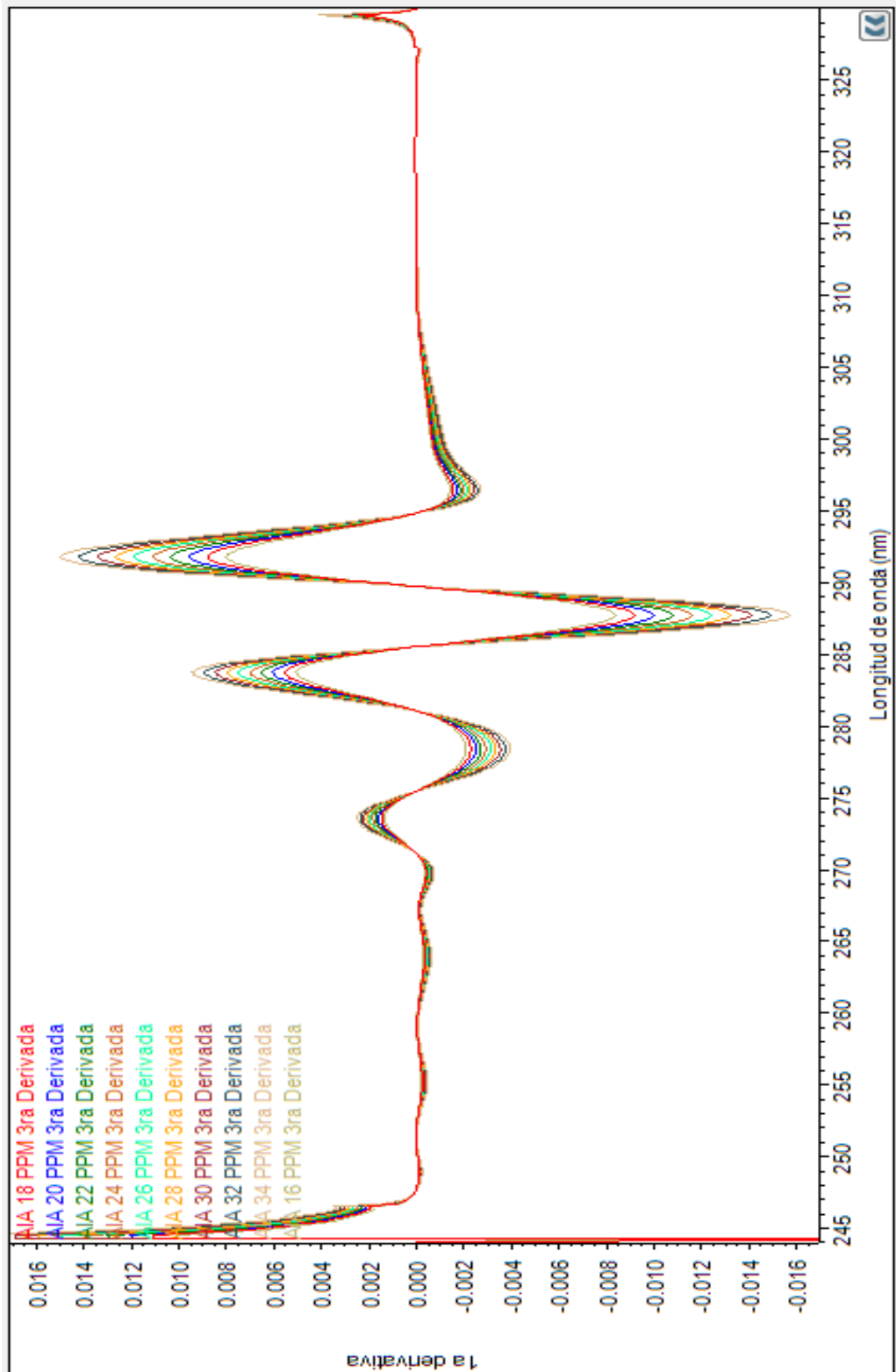


Figura 23. Espectros del ácido indol acético de tercer orden.

4.2.2.5. Espectro de absorción de cuarto orden

Equipo: Espectrofotómetro UV/V

Marca: Thermo INSIGHT

Longitud de onda: 271 nm y 275 nm – 281 nm y 285 nm – 289 nm y 293 nm

Estándar: Ácido Indol Acético

Tabla 18.

Concentraciones y Absorbancias del ácido indol acético de cuarto orden a 289 nm.

Concentración (mg/L)	16	18	20	22	24
Absorbancia	0,00429	0,00471	0,00512	0,00554	0,00596
Concentración (mg/L)	26	28	30	32	34
Absorbancia	0,00638	0,00679	0,00721	0,00763	0,00804

Tabla 19.

Concentraciones y Absorbancias del ácido indol acético de cuarto orden a 293 nm.

Concentración (mg/L)	16	18	20	22	24
Absorbancia	0,00240	0,00264	0,00287	0,00311	0,00334
Concentración (mg/L)	26	28	30	32	34
Absorbancia	0,00358	0,00381	0,00404	0,00428	0,00451

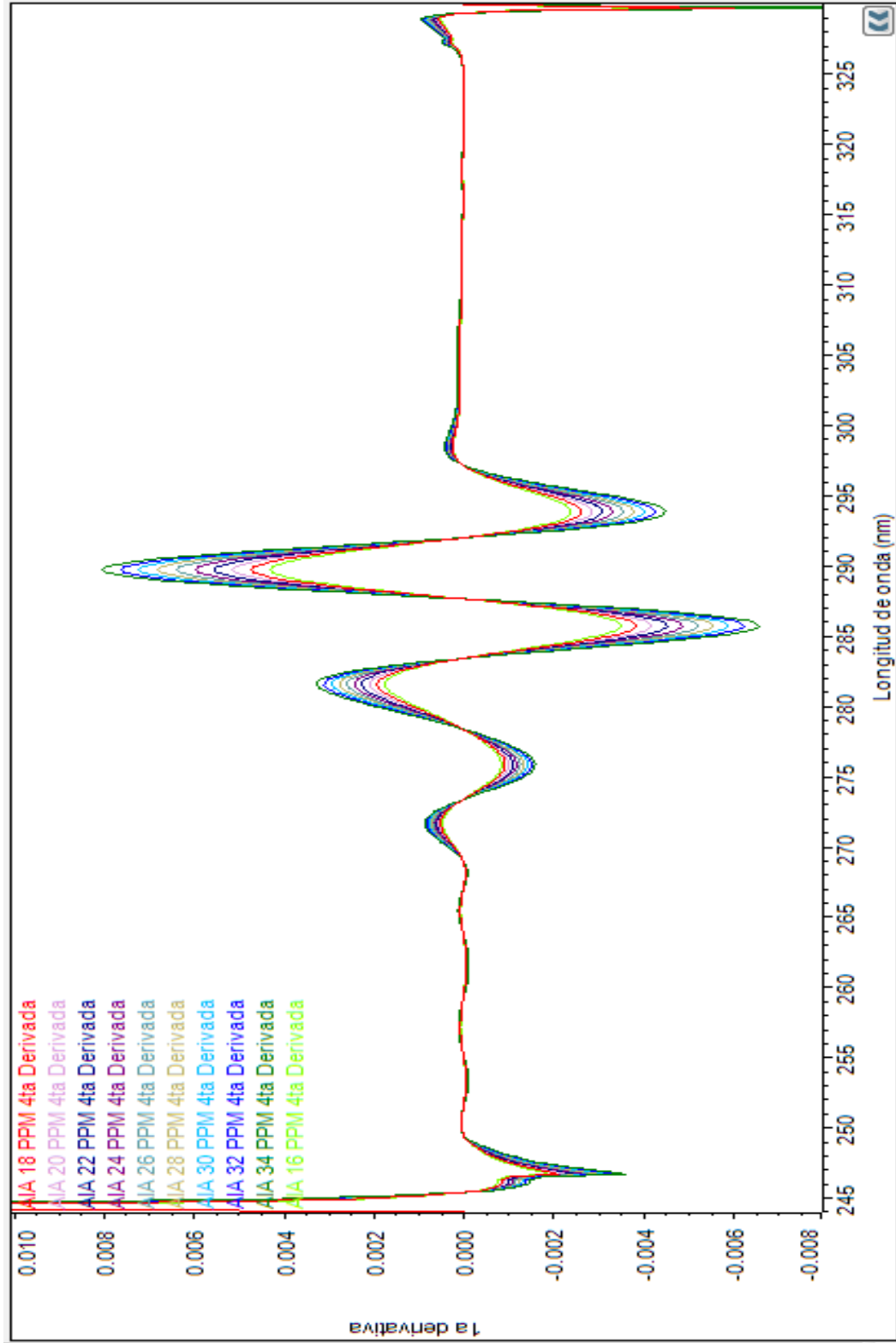


Figura 24. Espectros del ácido indol acético de cuarto orden.

4.3. Obtención de las Curvas de Calibrado

Se realizó las mediciones para la construcción de las curvas de calibrado de cada hormona.

Se utilizó las longitudes de onda obtenidas de la segunda derivada.

4.3.1. Ácido Giberélico

Longitud de onda: 275 nm (2da Derivada)

Estándar: Ácido Giberélico

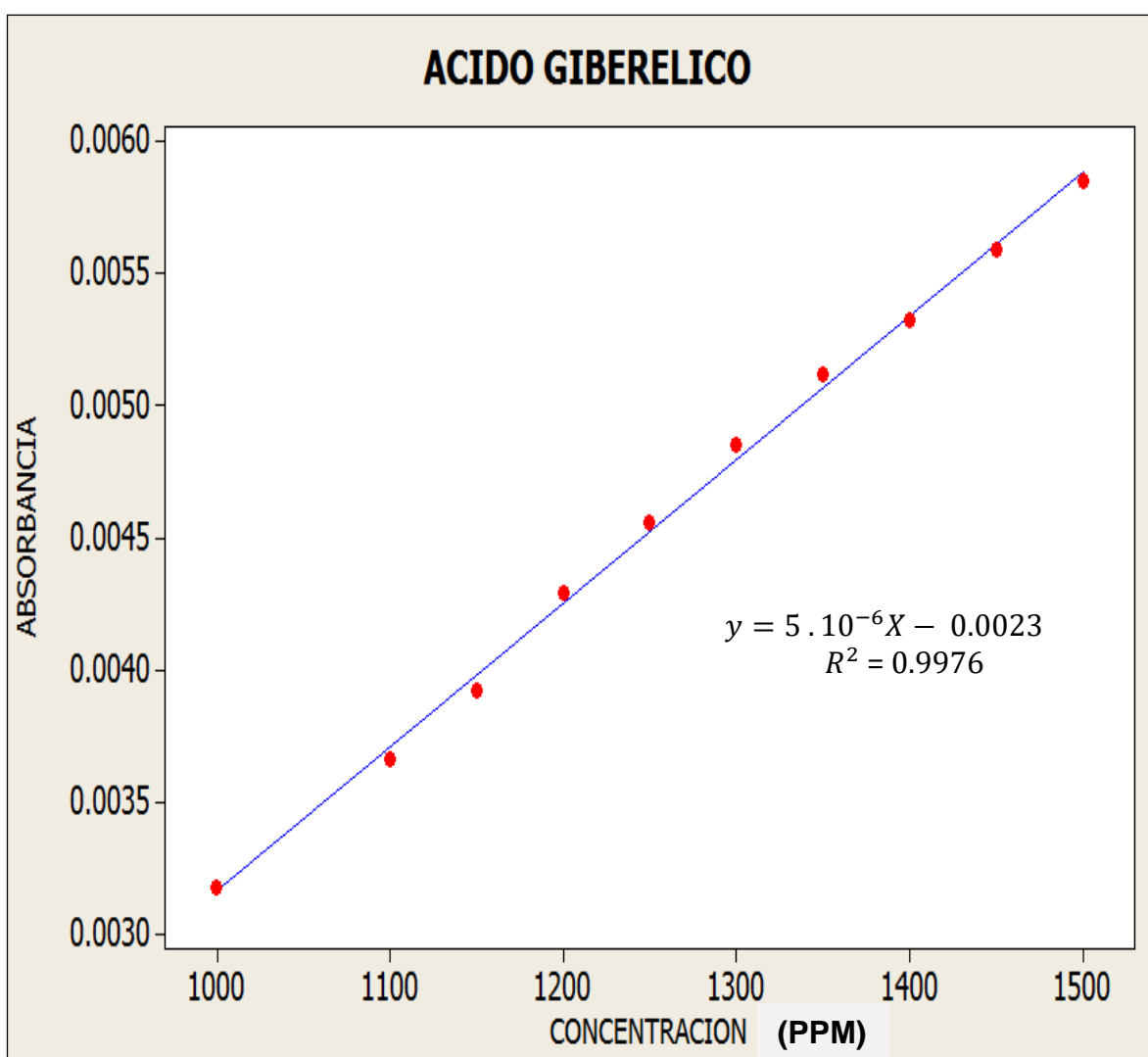


Figura 25. Curva de calibrado del ácido giberélico.

Tabla 20.
Absorbancias experimentales del ácido giberélico.

CONCENTRACIÓN (PPM)	ABSORBANCIAS										PROMEDIO	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1000	0.00318	0.00317	0.00317	0.00319	0.00318	0.00318	0.00317	0.00318	0.00319	0.00319	0.00319	0.00318
1100	0.00366	0.00367	0.00367	0.00365	0.00366	0.00365	0.00366	0.00367	0.00365	0.00366	0.00366	0.00366
1150	0.00392	0.00393	0.00391	0.00393	0.00393	0.00394	0.00391	0.0039	0.00391	0.00392	0.00392	0.00392
1200	0.00429	0.0043	0.00428	0.00428	0.00428	0.00429	0.00431	0.00429	0.00428	0.0043	0.00429	0.00429
1250	0.00456	0.00458	0.00454	0.00456	0.00455	0.00455	0.00456	0.00457	0.00457	0.00456	0.00456	0.00456
1300	0.00485	0.00487	0.00486	0.00484	0.00484	0.00485	0.00486	0.00484	0.00484	0.00485	0.00485	0.00485
1350	0.00512	0.00511	0.00511	0.00512	0.00512	0.00513	0.00512	0.00512	0.00513	0.00512	0.00512	0.00512
1400	0.00532	0.00532	0.00533	0.00531	0.00532	0.00532	0.00533	0.00532	0.00531	0.00532	0.00532	0.00532
1450	0.00559	0.00561	0.00558	0.00559	0.00558	0.0056	0.00559	0.0056	0.00559	0.00557	0.00559	0.00559
1500	0.00585	0.00584	0.00584	0.00586	0.00585	0.00585	0.00586	0.00585	0.00586	0.00584	0.00585	0.00585

4.3.2. Ácido Indol Acético

Longitud de onda: 294 nm (2da derivada)

Estándar: Ácido Indol Acético

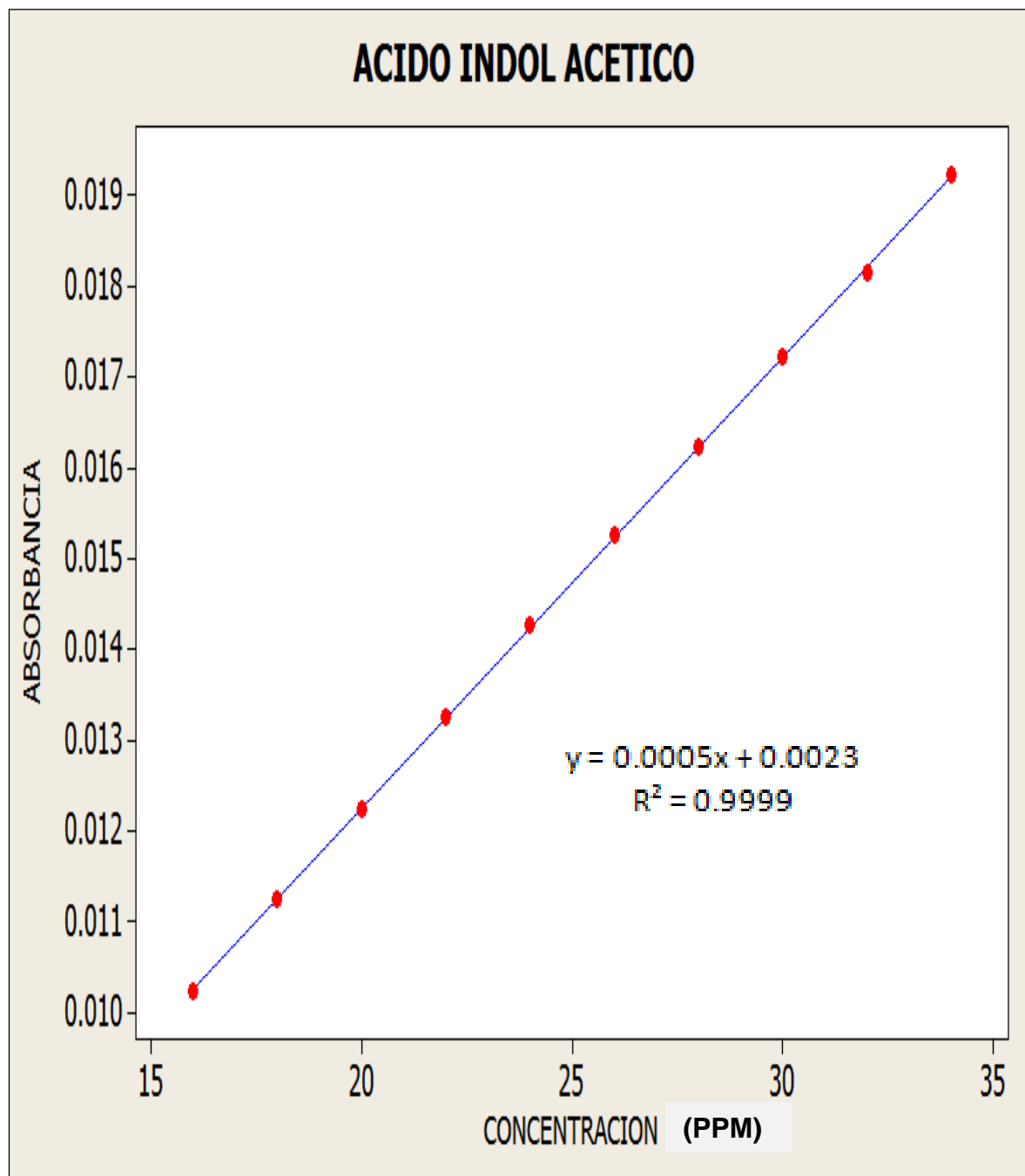


Figura26. Curva de calibrado del Ácido Indol Acético.

Tabla 21.

Absorbancias experimentales del ácido indol Acético.

CONCENTRACIÓN (PPM)	ABSORBANCIAS											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	PROMEDIO	
16	0.01025	0.01026	0.01026	0.01025	0.01025	0.01024	0.01025	0.01025	0.01024	0.01025	0.01025	0.01025
18	0.01126	0.01128	0.01126	0.01125	0.01126	0.01127	0.01126	0.01125	0.01126	0.01125	0.01125	0.01126
20	0.01225	0.01226	0.01224	0.01224	0.01225	0.01226	0.01225	0.01226	0.01225	0.01224	0.01225	0.01225
22	0.01326	0.01328	0.01326	0.01326	0.01325	0.01326	0.01326	0.01325	0.01327	0.01325	0.01325	0.01326
24	0.01428	0.01429	0.0143	0.01428	0.01427	0.01428	0.01428	0.01427	0.01428	0.01427	0.01427	0.01428
26	0.01526	0.01524	0.01526	0.01527	0.01527	0.01526	0.01525	0.01526	0.01527	0.01526	0.01526	0.01526
28	0.01625	0.01623	0.01625	0.01624	0.01625	0.01626	0.01625	0.01626	0.01625	0.01626	0.01626	0.01625
30	0.01724	0.01722	0.01724	0.01723	0.01724	0.01725	0.01726	0.01724	0.01723	0.01725	0.01725	0.01724
32	0.01815	0.01817	0.01815	0.01816	0.01815	0.01815	0.01814	0.01815	0.01814	0.01814	0.01814	0.01815
34	0.01923	0.01925	0.01924	0.01924	0.01923	0.0192	0.01923	0.01921	0.01923	0.01924	0.01924	0.01923

4.4. Cuantificación de las concentraciones de las muestras comerciales

Luego que se definió las curvas de calibración de cada hormona, se procedió a cuantificar las muestras obteniéndose los siguientes resultados.

4.4.1. Plentyphos (ácido indol acético)

Tabla 22.

Resultados obtenidos de las corridas del producto Plentyphos.

Muestras de Plentyphos	Absorbancia ($\lambda=294\text{nm}$)	Concentración de la solución (mg/L)	Concentración del producto (g/L)	Resultado ($\bar{X} \pm \sigma$)
1	0,01472	24.84	0.207	0.207 \pm 0.2%
2	0,01470	24.80	0.207	
3	0,01476	24.92	0.208	
4	0,01469	24.78	0.207	
5	0,01470	24.80	0.207	
6	0,01465	24.70	0.206	
7	0,01477	24.94	0.208	
8	0,01468	24.76	0.206	
9	0,01471	24.82	0.207	
10	0,01472	24.84	0.207	

σ : desviación estándar (expresada como porcentaje) , \bar{X} : Promedio

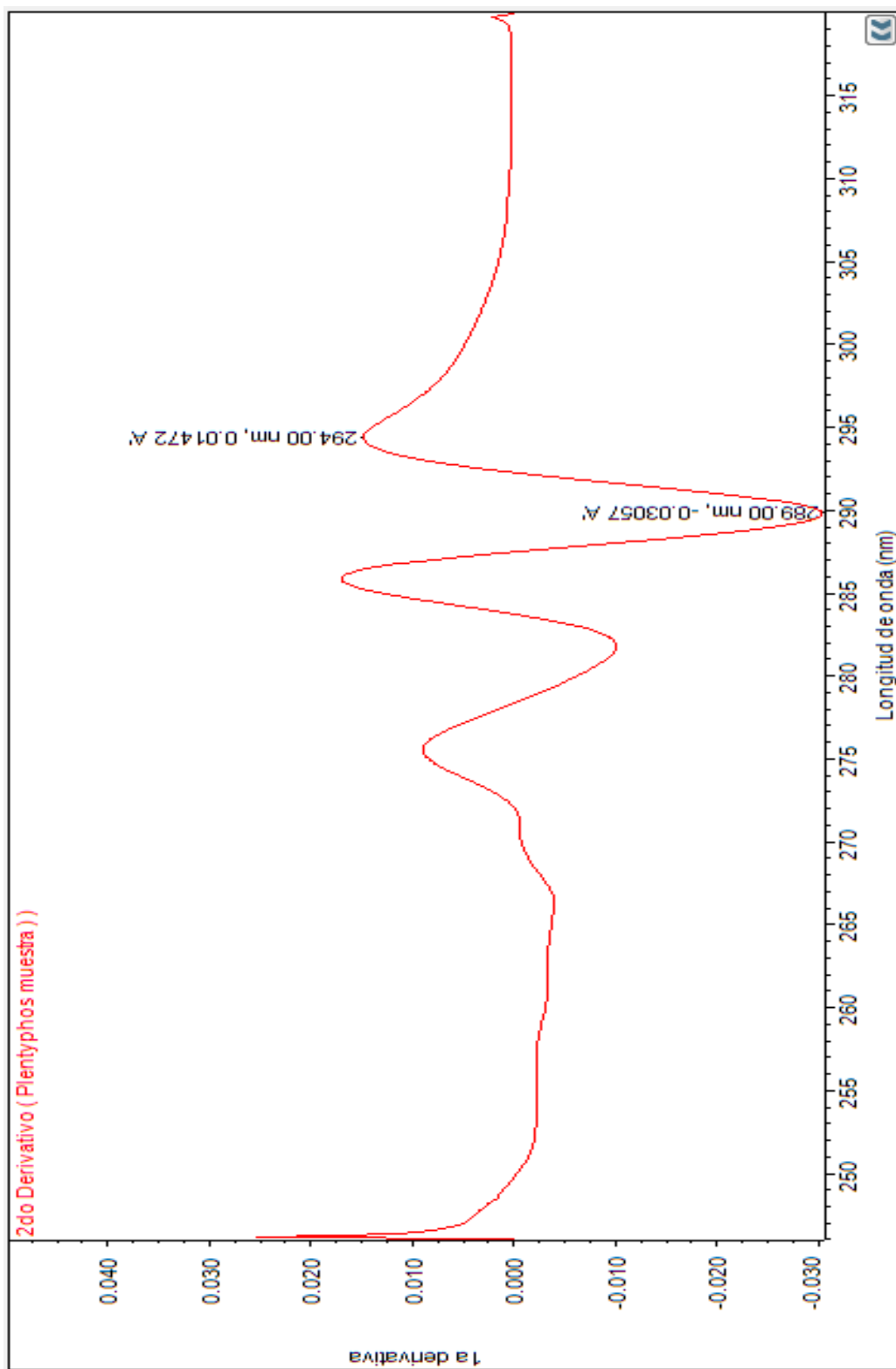


Figura 27. Espectro del producto Plentiphos de segundo orden.

4.4.2. Gib-bex (ácido Giberélico)

Tabla 23.

Resultados obtenidos de las corridas del producto Gib-bex.

Muestras de Gib-bex	Absorbancia ($\lambda=275\text{nm}$)	Concentración de la solución (mg/L)	Concentración del producto (g/L)	Resultado ($\bar{X} \pm \sigma$)
1	0.00365	1190	9.9	9.9 \pm 0.6 %
2	0.00360	1180	9.8	
3	0.00368	1196	10.0	
4	0.00370	1200	10.0	
5	0.00364	1188	9.9	
6	0.00362	1184	9.9	
7	0.00373	1206	10.1	
8	0.00365	1190	9.9	
9	0.00368	1196	10.0	
10	0.00372	1204	10.0	

σ : desviación estándar (expresada como porcentaje) , \bar{X} : Promedio

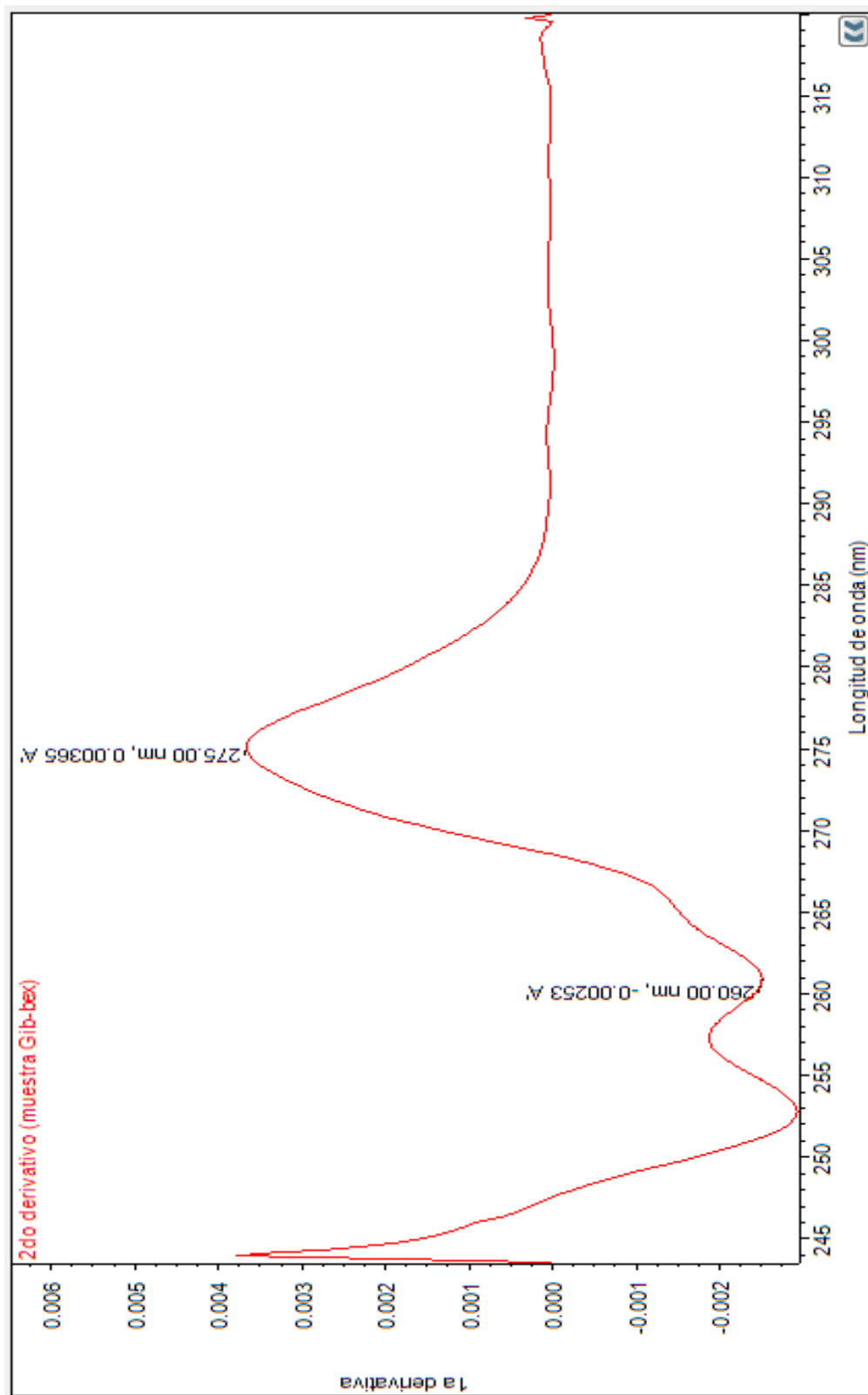


Figura 28. Espectro del producto Gib-bex de segundo orden.

4.4.3. Fithor (ácido indol acético y ácido giberélico)

Tabla 24.

Resultados del contenido de ácido giberélico obtenidos de las corridas del producto Fithor.

Muestras de Fithor	Absorbancia ($\lambda=275\text{nm}$)	Concentración de la solución (mg/L)	Concentración del producto (g/L)	Resultado ($\bar{X} \pm \sigma$)
1	0.00390	1240	40	42.40 \pm 1.9%
2	0.00391	1242	44	
3	0.00390	1240	40	
4	0.00391	1242	44	
5	0.00391	1242	44	
6	0.00391	1242	44	
7	0.00390	1240	40	
8	0.00391	1242	44	
9	0.00390	1240	40	
10	0.00391	1242	44	

σ : desviación estándar (expresada como porcentaje) , \bar{X} : Promedio

Tabla 25.

Resultados del contenido de ácido indol acético obtenidos de las corridas del producto Fithor.

Muestras de Fithor	Absorbancia ($\lambda=294\text{nm}$)	Concentración de la solución (mg/L)	Concentración del producto (g/L)	Resultado ($\bar{X} \pm \sigma$)
1	0.01260	20.60	41.20	$41.21 \pm 0.07\%$
2	0.01261	20.62	41.24	
3	0.01260	20.60	41.20	
4	0.01260	20.60	41.20	
5	0.01261	20.62	41.24	
6	0.01262	20.64	41.28	
7	0.01259	20.58	41.16	
8	0.01261	20.62	41.24	
9	0.01260	20.60	41.20	
10	0.01259	20.58	41.16	

σ : desviación estándar (expresada como porcentaje) , \bar{X} : Promedio

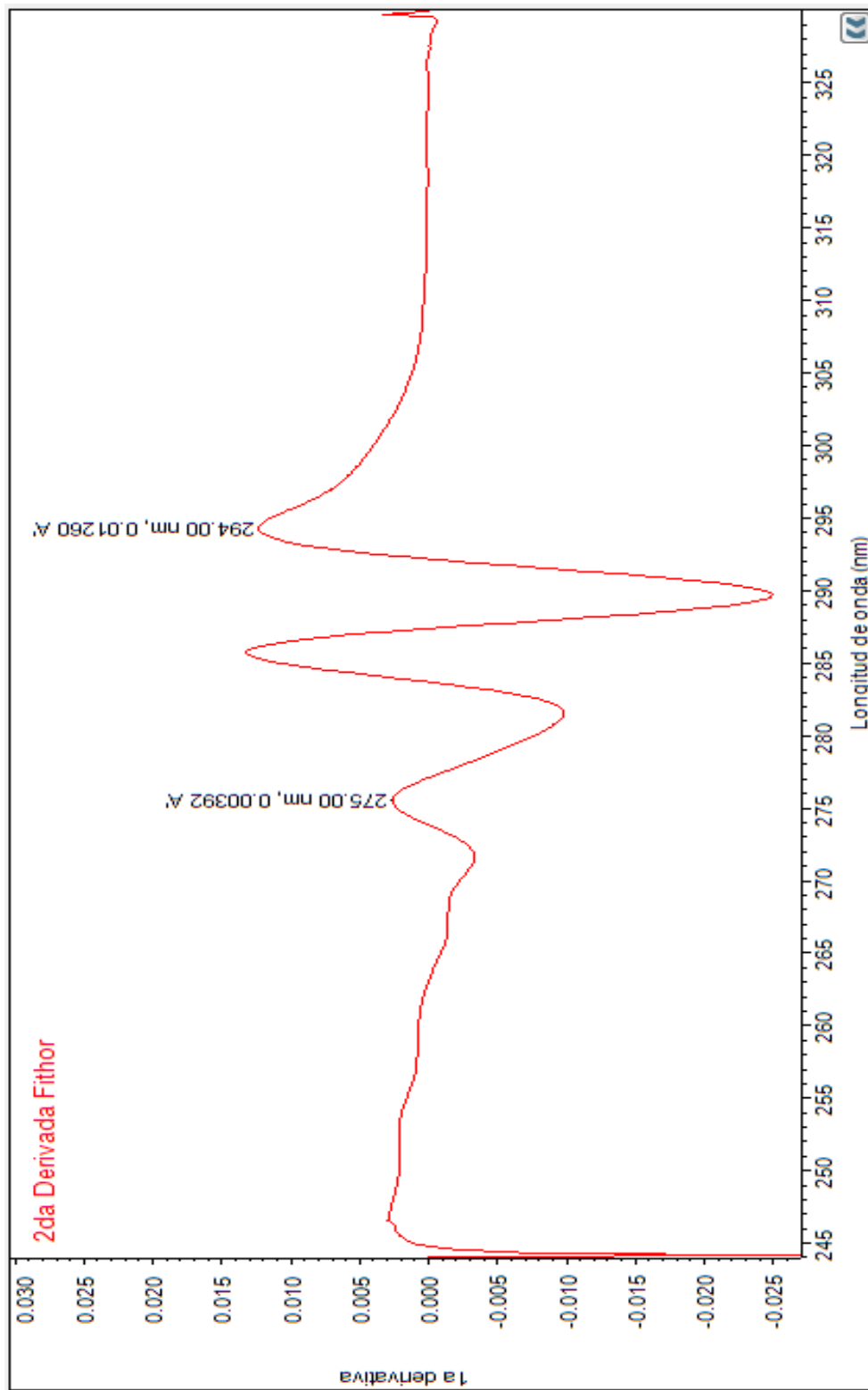


Figura 29. Espectro del producto Fithor de segundo orden.

CAPITULO 5

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

- Como podemos observar en los resultados obtenidos al momento de seleccionar un solvente se tuvo en consideración tres parámetros de interés, los cuales fueron elegidos convenientemente para la elaboración de la metodología propuesta.

El primer parámetro es la solubilidad, de acuerdo a las fichas técnicas de cada hormona, se detalla que cada hormona tiene un nivel de solubilidad en cada solvente: agua, etanol y alcohol Isopropílico.

En primera instancia se deseaba hacer una metodología que no presente mayores problemas de toxicidad y se procedió a utilizar el agua, sin embargo observamos que el nivel de solubilidad no era el adecuado para esta metodología, y al momento de realizar un barrido por el espectrofotómetro UV-Vis, se obtenían muchas señales como ruido en el rango de 200 a 300 nm, con lo cual era imposible determinar las señales de las hormonas. Para el caso del etanol y el alcohol Isopropílico se obtuvieron mejores resultados en sus soluciones a diferentes concentraciones, sin embargo también se encontró un grupo de señales en forma de ruido entre 200 y 235 nm aproximadamente. Entre tantas pruebas realizadas se obtuvo una mezcla entre etanol y alcohol Isopropílico de 1 a 3, con lo cual logramos reducir este ruido producido y logramos proseguir con la metodología. Por qué es tan importante reducir este ruido sabiendo que no interfiere con la longitud de onda de las hormonas. La respuesta a esta interrogante se resuelve al momento de realizar las derivaciones de los espectros, si obtenemos demasiado ruido en una región del espectro, estos pueden alterar las derivaciones moviendo amplitudes o alturas de los picos de cada curva obtenida y en muchos casos no permiten crear una curva de calibración. Se denomina a este ruido interferencias.

Como segundo parámetro se determinó la resolución del espectro obtenido, como mencionamos líneas arriba este parámetro nos ayudó a determinar la mezcla adecuada para proseguir con la metodología, si bien es cierto al momento de realizar el barrido descartamos la región donde se encuentra este ruido, bajar la mayor parte de estas señales interferentes nos ayuda a definir la forma del espectro de cada hormona.

El tercer parámetro evaluado es el tiempo de disolución de cada hormona en los solventes, como se muestran en los resultados para el caso del etanol se obtiene tiempos promedios de cinco minutos para cada hormona, mientras que el alcohol Isopropílico demandaba mayor tiempo aproximadamente veinte minutos, al realizar la mezcla de los solventes obtenemos un mejor tiempo de disolución promedio, dos minutos por hormona en agitación constante. Este tiempo nos permite reducir tiempos al momento de la preparación de las soluciones para las curvas y para las muestras a evaluar.

- La elección del orden de la derivada es la etapa más importante del presente trabajo, ya que es con este que podremos cuantificar y definir la metodología propuesta.

Se realizó la derivación hasta el cuarto orden de cada hormona para observar el comportamiento de las curvas obtenidas, en este aspecto y luego de analizar cada curva se tomó en cuenta los siguientes puntos para la elección del orden: La resolución de las curvas, la longitud de onda máxima, los valores de absorbancia entre puntos y el más importante que cada longitud máxima obtenida por cada hormona no se vea afectada por la otra.

Como podemos observar en la figura 31, (Anexo A) se observan varios de los puntos que tomamos en cuenta para seleccionar el orden de la derivada, en este caso la resolución de

ambas curvas se encuentran óptimas, en el caso de la longitud de onda máxima la encontramos a 275 nm con mayor amplitud y el valor de absorbancia superior, la cual corresponde a la segunda derivada de la hormona, en el caso de la primera y cuarta derivación se obtuvieron problemas con los puntos de longitud de onda máxima y los valores de absorbancia se encontraban muy cercanos unos de otros lo cual no nos ayudó para la cuantificación.

Como se puede apreciar en la Figura 30, (Anexo A) notamos claramente que las longitudes de onda máxima tanto del ácido giberélico (AG) y del ácido indol acético (AIA) no se cruzan y nos permiten cuantificar por separado y en mezcla, además en ambos casos cumplen con todos los puntos de elección, resolución del espectro, longitudes de onda máximo, los valores de absorbancia son los adecuados para poder realizar una curva de calibración, y finalmente las longitudes máximas de cada hormona no se cruzan entre ellas y nos facilitan la determinación de ambas hormonas.

- Luego de definir el orden de la derivada a utilizar en la cuantificación y del mismo modo las longitudes de onda máxima que utilizaremos para cada hormona. Realizamos las curvas de calibración con diez puntos estratégicamente elegidos para la determinación de nuestros productos, en el caso del ácido indol acético (AIA) se obtuvo una ecuación lineal con un factor de determinación (R^2) de 0.9999 y en el caso del ácido giberélico (AG) se obtuvo una ecuación líneas con un factor de determinación (R^2) de 0.9976; esto nos indica que nos encontramos con un sistema de medición con buena linealidad.
- En la cuantificación de los productos: Plentyphos, Gibbex y Fithor, se obtuvieron resultados muy próximos a los valores especificados en sus fichas técnicas (ver anexo B), con lo cual

podemos insinuar que la metodología propuesta es la más adecuada para la determinación. Para verificar que no sean falsos resultados realizamos una repetición de medición. Diez repeticiones por producto con lo que se obtuvieron desviaciones para el Plentyphos, Gibbex y Fithor de 0.2%, 0.6% y 0.07%, 1.9% correspondientemente los mismos que no exceden el 3% como desviación del valor promedio obtenido experimentalmente. Estadísticamente hablando tendríamos un método que nos ofrece repetibilidad en sus mediciones.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

- En base a los resultados obtenidos concluimos que el uso de la técnica de las derivadas mediante el equipo espectrofotómetro de UV-Vis, nos permite determinar la concentración de las hormonas reguladoras de crecimiento; ácido giberélico (AG) y ácido indol acético (AIA), en productos fertilizantes líquidos. Obteniéndose las siguientes concentraciones: Plentyphos 0.207 g/L (AIA), Gib-bex 9.9 g/L (AG) y el Fithor 41.21 g/L (AIA) 42.40 g/L (AG), los cuales se encuentran dentro del rango establecido en sus fichas técnicas (ver anexo B).
- El uso de mezcla de solventes muchas veces favorece a los análisis de cuantificación ya que cada solvente posee propiedades afines a cada molécula a determinar, en nuestro caso la mezcla de etanol y alcohol Isopropílico nos ha brindado estabilidad y mayor solubilidad con las hormonas de crecimiento; ácido indol acético (AIA) y ácido giberélico (AG), logrando mejorar la resolución de nuestros espectros y así poder determinar el contenido de las hormonas.
- La elección del orden de la derivada fue un factor importante ya que la cuantificación de cada hormona dependía del ordenamiento de los espectros, luego de los análisis realizados concluimos que la segunda derivada nos ayuda a cuantificar ambas hormonas en distintas longitudes de onda paralelamente o por separado.
- Luego del análisis de las cuatro órdenes de derivación y habiendo determinado el uso de la segunda derivada del ácido indol acético (AIA), se definió el uso de la longitud de onda

de 294 nm con la cual se obtuvieron los mejores resultados cuantitativos y el menor riesgo de interferencias producidos por el ácido giberélico (AG).

- El análisis de las cuatro órdenes de derivación y habiendo determinado el uso de la segunda derivada del ácido giberélico (AG) nos ayudó a definir el uso de la longitud de onda de 275 nm con la cual se obtuvieron los mejores resultados y el menor riesgo por interferencias producidas por el ácido indol acético (AIA).
- Las curvas de calibración obtenidas tanto para el ácido indol acético (AIA) y el ácido giberélico (AG), resultaron con un buen coeficiente de determinación con lo cual podemos predecir resultados confiables para nuestro método, el ácido indol acético (AIA) con un factor de determinación (R^2) de 0.9999 y en el caso del ácido giberélico (AG) con un factor de determinación (R^2) de 0.9976

CAPITULO 7

RECOMENDACIONES

- En el caso del uso de los solventes se debe tener mucha consideración, los factores de contaminación cruzada que podamos incurrir por el uso de material de vidrio no acondicionado puede llegar a interferirnos en nuestros análisis. Se recomienda realizar un lavado con material detergente, enjuague con agua destilada, un pequeño enjuague con alcohol étílico y finalmente secado en estufa para mantener totalmente seco el material de vidrio.
- Para la determinación de los espectros de cada orden de derivación, se recomienda realizar una limpieza de ruido mediante las opciones del software del equipo UV – Visible, en este caso realizar esta limpieza nos ayuda bastante a no tener problemas por factores externos como puede ser un cambio de niveles de voltaje ingresado al equipo, vibraciones externas, etc.
- En caso se desee poner en práctica la metodología propuesta no olvidar que el análisis se realiza para ambas hormonas mencionadas, si en caso hubiesen otras hormonas diferentes en el producto, se recomienda establecer una nueva metodología que nos ayude con el tema de separación.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Allen E., Rieman W. (1979). Determining only one compound in a mixture, short Spectrophotometric method. Anal Chem. Vol 25. 1325-1331.

Bak S., Fe T., Feldmann K., Galbraith D. y Feyereisen R. (2001). A cytochrome P450 at the metabolic branch point in auxin and indole glucosinolate biosynthesis in Arabidopsis. The Plant Cell. Vol 13. 101-111.

Carrasqueño A. y Navas P. (2015). Determinación de amilosa en presencia de amilopectina en almidón de arroz aplicando la espectroscopia derivada. Alimentos, Ciencia e Investigación. Vol. 23. 11-20.

Gamboa N. (1991). El empleo de la derivada en la espectroscopia Ultravioleta-Visible. Revista de Química. PUCP-Departamento de ciencias. Vol.2. 179-195

Garay A., Paz M., García B., Álvarez E. y Gutierrez C. (2014). La homeostasis de las auxinas y su importancia en el desarrollo de Arabidopsis Thaliana. REB. Vol. 33. 13 -22.

Heales S., Bennett J. (1985). The determination of methaemoglobin levels by first derivative spectroscopy. Clin Chem. Vol 153. 253-257.

Jaccoulet E., Schweitzer A., Toussaint B., Prognon P. y Caudron E. (2018). Simple and ultra-fast recognition and quantitation of compounded monoclonal antibodies: Application to flow injection analysis combined to UV spectroscopy and matching method. Talanta Vol.187. 279-286.

Jordán M. y Casaretto J. (2006). Hormonas y Reguladores de crecimiento: Auxinas, giberelinas y citocininas. Fisiología Vegetal (F.A. Squeo & L. Cardemil, eds). Vol. 15. 1 - 18.

Kaplan L. and Pesce J. (1986). Interferencias en el análisis espectral. Química clínica: teoría, análisis y correlación. Vol 1. 59-86.

Kus S., Marczenko Z. y Obarski N. (1996). Derivative UV-VIS Spectrophotometry in Analytical Chemistry. Chem. Anal.(Warsaw). Vol. 41. 899-927.

Lange R., Balny C. (2002). UV-Visible derivative spectroscopy under high pressure. Biochimica et biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology. 80 – 93.

Lopez P. y Lopez L. (1993). Una introducción a la espectrometría de derivadas. Educación Química. Vol. 3. 160-169.

Mason W, Henry R. (1980) Fotometría y espectrofotometría. Química clínica: Bases y técnicas. 1-47.

Merrick M. and Pardue H. (1986) Evaluation of absorption and first and second- derivative spectra for simultaneous quantitation of bilirubin and hemoglobin. Clin Chem. Vol 32. 598 602.

Ortega L., Ocampo J., Martinez C., Perez A. y Sánchez J. (2013). Efecto de las Giberelinas sobre el crecimiento y calidad de Plántulas de Tomate. Revista de Ciencias Biológicas y de la salud. Vol. 15. N°3. 56-60.

Owem T. (1987) Advances in UV-VIS spectroscopy: single and multicomponent quantitation. International laboratory. 24-29.

Parks J, Worth H. (1985) Carboxihemoglobin determination by second derivative spectroscopy. Clin Chem. Vol. 31. 279-281.

Pérez I., Aguilera I., Casals M., Ábalos A., y Pérez R. (2013). Evaluación mediante espectrofotometría UV-VIS derivativa de la degradación del 2-clorofenol. *Revista cubana de química* Vol. 25. N°3. 318 -327.

Seco L. (1995). Aplicaciones de la Espectrofotometría Derivada a la determinación de metales con el ácido Metiletilendiaminotetraacético (AMEDT). (Tesis Doctoral). Universidad de la Coruña.

Taulier A., Levillain P. and Lemonnier A. (1987). Determining methemoglobin in blood by zero-crossing-point first-derivative spectrometry. *Clin. Chem.* Vol 33. 1767-1770.

Tello M. (2006). Determinación de las Vitaminas B1,B6,B12, en un producto farmacéutico por espectrofotometría ultravioleta, aplicando la técnica de derivadas.(Tesis de pregrado). Universidad Nacional Federico Villarreal.

Walters M. and Thorton D. (1986). Multiwavelength analyses of derivative spectra: an application for the determination of urinary porphyrins. *Clin. Chem.* Vol 151. 311-316.

Zambrano A. (2014). Determinación cuantitativa de aminoácidos insaturados en suplementos alimenticios, aplicando la técnica de la segunda derivada.(Tesis de pregrado). Universidad Nacional Federico Villarreal.

Zwart A., Kampen E. and Zijlstra W. (1984). Multicomponent analysis of hemoglobin derivatives with a reversed-optics spectrometer. *Clin Chem* Vol. 30. 373-378.

ANEXOS

A. Características de espectros derivados.

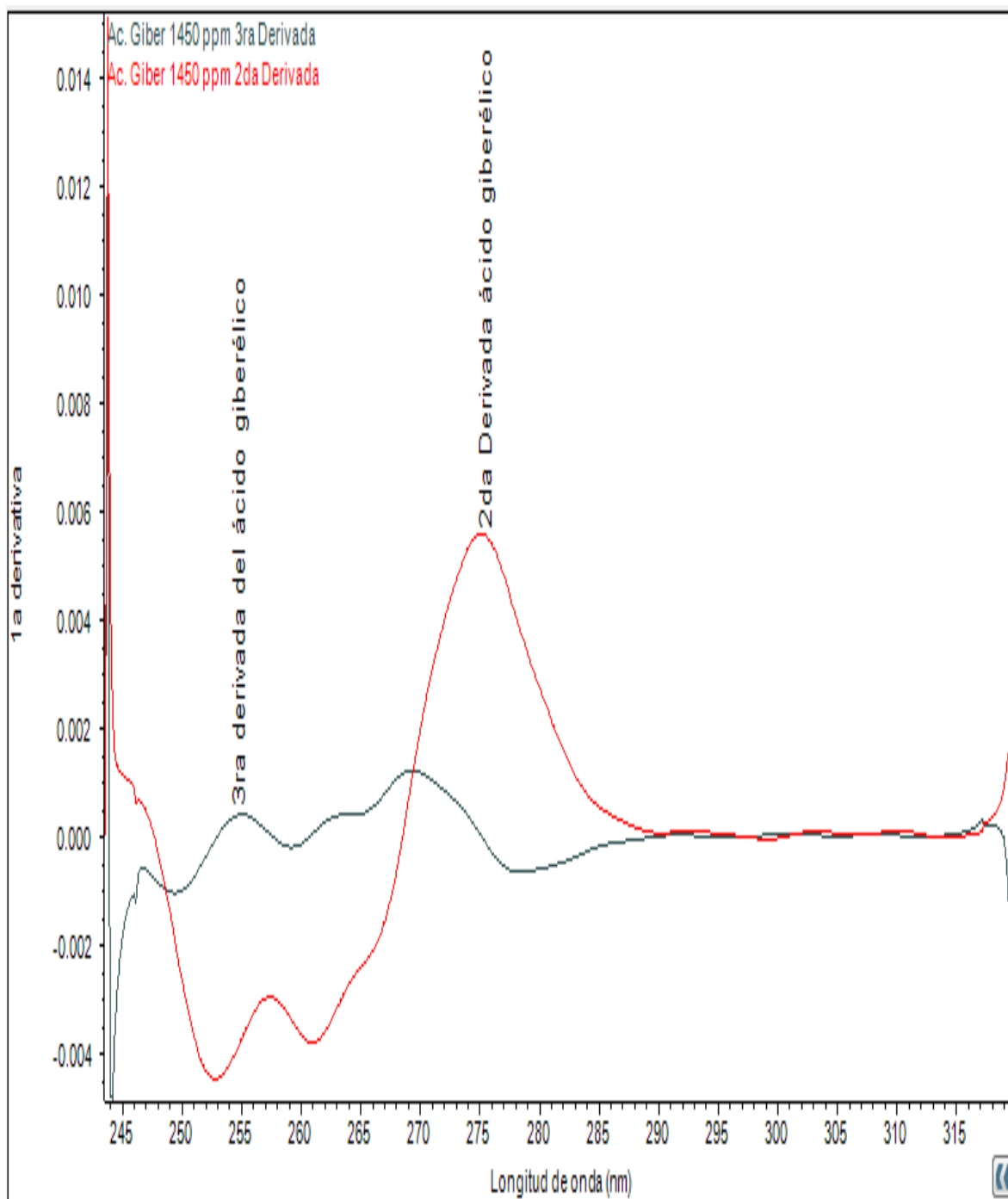


Figura 30. Comparación entre el espectro de segundo orden y tercer orden del ácido giberélico.

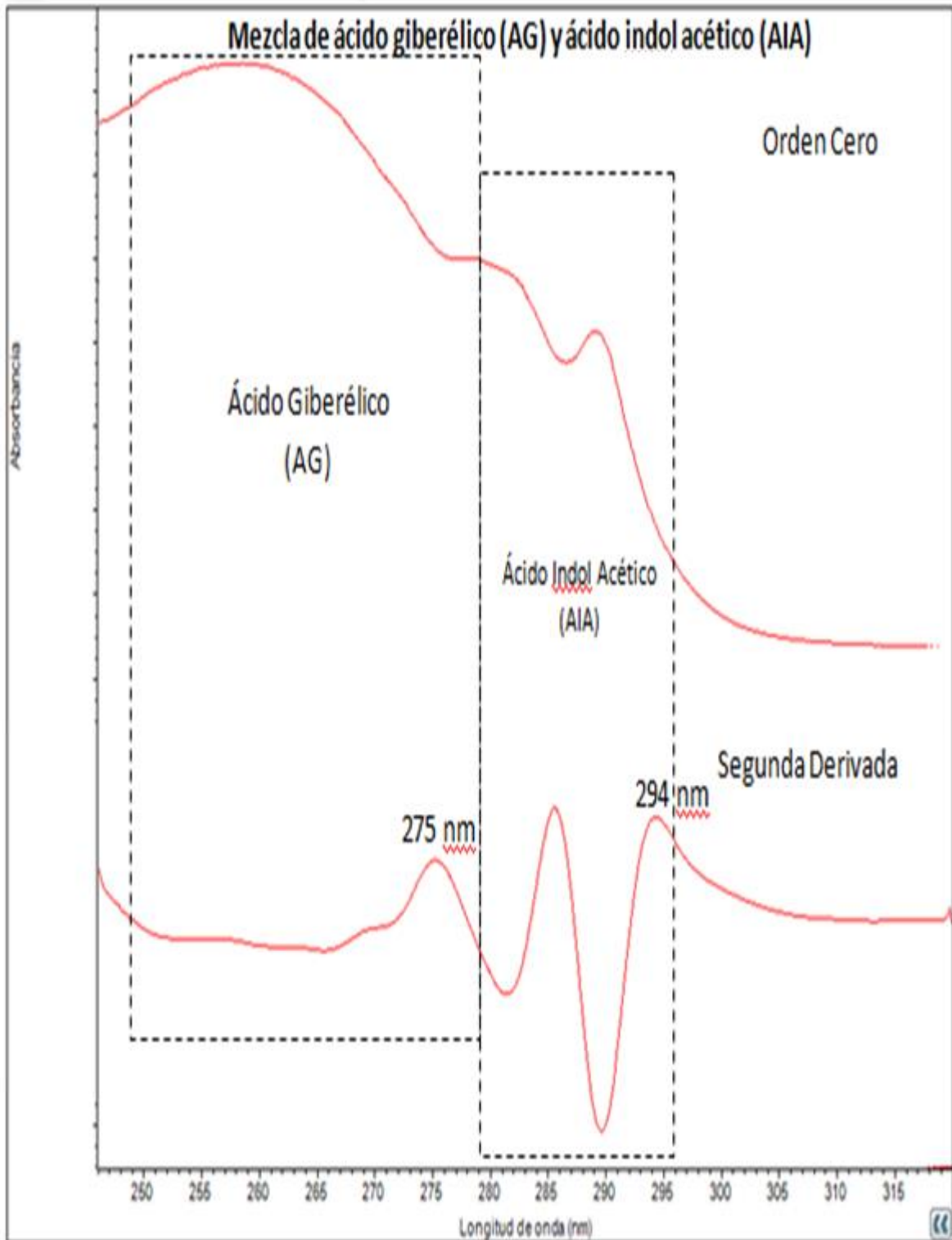


Figura 31. Mezcla de ácido giberélico (AG) y ácido indol acético (AIA) en orden cero y su segunda derivada.

B. Fichas técnicas de los productos evaluados

FICHA TÉCNICA "Plentyphos-P[®]"

EMPRESA: Comercial Andina Industrial S.A.C.

PRODUCTO: **Plentyphos-P[®]** - Fertilizante foliar líquido

I.- R.I.: 1525810C

II.- INGREDIENTES ACTIVOS:

Nitrógeno Total (N)	10.0 %
Fósforo Disponible (P O)	45.0 %
Potasio Soluble (K O)	10.0 %
Magnesio (MgO)	400 ppm
Hierro (Fe O)	100 ppm
Zinc (Zn)	100 ppm
Manganeso (Mn)	100 ppm
Cobre (Cu)	100 ppm
Ácido indol acético	0.200 gr

* Todos los resultados se encuentran sujetos a un margen de error del +/- 5%


III.- CARACTERÍSTICAS: Físico - Químicas

• Estado Físico	Líquido
• Color	
• Olor	
• Densidad	1.31 g/mL
• PH	4.6
• Solubilidad en agua	100 % soluble
• Inflamabilidad	No inflamable
• Explosividad	No explosivo
• Corrosividad	No corrosivo
• Combustibilidad	No combustible
• Estabilidad de la solución	Estable
• Estabilidad de almacenamiento	Estable 3 años

IV.- FORMULACIÓN: Concentrado Soluble.

V.- MODO DE ACCION:

Plentyphos-P[®] es un fertilizante foliar líquido concentrado, que por su alto contenido de Fósforo (P₂O₅), en combinación equilibrada con los demás elementos de su composición estimula la formación de raíces al inicio de los cultivos, y en su fase final acelera la maduración y



Grupo Andina

Av. 1579, 7mo piso. Oficina 702, Edificio Del Park II, Lima 18 - Perú / Tel.: (01) 253-6444 - Fax: 271-1988 / e-mail: atencioncliente@grupoandina.com.pe
www.grupoandina.com.pe

Figura 32. Ficha técnica del producto Plentyphos – Parte 1.

crecimiento mejorando calidad y tamaño, acelera la formación de brotes, recupera plantas con problemas elevando sus rendimientos

VI.- RECOMENDACIONES DE USOS:

CULTIVO	En 200 litros de agua	EPOCA Y N° DE APLICACIONES
Papa	1 a 2 L	Dos aplicaciones foliares, la primera a los 20 a 25 días de siembra y la segunda a los 20 días después de la anterior aplicación.
Algodón	1 a 2 L	1° Después desahije.
Tomate, ají, pimiento, páprika, espárrago, alcachofa	1 a 2 L	1° A los 20 a 25 días de la siembra o trasplante de frutos en mezcla con Citogib®. 2° Acabado de frutos en mezcla con Citogib®.
Frijol, vainita, arveja, pallar, garbanzo	1 a 2 L	1° A los 15 a 20 días de la siembra. 2° Acabado de frutos en mezcla con Citogib®.
Zapallo, sandía, pepinillo, melón, zapallito italiano.	1 a 2 L	1° A los 20 a 25 días de la siembra. 2° Acabado de frutos en mezcla con Citogib®.
Lechuga, coliflor, brócoli, col, apio, poro, nabo, ajo, cebolla	1 a 2 L	1° A los 20 a 25 días de la siembra o trasplante. 2° A los 20 a 25 días de la primera en mezcla con Citogib®.
Cítricos, manzano, melocotón, peral, fresas, mango	1 a 2 L	1° Para el acabado en mezcla con Citogib®.
Marigold, rosas	1 a 2 L	1° Después de cada cosecha.

VII.- MOMENTO DE APLICACIÓN:

Plentyphos-P® se recomienda aplicarlo de acuerdo a las recomendaciones de la etiqueta comercial

VIII.- TOLERANCIAS Y CARENCIAS:

No aplicable por tratarse de un fertilizante foliar, no biocida.

IX.- DESCARGO DE RESPONSABILIDAD

Comercial Andina Industrial S.A.C. no tendrá responsabilidad alguna por ninguna pérdida, sin limitación alguna, pérdidas directas, indirectas o consecuentes, lucro cesante, interrupción de negocios, pérdidas de



Av. Benavides 1579. 7mo piso. Oficina 702. Edificio Del Park II. Lima 18 - Perú / Tel.: (01) 253-6444 - Fax: 271-1988 / e-mail: atencioncliente@grupoandina.com.pe
www.grupoandina.com.pe

Figura 33. Ficha técnica del producto Plentyphos – Parte 2.

FICHA TÉCNICA

ingreso, demandas, reclamos, acciones, procedimientos, daños y perjuicios, pagos, gastos u otras obligaciones ocasionadas o sufridas por cualquier persona que tome cualquier acción o se abstenga de tomar cualquier acción a la información contenida en esta Ficha Técnica.

X.- CATEGORÍA TOXICOLÓGICA

Plentyphos-P® es un fertilizante foliar muy seguro, pero por una norma elemental de seguridad, se sugiere tomar las más elementales medidas de protección y seguridad durante su uso y manejo.

File: Ficha Técnica / 8-32-5® / 29.05.12



**Grup
Andina**

Av. Benavides 1579, 7mo piso, Oficina 702, Edificio Del Park II, Lima 18 - Perú / Tel.: (01) 253-6444 - Fax: 271-1988 / e-mail: atencionalcliente@grupoandina.com.pe
www.grupoandina.com.pe

Figura 34. Ficha técnica del producto Plentyphos – Parte 3.

FICHA TÉCNICA “Gib-bex®”
I.- IDENTIFICACIÓN DEL PRODUCTO Y LA COMPAÑÍA:

EMPRESA: **Comercial Andina Industrial S.A.C.**
 PRODUCTO: **“Gib-bex®”- Regulador de crecimiento.**
 N°. REG. N° 912-99-AG-SENASA

II.- INGREDIENTES ACTIVOS:

- Giberelinas 9.89 g/L
- Extracto de algas 901.1 g/L

* Los resultados pueden tener un margen de error de +/- 5%.

III.- CARACTERÍSTICAS: Físico - Químicas

- | | |
|---------------------------------|----------------|
| • Estado Físico | Líquido |
| • Color | Rojo |
| • Olor | Característico |
| • Densidad | 1.01 +/- 0.01 |
| • PH | 3.1 +/- 0.1 |
| • Solubilidad en agua | 100 % Soluble |
| • Inflamabilidad | No inflamable |
| • Explosividad | No explosivo |
| • Corrosividad | No corrosivo |
| • Combustibilidad | No combustible |
| • Estabilidad | Estable |
| • Estabilidad de almacenamiento | Estable 2 años |

IV.- FORMULACIÓN: Concentrado Soluble.
V.- MODO DE ACCION:

Los componentes del **Gib-bex®** ingresan a través de la cutícula y de las paredes celulares de los diversos órganos de la planta, produciendo un incremento pronunciado del tamaño de las células, así como un incremento en la capacidad fotosintética del cultivo, aumentando contenido de azúcares, elevando la presión osmótica celular, expandiéndola; favorece el crecimiento longitudinal de frutos, tallos, alargamiento en vainas y otros cultivos.

Figura 35. Ficha técnica del producto Gibbex – Parte 1.

Los extractos de alga presente en el formulado evitan el efecto de clorosis temporal pos aplicación, que es notorio en otras formulaciones de ácido giberélico disuelto en alcohol.

Logra respuestas confiables en diversas condiciones ambientales y de cultivo debido a su alto nivel de pureza y concentración.

Proporciona los siguientes beneficios:

- Promueve el crecimiento y elongación de los tallos controlando el tamaño general de la planta.
- Promueve la inducción floral en los cultivos.
- Promueve el crecimiento de los frutos reduciendo los desórdenes fisiológicos.

VI.- RECOMENDACIONES DE USOS

CULTIVO	Dosis en 200 L de agua	Momento de uso
Papa	125 ml.	Tratamiento de semilla durante 5 minutos.
Brócoli	125 ml.	Inicio de formación de las cabezuelas.
Alcachofa	125 ml.	60 días después del trasplante.
Páprika	125 ml.	60-70 días después del trasplante.

VII.- MOMENTO DE APLICACIÓN:

Aplicar de acuerdo a las recomendaciones de la etiqueta comercial.

VIII.- TOLERANCIAS Y CARENCIAS:

No aplicable por tratarse de un producto cuyos componentes son a base de sustancias provenientes de fuentes orgánicas y extractos de algas, no biocida.



Figura 36. Ficha técnica del producto Gibbex – Parte 2.

IX.- DESCARGO DE RESPONSABILIDAD

Comercial Andina Industrial S.A.C. no tendrá responsabilidad alguna por ninguna pérdida, sin limitación alguna, pérdidas directas, indirectas o consecuentes, lucro cesante, interrupción de negocios, pérdidas de ingreso, demandas, reclamos, acciones, procedimientos, daños y perjuicios, pagos, gastos u otras obligaciones ocasionadas o sufridas por cualquier persona que tome cualquier acción o se abstenga de tomar cualquier acción a la información contenida en esta Ficha Técnica.

X.- CATEGORÍA TOXICOLÓGICA

Ligeramente tóxico – banda verde – Categoría IV.

File: Ficha Técnica / **Gib-bex**[®] / 22.01.15



Figura 37. Ficha técnica del producto Gibbex – Parte 3.

FICHA TÉCNICA "Fithor[®]"

EMPRESA: Comercial Andina Industrial S.A.C.

PRODUCTO: **Fithor[®]** - Regulador de crecimiento vegetal

I.- Registro SENASA 856 – 99 – AG-SENASA

II.- INGREDIENTES ACTIVOS:

- Giberelinas	41.08 g/L
- Ácido indol acético	40.91 g/L
- Extracto de Algas	918.01 g/L

* Los resultados pueden tener un margen de error de +/- 5%.

III.- CARACTERÍSTICAS: Físico - Químicas

• Estado Físico	Líquido
• Color	Azulino
• Olor	Característico
• Densidad	1.02 +/- 0.01
• PH	3.0 +/- 0.1
• Solubilidad en agua	100 % soluble
• Inflamabilidad	No inflamable
• Explosividad	No explosivo
• Corrosividad	No corrosivo
• Combustibilidad	No combustible
• Estabilidad de la solución	Estable
• Estabilidad de almacenamiento	Estable 2 años

IV.- FORMULACIÓN: Concentrado Soluble.

V.- MODO DE ACCION:

Fithor[®] es un regulador de crecimiento vegetal que favorece la multiplicación celular aumentando en tamaño, y grosor de los cultivos, provoca el brotamiento de yemas y brotación en la semilla de papa.

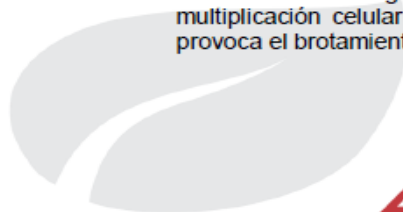


Figura 38. Ficha técnica del producto Fithor – Parte 1.

VI.- RECOMENDACIONES DE USOS: está inicialmente recomendado su uso en el cultivo de papa, 100 ml. En 200 lts. De agua para hacer la inmersión por un espacio de tiempo de 5 minutos.

VII.- MOMENTO DE APLICACIÓN:

Fithor® se recomienda aplicarlo de acuerdo a las recomendaciones de la etiqueta comercial

VIII.- TOLERANCIAS Y CARENCIAS:

No aplicable por tratarse de un regulador de crecimiento vegetal, no biocida.

IX.- DESCARGO DE RESPONSABILIDAD

Comercial Andina Industrial S.A.C. no tendrá responsabilidad alguna por ninguna pérdida, sin limitación alguna, pérdidas directas, indirectas o consecuentes, lucro cesante, interrupción de negocios, pérdidas de ingreso, demandas, reclamos, acciones, procedimientos, daños y perjuicios, pagos, gastos u otras obligaciones ocasionadas o sufridas por cualquier persona que tome cualquier acción o se abstenga de tomar cualquier acción a la información contenida en esta Ficha Técnica.

X.- CATEGORÍA TOXICOLÓGICA

Fithor® es un regulador de crecimiento muy seguro, pero por una norma elemental de seguridad, se sugiere tomar las más elementales medidas de protección y seguridad durante su uso y manejo.



File: **Fithor**®/ Ficha técnica / 16-04-07



**Grupo
Andina**

Figura 39. Ficha técnica del producto Fithor – Parte 2.

C. Fotos de los productos terminados analizados.

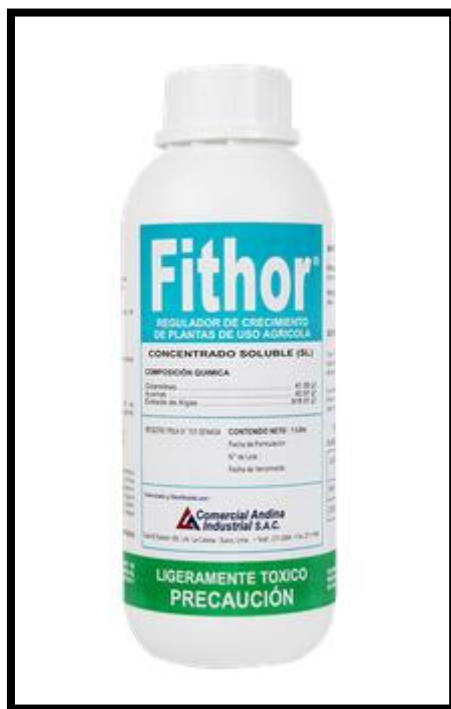


Figura 40. Producto Fithor presentación de 1 litro.



Figura 41. Producto Gib-Bex de 1 litro.

