



TECNOLOGÍA

en marcha



Revista trimestral
Octubre – Diciembre 2019
Volumen 32 N° 4

ISSN 0379-3982 / ISSN-E 2215-3241

Publicación y directorio en catálogos



TEC | Tecnológico
de Costa Rica

latindex

Dialnet
DOAJ

SciELO
REDIB
Red Iberoamericana
de Investigación y Conocimiento Científico

Comisión Editorial

Ana Ruth Vilchez Rodriguez, Directora.
Instituto Tecnológico de Costa Rica

Juan Antonio Aguilar Garib
Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica
Universidad Autónoma de Nuevo León,
México

Carlos Andrés Arredondo Orozco
Facultad de Ingenierías
Universidad de Medellín, Colombia

Lars Köhler
Experimenteller Botanischer Garten
Georg-August-Universität Göttingen,
Alemania

Jorge Solano Jiménez
Instituto Costarricense del Cemento
y del Concreto

Edición técnica

Alexa Ramírez Vega

Revisión filológica

Esperanza Buitrago Poveda

Diseño gráfico

Felipe Abarca Fedullo

Diagramación

Asesoría en Ediciones gráficas

Diseño de cubierta

Felipe Abarca Fedullo

Imagen de cubierta

<http://www.freeimages.com/>

Datos de catalogación en publicación

Tecnología en Marcha / Editorial Tecnológica
de Costa Rica. - Vol. 32-4, Octubre-
Diciembre (2019) -Cartago: la Editorial, 2019
- Trimestral
ISSN-E 2215-3241

1. Ciencia y Tecnología -
Publicaciones periódicas CDD:600



TEC | Tecnológico
de Costa Rica

Apdo 159-7050 Cartago, Costa Rica
Tel.:(506) 2550-2297, 2550-2618
Correo electrónico: editorial@itcr.ac.cr
Web: editorial.tec.ac.cr
http://revistas.tec.ac.cr/tec_marcha



TEC | Tecnológico
de Costa Rica

La Editorial Tecnológica de Costa Rica es una dependencia especializada del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Desde su creación, en 1978, se ha dedicado a la edición y publicación de obras en ciencia y tecnología. Las obras que se han editado abarcan distintos ámbitos respondiendo a la orientación general de la Institución.

Hasta el momento se han editado obras que abarcan distintos campos del conocimiento científico-tecnológico y han constituido aportes para los diferentes sectores de la comunidad nacional e internacional.

La principal motivación de la Editorial es recoger y difundir los conocimientos relevantes en ciencia y tecnología, llevándolos a los sectores de la comunidad que los requieren.

La revista *Tecnología en Marcha* es publicada por la Editorial Tecnológica de Costa Rica, con periodicidad trimestral. Su principal temática es la difusión de resultados de investigación en áreas de Ingeniería. El contenido de la revista está dirigido a investigadores, especialistas, docentes y estudiantes universitarios de todo el mundo.

Publicación y directorio en catálogos





Revista trimestral
Abril – Junio 2019
Volumen 32 N° 4

ISSN 0379-3982 / ISSN-E 2215-3241

TECNOLOGÍA *en marcha*

Contenido

Situación actual de los Centros Municipales de Recuperación de Residuos Valorizables (CRRV) en Costa Rica

Current situation of Municipal Material Recovery Facilities (MRF) in Costa Rica

Keneth Masís-Leandro, Lilliana Abarca-Guerrero 3

Determinación del caudal ambiental en el río Birrís, Costa Rica

Determination of Environmental Flow of the Birrís River, Costa Rica

Isabel Guzmán-Arias, Fernando Watson, Karolina Villagra-Mendoza 18

Efecto de la sustitución de insumos en el crecimiento *in vitro* de Raicilla

Effect of culture media substitutions on *in vitro* growth of Ipecac

Alexander Jiménez-Rivera, Wayner Montero-Carmona 28

Mutagénesis dirigida del conector interdominio ácido FVIIIa3 del factor VIII de la coagulación como estrategia para favorecer la cristalización de sus complejos con la trombina

Site-directed mutagenesis of the acidic interdomain linker FVIIIa3 of the coagulation factor VIII as a strategy to favor crystallization of its complexes with thrombin

Jeremy Rojas-Murcia, Silvia Arce-Solano², Pablo Fuentes-Prior,

Erick Hernández-Carvajal 39

Evaluación de antioxidantes en el té de hojas de camote morado (*Ipomoea batatas* L.)

Antioxidant evaluation in the sweet potato purple (*Ipomoea batatas* L.) Leaves tea

Rebeca Cervantes-Sierra, Melquiades Barragán-Condori,

Guadalupe Chaquilla-Quilca 51

Simulación de gasificación de biomasa enriquecida con hidrocarburos

Simulation of gasification of hydrocarbons-enriched biomass

Andrey Caballero-Chavarría, Maybi Patricia Rojas-Soto, Melissa María Villalobos-Barquero, Alexander

Davis-Barquero, Carlos Roldan-Villalobos, Róger Moya, Allen Puente-Urbina 60

Mesenchymal Stem Cell Isolation from Mice Inguinal Fat Tissue: a protocol to get the best from small samples

Aislamiento de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo del pliegue inguinal murino: un protocolo para obtener lo mejor de pequeñas muestras

Silvia Castro-Piedra, Johan Morales-Sánchez 69

Control de calidad de fitofármacos con la utilización de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la aplicación del análisis de componentes principales (PCA)

Quality control of phytopharmaceuticals with the use of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and the application of principal component analysis (PCA)

Javier Quesada-Espinoza, Renato Murillo-Masís 81

Whole-Body SAR Simulations on a Prolate Spheroid Using Different Plane Wave Polarizations up to 100 GHz

Simulaciones de tasa de absorción específica (SAR) de cuerpo completo sobre un esferoide prolato utilizando diferentes polarizaciones de onda plana hasta 100 GHz

José Enrique Hernández-Bonilla, Heinz-Dietrich Brüns, Renato Rimolo-Donadio, Christian Schuster 95

Nuevo índice para valorar la calidad de aguas superficiales en Costa Rica

New index for evaluating the surface waters quality in Costa Rica

Guillermo Calvo-Brenes 104

Retención de carbono en un suelo dedicado al cultivo de piña (*Ananas comosus* (L.) bajo un manejo convencional y de mínima labranza

Carbon sequestration in a soil dedicated to the cultivation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) under conventional management and minimum tillage

Ronald Fonseca-Vargas, Parménides Furcal-Beriguete, Rooel Campos-Rodríguez, Edwin Esquivel-Segura 116

Producción de proteínas recombinantes a partir de animales transgénicos: Sistemas y aplicaciones

Recombinant protein production from transgenic animals: Systems and applications

María Fernanda Alvarado-Madrigal, Tannia Chavarría-Quirós, Brayan Leiva-Montero, Juan José Mora-Román 133

Uso de la simulación en procesos de construcción

Use of simulation in construction processes

Alejandro Ramón-Elizondo, Róger Barboza-Arguedas 145

Evaluación del uso de Redes Bayesianas Dinámicas para la predicción del avance de la Sigatoka negra y la productividad en cultivos agrícolas 158

Evaluation of Dynamic Bayesian Networks for predicting the progress of the Black Sigatoka and the productivity in crops 158

Luis Alexander Calvo-Valverde, Sebastián Argüello 158

Rediseño del sistema de transporte de racimos de banano para la recolección en el campo. Caso de estudio: Studer Innotec

Redesign of the transport system of banana bunches for field harvesting. Case study: Studer Innotec

Jose Luis Ordoñez-Avila, María Elena Perdomo-Perdomo 171

Situación actual de los Centros Municipales de Recuperación de Residuos Valorizables (CRRV) en Costa Rica

Current situation of Municipal Material Recovery Facilities (MRF) in Costa Rica

Keneth Masís-Leandro¹, Lilliana Abarca-Guerrero²

Fecha de recepción: 7 de noviembre de 2018


Fecha de aceptación: 23 de marzo de 2019

Masís-Leandro, K; Abarca-Guerrero, L. Situación actual de los Centros Municipales de Recuperación de Residuos Valorizables (CRRV) en Costa Rica. *Tecnología en Marcha*. Vol. 32-4. Octubre-Diciembre 2019. Pág 3-17.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i4.4785>



1 Escuela de Química, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Ingeniero Ambiental, Investigador principal con licenciatura en Ingeniería Ambiental. Correo electrónico: masisleandrokenneth@gmail.com.

 <https://orcid.org/0000-0003-0946-973X>

2 Escuela de Química, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Química, docente e investigadora. Departamento de Built Environment, Eindhoven University of Technology, Den Dolech, 25612 AZ Eindhoven, Holanda. Correo electrónico: labarca@tec.ac.cr.

 <https://orcid.org/0000-0001-5129-3104>

Palabras clave

Gestión Integral de Residuos Sólidos; Costa Rica; Municipalidad; Centro de Recuperación de Residuos Valorizables; Infraestructura; Tecnología; Procedimientos de trabajo.

Resumen

La promoción de Centros de Recuperación de Residuos Valorizables (CRRV) forma parte de la estrategia país para aumentar el porcentaje de residuos valorizados. Sin embargo, existe un vacío de conocimiento sobre el manejo y los procesos productivos de los CRRV a nivel nacional. Este trabajo explora los factores técnicos y ambientales relacionados con la infraestructura, tecnología y procedimientos de trabajo de los CRRV de propiedad municipal. Se obtuvo información a través de una encuesta de 15 CRRV municipales, de los cuales 5 fueron visitados para corroborar y ampliar la información recolectada. En el 80% de las instalaciones se procesan menos de 41 ton / mes de residuos y en el 93% la operación de separación se lleva a cabo manualmente sobre una superficie estática, este método de separación es adecuado para la cantidad de residuos procesados en 87% de los casos. La ubicación, topografía y accesibilidad de los terrenos son en general adecuadas y no afectan negativamente el desempeño de las instalaciones. En la mayoría de los casos la infraestructura no fue diseñada para funcionar como CRRV, por lo que sus características no están orientadas a una máxima eficiencia en la operación. La ausencia de registros y procedimientos de trabajo escritos es una constante en los casos estudiados. En la mayoría de las instalaciones, se identificaron condiciones ergonómicas inadecuadas en las estaciones de clasificación, ausencia de métodos para evaluar el desempeño de los operarios y deficiencias en el proceso de capacitación del personal.

Keywords

Integrated Solid Waste Management; Costa Rica; Municipality; Material Recovery Facility; Infrastructure; Technology; Work procedures.

Abstract

The promotion of Material Recovery Facilities (MRF) is part of the country strategy to increase the percentage of recovered waste. However, there is a knowledge gap on the management and production processes of the MRF at the national level. This work explores the technical and environmental factors related to the infrastructure, equipment and work procedures of municipally owned MRF in the country. Information of 15 municipal MRF was obtained via a survey, of which 5 were visited in order to corroborate and expand the information collected. In 80% of the facilities, less than 41 ton / month of waste are processed and in 93% of them the separation operation is carried out manually on a static surface, this separation method is suitable for the quantity of waste processed in 87% of cases. The location, topography and accessibility of the lands are generally adequate and do not negatively affect the performance of the facilities. In most cases, the infrastructure was not designed to function as a MRF, so its characteristics are not oriented to maximum efficiency in the operation. The absence of records and written work procedures is a constant in the facilities studied. In most cases, inadequate ergonomic conditions were identified in the classification stations, absence of methods to evaluate the performance of the operators and deficiencies in the personnel training process.

Introducción

La gestión de residuos sólidos con énfasis en la recuperación y valorización se ha convertido en una tendencia global [1]. Como parte de ese proceso, los Centros de Recuperación de Residuos Valorizables (CRRV) han pasado a jugar un rol central en los sistemas actuales de gestión de residuos. Los CRRV funcionan como un paso intermedio entre la recolección de residuos a los generadores y su valorización en la industria, lo que ha permitido aumentar la cantidad de materiales recuperados y la reducción de los costos de toda la cadena de manejo [2], [3].

En Costa Rica, diversas leyes y reglamentos promueven y regulan el establecimiento de los CRRV. La Ley N° 8839 para la Gestión Integral de los Residuos Sólidos [4] dispuso, en su artículo 8, el deber de las municipalidades de garantizar que en su territorio se brinde el servicio de centros de recuperación de materiales. Además, en la Estrategia Nacional de Separación, Recuperación y Valorización de Residuos (ENSRVR) [5] se establece que las autoridades locales deben valorar la construcción de esta clase de instalaciones. En la actualidad, según datos de la Fundación para la Sostenibilidad y la Equidad (Aliarse), un 30,4% de las municipalidades del país cuenta con CRRV propio [6].

Los CRRV son instalaciones industriales y por lo tanto su eficiente funcionamiento depende de que se controlen cuidadosamente todos los aspectos de su diseño y operación [7]. Muchas municipalidades en Costa Rica enfrentan dificultades en los diversos aspectos del manejo de sus CRRV. En el aspecto financiero es común una asignación presupuestaria insuficiente para la Gestión Integral de Residuos Sólidos (GIRS), en lo institucional se tiene el riesgo de que las autoridades municipales de cada periodo tengan visiones distintas sobre la GIRS en el cantón y se dificulte la consolidación de proyectos. Adicionalmente, la urgente necesidad ambiental y de salud pública de recolectar y tratar una creciente generación de residuos puede provocar que las autoridades se decidan por la disposición final antes que la valorización. En el aspecto técnico es frecuente la ausencia de infraestructura adecuada para albergar un eficiente CRRV e insuficientes vehículos disponibles para nutrirlo con la recolección selectiva. En lo relativo al aspecto sociocultural, la cultura y el conocimiento de separar adecuadamente los residuos aún no son generalizados en la población. Finalmente, en el aspecto legal, no existe claridad en la implementación de sanciones e incentivos para promover la reducción y la valorización de residuos desde el origen [8], [9], [10].

En este contexto, el objetivo de este artículo es brindar información sobre la situación actual de algunos CRRV de propiedad municipal en Costa Rica, enfocándose en los aspectos *técnicos* y *ambientales*.

La revisión de literatura nacional e internacional permitió identificar los factores que desde el diseño y la operación afectan el desempeño técnico y ambiental de los CRRV. Los factores fueron agrupados basándose en lo hecho para la Illinois Recycling Association [11] y en su relación con las áreas funcionales de una empresa [12]. Alrededor de esta categorización se realizó la investigación y se presentan los resultados. Los grupos son los siguientes:

1. Localización y características del terreno donde se ubica el CRRV
2. Infraestructura disponible
3. Equipo y mobiliario disponible
4. Gestión de la materia prima
5. Gestión del recurso humano
6. Procedimientos de trabajo

Metodología

Se elaboró una encuesta con el propósito de caracterizar a los CRRV respecto a los factores identificados en la literatura nacional e internacional. Se combinaron preguntas de respuesta corta, selección binomial (Sí/No), escala Likert de 5 puntos y casillas de verificación, según la información que se pretendiera recolectar.

Antes de ser enviada por correo electrónico, la encuesta se aplicó presencialmente en el CRRV de Montes de Oca, con el fin de evaluar su claridad, medir el tiempo de respuesta e introducir las modificaciones pertinentes. El instrumento fue enviado vía correo electrónico a 76 de las 81 municipalidades del país.

Se recibieron 15 encuestas completas. Posteriormente con la recomendación del señor MSc. Luis Diego Jiménez, Director de Proyectos Ambientales de la Fundación Aliarse [6] se seleccionaron cinco CRRV para realizar visitas de campo con el fin de corroborar y ampliar la información recibida en la encuesta.

Una vez procesadas las encuestas y realizadas las visitas a los CRRV se convocó a los encargados de los CRRV municipales a un taller participativo en las instalaciones del Instituto Tecnológico de Costa Rica. El objetivo del taller fue presentar los resultados parciales de la investigación y obtener el punto de vista de los presentes sobre la situación descrita. La metodología para preparar y conducir el taller se basó en el artículo *¿Cómo hacer talleres participativos con respuestas individuales?* [13].

Resultados y discusión

Mediante la encuesta enviada por correo electrónico se obtuvo información de quince CRRV pertenecientes a municipalidades ubicadas en las regiones socioeconómicas Chorotega, Brunca y Central. La mayoría de las instalaciones de la región Central se ubican en el Gran Área Metropolitana (GAM). Por lo anterior, el estudio presenta una limitación ya que los resultados se refieren principalmente a CRRV de instalaciones ubicadas en la región central y metropolitana del país.

No se obtuvo autorización por parte de los municipios para nombrar explícitamente el cantón de los CRRV participantes del estudio, por lo cual se hará referencia a las instalaciones con un número, tal como aparece en el cuadro 1 junto con la región socioeconómica en que están ubicados y los años que llevan en operación.

Como puede observarse en el cuadro 1, doce de los CRRV estudiados se ubican en la región central del país, incluyendo diez de los treinta y un cantones que conforman la GAM, por lo tanto, los resultados de la presente investigación deben entenderse principalmente como reflejo de la situación de esta región del país. Resalta el hecho de que siete de los CRRV iniciaron operaciones antes de la promulgación de la Ley N° 8839 [4]. En el caso de tres de las instalaciones visitadas esto se debe a que antiguamente eran instalaciones privadas que fueron adquiridas por el municipio.

Localización y características del terreno donde se ubica el CRRV

En general las instalaciones estudiadas se encuentran en terrenos ubicados dentro de los centros de población donde se generan los residuos que procesan, sin riesgo de inundación, deslave o hundimiento y con vías de acceso en buen estado, cumpliendo con lo reportado como conveniente en la literatura [11].

Cuadro 1. Región socioeconómica y años de operación de los CRRV estudiados

CRRV	Región socioeconómica	Años en operación
01	Central (GAM)	1
02	Central	10
03	Central (GAM)	3
04	Central (GAM)	4
05	Chorotega	9
06	Chorotega	8
07	Central (GAM)	6
08	Brunca	2
09	Central (GAM)	16
10	Central (GAM)	10
11	Central (GAM)	5
12	Central (GAM)	13
13	Central (GAM)	8
14	Central (GAM)	10
15	Central	12

Por otro lado, un 53% de las instalaciones estudiadas se encuentran en terrenos colindantes a casas de habitación y no poseen área de amortiguamiento entre las zonas de trabajo y las propiedades vecinas. Esto resulta inconveniente pues la acumulación de residuos cerca de las propiedades puede generar preocupaciones de índole sanitaria en los propietarios y provocar su oposición al proyecto [14]. En uno de los casos visitados se han recibido quejas de los vecinos por temor a la existencia de criaderos de dengue en los residuos acumulados. Adicionalmente, en un 60% de los terrenos no existe posibilidad de expandir el tamaño actual de las instalaciones.

Infraestructura

Como para toda actividad industrial, la infraestructura de los CRRV debe ser planificada y diseñada teniendo en cuenta la naturaleza de las actividades que se llevarán a cabo en el edificio, lo que incluye el diseño estructural, eléctrico y de fontanería [7]. En un 53% de los casos estudiados, la infraestructura en que funcionan actualmente los CRRV no fue específicamente construida con ese fin, sino que corresponden a instalaciones en que anteriormente se desempeñaba otra clase de actividad, por lo cual sus características no están diseñadas para proveer una máxima eficiencia en la operación.

Las edificaciones en que operan los CRRV deben maximizar el espacio libre con el fin de proveer flexibilidad para el emplazamiento de los equipos y el tránsito interno. Sin embargo, en un 53% de las edificaciones existen paredes internas que limitan el libre movimiento de residuos y operarios. Asimismo, la infraestructura debe permitir que el proceso fluya libremente sin retrocesos ni manejo repetido de los materiales, con una puerta para el acceso de residuos y otra para la salida del producto separado [11]. Contrario a esto, dos de las edificaciones visitadas poseen una única entrada, por lo que se produce interferencia entre la entrada y salida de residuos. Por otro lado, un 67% de las instalaciones no cuentan con un muelle para agilizar la operación de carga y descarga (figura 1).



Figura 1. Instalación con un único acceso y sin muelle de carga (a) e instalación con entrada y salida separadas, así con como un muelle de carga (b).

Gestión de materia prima

Cantidad de materiales vendidos

Lobo et al. [15] utilizaron una clasificación de tamaño para los CRRV de Costa Rica basándose en la cantidad de toneladas de material vendido. Usando esta categorización los casos estudiados se agruparon según lo indicado en el cuadro 2. La única instalación que califica como Grande A es el CRRV 13, que de acuerdo con su jefe de planta es el CRRV de propiedad municipal de mayor tamaño del país [16].

Cuadro 2. Categorización de los CRRV estudiados con base en la cantidad de materiales vendidos.

Categoría	Materiales vendidos (ton/mes)	Casos estudiados
Pequeño	< 10	5
Mediano	10 - 30	5
Grande B	30 - 100	4
Grande A	> 100	1

Cantidad de residuos no recuperables

No todos los residuos que ingresan a un centro de recuperación pueden ser efectivamente recuperados y comercializados, cierto porcentaje de la corriente de entrada debe desecharse y enviarse al relleno sanitario u otro sitio de disposición final, ya sea porque se trata de materiales para los cuales no se tiene comprador, materiales sucios o contaminados con materia orgánica, o porque son fracciones pequeñas de materiales valiosos que requerirían una inversión muy grande para su recuperación, como pueden ser trozos pequeños de vidrio.

La mayoría de los CRRV estudiados reportaron un porcentaje de residuos no recuperables de entre el 10% y el 25% del total que ingresa a las instalaciones (figura 2). El CRRV 06 y el 12 no realizaron una estimación numérica de la cantidad de residuos no recuperables, reportando el porcentaje como “muy pequeño”.

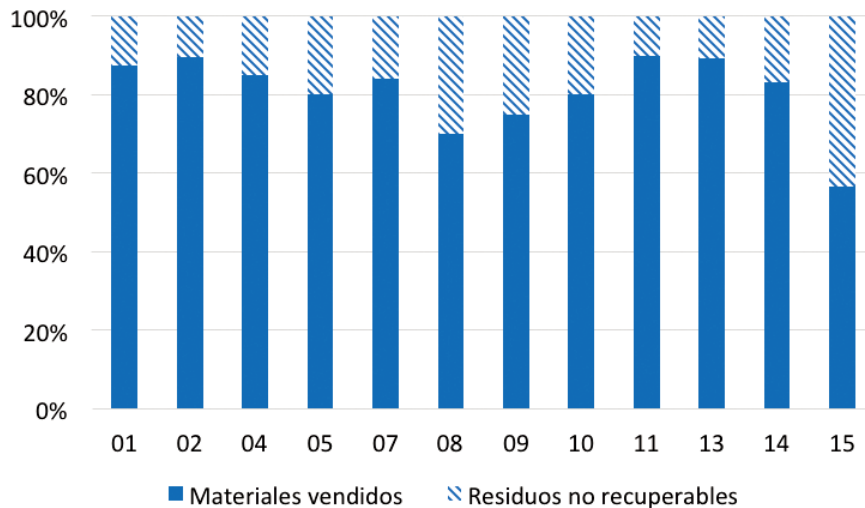


Figura 2. Porcentaje de residuos no recuperables en los CRRV estudiados

La tasa de valorización de residuos a nivel cantonal y nacional en Costa Rica es calculada con base en la cantidad de residuos recolectados por las municipalidades y entregados a los CRRV, sin tomar en consideración el porcentaje de residuos que no logra ser recuperado en estas instalaciones [17].

Proveedores de residuos

En todos los CRRV estudiados, los residuos que ingresan a las instalaciones provienen fundamentalmente de la recolección municipal de residuos valorizables, con excepción del CRRV 11 y el CRRV 14, que reciben únicamente residuos que ciudadanos particulares transportan a las instalaciones, modalidad conocida como Punto Limpio. En ninguno de los CRRV se paga por los materiales recibidos, sin embargo, cuatro de los casos estudiados participan del programa Ecolones, por lo que otorgan esta moneda virtual a cambio de los residuos que cumplan con los requisitos establecidos en el programa.

Descarga no autorizada de residuos

La descarga no autorizada de residuos por parte de la población en la entrada de las instalaciones durante las noches o fines de semana es una situación común en los CRRV. La acumulación de estos residuos a la intemperie genera preocupaciones de índole ambiental como atracción de vectores y deterioro del paisaje [11]. Todos los encargados de los CRRV visitados manifestaron haberse encontrado en algún momento con esta situación.

Tipo de corriente de entrada

En la ENSRVR [5] se pretende armonizar la forma en que las fuentes clasifican los residuos que generan previo a que sean recolectados, proponiendo la separación en bolsas con distintivos de color según material. Sin embargo, en un 93% de los CRRV estudiados los residuos nunca o casi nunca ingresan separados según lo propuesto en la ENSRVR, siendo lo normal que vengan en una sola bolsa los materiales mezclados. En los cuatro CRRV afiliados al programa Ecolones, se reciben residuos con mayor grado de separación cuando ciudadanos particulares los llevan con el fin de canjearlos por la moneda virtual. De acuerdo con los requisitos de Ecolones deben ser los usuarios quienes clasifiquen sus residuos.

Tecnología para clasificación

En lo referente a la operación de separación, ninguno de los CRRV estudiados utiliza equipos tecnológicos que aprovechen la diferencia en las propiedades físicas de los distintos materiales para su extracción de los residuos de entrada, la separación en todos los casos se realiza de manera completamente manual. Respecto a la superficie sobre la cual se realiza la clasificación de los residuos se encontró que en la mayoría de instalaciones esta operación se hace sobre mesas fijas (figura 3), pero también se encontraron casos en que se realiza la separación sobre el suelo y un CRRV, el número 10, en que se realiza sobre una banda transportadora (cuadro 3).

Cuadro 3. Forma de clasificar los materiales en los CRRV estudiados

Forma de clasificar los materiales	Casos estudiados
Manual sobre el suelo	3
Manual sobre mesa	11
Manual sobre banda transportadora	1

La clasificación manual sobre una superficie estática, suelo o mesa, es adecuada para procesar cantidades de residuos inferiores a las 2 toneladas por día, mientras que una banda transportadora de una sola línea permite aumentar el procesamiento al orden de 10 toneladas diarias [18]. Por lo tanto, la tecnología para clasificación con que cuentan los CRRV es adecuada para la cantidad de materiales procesados en un 87% de los casos.

Tecnología para procesamiento adicional de los materiales

En relación con el procesamiento adicional de los materiales, diez de los CRRV estudiados poseen equipos para compactar los residuos y nueve de ellos poseen máquinas para quebrar el vidrio. Esto quiere decir que una parte importante de los casos estudiados no puede acceder a los beneficios de aumentar la densidad de sus materiales procesados, lo cual incluye un mejor precio en el mercado y un menor requerimiento de espacio tanto para almacenamiento como transporte [11], [19].



Figura 3. Mesa usada para la clasificación manual de residuos.

Gestión del recurso humano

Cantidad y tipo de personal

Los CRRV que dependen en gran medida de las actividades de clasificación manual son instalaciones intensivas en mano de obra [20]. Los CRRV municipales en Costa Rica son operados en algunos casos por personal contratado directamente por la municipalidad y en otras ocasiones por organizaciones comunales o empresas privadas con las que se establece un convenio. En el cuadro 4 se muestra la procedencia del personal operativo y la cantidad de trabajadores a tiempo completo con que cuentan las instalaciones. En algunas ocasiones los CRRV emplean personal temporal o voluntario, sin embargo, es difícil prever la disponibilidad de este personal [21], [22].

Productividad del personal

Un trabajador de una instalación en la que se emplea separación manual sobre una mesa alcanza una productividad promedio de 70 kg de material separado por día [7]. Durante la investigación se detectó la percepción generalizada, entre los administradores de los CRRV municipales, de que los empleados contratados por la municipalidad son menos productivos que los privados, pues su remuneración no depende de la cantidad de materiales procesados mientras que en los privados sí. La ausencia de registros de productividad y métodos cuantitativos para evaluar el desempeño de los operarios impidió corroborar la veracidad de esta afirmación. Sin embargo, fueron observadas durante las visitas de campo, una serie de errores en la gestión del personal, incluyendo falta de capacitación e inadecuadas condiciones de trabajo, que de acuerdo con la literatura repercuten en la productividad del personal y cuyo control es responsabilidad de la administración del CRRV [11], [23], [24],

Personal con limitaciones físicas y condiciones adversas de salud

Según Gómez [9] existe en algunas municipalidades la tendencia a utilizar el CRRV como forma de ocupar personal que, debido a limitaciones físicas o condiciones adversas de salud, se considera no puede desempeñarse en otras áreas como recolección de residuos o mantenimiento de vías. Esta tendencia fue confirmada en la investigación, donde en un 67% de los CRRV estudiados se utilizan algunas veces este tipo de personal, incluyendo un 33% en que se usa casi siempre.

Cuadro 4. Tipo y cantidad de personal permanente en los CRRV estudiados.

CRRV	Procedencia del personal operativo	Operarios a tiempo completo
01	Organización comunal	6
02	Municipalidad	2
03	Empresa privada	5
04	Organización comunal	-
05	Organización comunal	4
06	Municipalidad	14
07	Municipalidad	1
08	Organización comunal	2
09	Municipalidad	18
10	Municipalidad Organización comunal	35
11	Municipalidad	4
12	Empresa privada	2
13	Municipalidad	21
14	Municipalidad	6
15	Empresa privada	6

De acuerdo con el jefe de planta de uno de los CRRV visitados, la asignación de este personal proviene de la creencia administrativa de que las operaciones en el CRRV no requieren de esfuerzo físico para desempeñarse eficientemente. Sin embargo, además de las labores de clasificación, que exigen permanecer en pie durante periodos prolongados de tiempo, se requiere de personal para labores de carga, descarga y estiba de pacas de residuos con un peso considerable [16]. El personal con limitaciones físicas puede ser asignado a labores de registro e inspección de calidad, requiriéndose contratar también personal en condiciones aptas para tareas de mayor exigencia física, esto con el fin de evitar situaciones de riesgo y contribuir a la ágil operación de las instalaciones.

Capacitación

La capacitación del personal constituye un factor clave en la eficiencia de la operación del CRRV [11]. Un ejemplo de esto ocurre cuando los operarios no están familiarizados con cierto tipo de material, pudiendo clasificarlo de manera incorrecta y contaminar toda una paca de producto [23]. En un 40% de los CRRV estudiados no se da capacitación al personal que inicia labores por lo que este depende de observar a los trabajadores experimentados mientras trabajan, por lo cual su productividad es limitada durante los primeros días y son propensos a cometer errores.

En dos de los casos visitados la capacitación de los nuevos operarios es realizada por el Instituto Nacional de Aprendizaje (INA) mediante el curso Recuperador o Recuperadora de desechos sólidos. La duración del curso es de 98 horas, considerado muy extenso por parte de algunos administradores, lo que imposibilita la capacitación de sus operarios bajo esta modalidad.

Ergonomía de las estaciones de clasificación

No se le puede exigir a un trabajador que rinda a su máximo potencial si las condiciones de trabajo no son las adecuadas. De acuerdo con lo recomendado en la literatura las estaciones de clasificación deben contar con suficiente ventilación e iluminación natural. Asimismo, las mesas de clasificación y los recipientes deben tener dimensiones y estar ubicados de tal manera que los trabajadores puedan manipular los residuos sin necesidad de estirarse o agacharse excesivamente, lo que redundaría en un mayor desgaste físico y una menor productividad [23], [24]. En un 60% de los CRRV estudiados el diseño de las estaciones de clasificación resulta inadecuado en estos aspectos.

En varias de las instalaciones visitadas se observó como las bolsas utilizadas para clasificar los residuos tenían la apertura plegada (figura 4), además de estar a un nivel muy bajo, lo que provocaba que el operario debiera doblar la espalda y extender la apertura con sus manos cada vez que fuera a introducir un residuo.



Figura 4. Recipientes con características inadecuadas (a) y adecuadas (b).

Procedimientos de trabajo

Documentación

Documentar un procedimiento consiste en llevar un registro escrito de los pasos necesarios para su correcta ejecución, estableciendo el personal responsable y los recursos que demanda. La documentación sirve como una guía de referencia para el personal y la administración. El proceso de documentación en sí contribuye a aumentar el conocimiento de la forma en que trabaja la organización, identificar las áreas de la operación susceptibles a mejora y enfocar las personas, recursos y tiempo al logro de objetivos y metas [25]. En un 47% de los CRRV analizados no se tienen procedimientos por escrito, mientras que en un 20% poseen pocos establecidos. En estos casos la forma de trabajo depende del personal disponible y su experiencia en la actividad a ejecutar.

Almacenamiento de residuos al aire libre

Resulta siempre preferible almacenar el material procesado bajo techo, con el fin de evitar se dañe por efecto de la humedad, lo que reduciría su calidad, y que sea dispersado por el viento, causando contaminación [26]. Sin embargo, en ocasiones los CRRV pueden verse en la necesidad de almacenar material al aire libre debido a la limitada capacidad de almacenamiento de algunas instalaciones.

En caso de almacenar material al aire libre se deben tomar consideraciones especiales, como dar prioridad a los materiales con bajo tiempo de rotación y cubrir los residuos con lonas. En un CRRV visitado se observaron residuos almacenados al aire libre sin ninguna protección, afectando además la estética de las instalaciones (figura 5).



Figura 5. Inadecuado almacenamiento al aire libre (a) y adecuado (b).

Formalidad de los contratos

De acuerdo con Lobo et al., [15] las empresas recicladoras en el país no establecen contratos formales con sus proveedores, sino que basan la relación comercial en la confianza y la flexibilidad para negociar precios. Esto fue corroborado en el presente estudio ya que en ninguno de los CRRV analizados se establece un contrato formal con las empresas a las cuales se venden los materiales.

Aunque la ausencia de un contrato formal con los compradores de material provee flexibilidad a los administradores de los centros de recuperación para adaptarse a cambios en las condiciones de mercado, también puede suceder que una empresa incumpla las condiciones del pacto verbal y comprometa la operación del CRRV. De acuerdo con la encargada del CRRV 11 [21] el material solía entregarse a un centro de recuperación privado, en una ocasión esa empresa dejó súbitamente de aceptar envíos debido a trabajos de reparación en el acceso a sus instalaciones, esto provocó problemas de acumulación de material en el CRRV municipal.

Control de calidad

Con el fin de generar confianza en el mercado los CRRV deben asegurar la calidad de los materiales que clasifican, para esto es necesario contar con algún mecanismo de control de calidad dentro de la organización, como puede ser la inspección visual al final de cada línea de clasificación o el muestreo al azar de los materiales empacados [27]. En un 60% de los CRRV estudiados nunca o muy pocas veces se verifica la calidad de los materiales separados que se envían a las empresas recicladoras. La falta de verificación de la calidad de los envíos puede llegar a provocar un perjuicio importante para los CRRV. De acuerdo con el administrador de un CRRV entrevistado en una ocasión al llegar a la empresa recicladora se le ofreció pagar una paca de papel blanco con una tira de color como si toda la paca fuera de color, para evitar entregar la paca a un menor precio fue necesario llevársela y sacar la tira [19].

Conclusiones

La ubicación, topografía y accesibilidad de los terrenos en que se ubican los CRRV estudiados son en general adecuadas y no afectan negativamente el desempeño de las instalaciones.

En la mayoría de los casos la infraestructura de las edificaciones resulta inadecuada, pues no fue diseñada para funcionar como un CRRV, por lo que sus características no están orientadas a una máxima eficiencia en la operación.

La tecnología para clasificación con que cuentan los CRRV no representa una limitante considerable para el eficiente procesamiento de la cantidad de residuos que reciben.

Fueron observadas durante las visitas de campo, una serie de errores en la gestión del personal, incluyendo falta de capacitación e inadecuadas condiciones de trabajo, que repercuten negativamente en la productividad de los trabajadores y cuyo control es responsabilidad de la administración del CRRV.

No existe en general la práctica de documentar procesos en los CRRV analizados, la forma de trabajo depende del personal disponible y su experiencia en la actividad a ejecutar.

Los CRRV carecen de contratos formales con las empresas a las cuales venden los materiales lo que provoca inestabilidad en la planificación comercial.

No existe a nivel nacional una guía de buenas prácticas que aborde todas las etapas del diseño y la operación de los centros municipales de recuperación de residuos sólidos valorizables y sirva como referencia a los encargados para diseñar y operar instalaciones eficientemente.

Recomendaciones

Realizar investigación adicional enfocada en los CRRV municipales ubicados en otras regiones socioeconómicas del país más allá de la región central, con el fin de validar y complementar los resultados de la presente investigación.

Contratar personal especializado para la gerencia y supervisión de los CRRV municipales.

En procura de mejorar el desempeño de la operación, se debe iniciar por entender y registrar la forma actual de trabajo, por lo que se recomienda documentar los procesos.

Establecer convenios entre las municipalidades, organizaciones gremiales y universidades públicas para compartir capacitación y asistencia técnica en el diseño y la operación de los CRRV.

Para el cálculo de la tasa de valorización a nivel cantonal y nacional se deben considerar como valorizados los residuos al momento de su envío a las empresas recicladoras y no al momento de su recepción en el CRRV, pues parte de los materiales que ingresan a un CRRV terminan de todas maneras en un sitio de disposición final.

Desarrollar una guía de buenas prácticas que incluya al menos recomendaciones concernientes a la escogencia del terreno donde ubicar los CRRV, características de la infraestructura, escogencia del equipo, gestión de materia prima, gestión de personal y procedimientos de trabajo.

Referencias

- [1] A. Troschinetz. (2005). Twelve factors influencing sustainable recycling of municipal solid waste in developing countries [En línea]. Disponible: <https://digitalcommons.mtu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1276&context=etds>
- [2] C. Cimpan, A. Maul, M. Jansen, T. Pretz and H. Wenzel. (2015, Abr.). "Central sorting and recovery of MSW recyclable materials: A review of technological state-of-the-art, cases, practice and implications for materials recycling. *Journal of Environmental Management*, 156, pp. 181–199. Doi:10.1016/j.jenvman.2015.03.025
- [3] S. Zafar. (2017, Nov. 29). Introduction to MRF [En línea]. Disponible: <https://www.ecomena.org/materials-recovery-facility/>
- [4] "Ley N° 8839. Ley para la Gestión Integral de Residuos Sólidos." *Diario Oficial La Gaceta* N°135, 13 Julio 2010.
- [5] Ministerio de Salud. (2016, Abr.). Estrategia Nacional de Separación, Recuperación y Valorización de Residuos (ENSRVR) [En línea]. Disponible: <https://goo.gl/mB87FJ>
- [6] L.D. Jiménez, Comunicación personal, Fundación Aliarse, junio 2018.
- [7] H. K. T. Campos. (2014). "Recycling in Brazil: Challenges and prospects". *Resources, Conservation and Recycling*, 85, pp. 130–138. Doi: 10.1016/j.resconrec.2013.10.017
- [8] M. Torres, Comunicación personal, setiembre 2017.
- [9] G. Gómez, Comunicación personal, setiembre 2017.
- [10] M. López, Comunicación personal, octubre 2017.
- [11] Illinois Recycling Association. (2010, Nov.). Best Operational Practices Manual for Materials Recovery Facilities and Recycling Drop-off Facilities [En línea]. Disponible: http://www.illinoisrecycles.org/wp-content/uploads/2014/10/IRA_BOPM_2010.pdf
- [12] M. Pérez. (2016, Mar. 25). Las áreas funcionales de la empresa [En línea]. Disponible: <http://publicacionesdidacticas.com/hemeroteca/articulo/069027/articulo-pdf>
- [13] B. Richers, C. Harvey, F. Casanoves, F. DeClerck and T. Benjamin. "¿Cómo hacer talleres participativos con respuestas individuales?" *Agroforestería en las Américas*, 48, pp. 157 – 163, Ene. 2011
- [14] P. Grandela, I. Honold and P. Mansilla. (2007, Nov.). Guía de Buenas Prácticas Ambientales para Instalaciones de Acopio de Chatarra [En línea]. Disponible: <https://goo.gl/7HbLaE>
- [15] S. Lobo, M. Marín. V. Rudín and F. Salas. (2016). Análisis de los retos para el desarrollo de la Cadena de Valor del Reciclaje en Centroamérica [En línea]. Disponible: <https://publications.iadb.org/bitstream/handle/11319/8102/Analisis-de-los-retos-para-el-desarrollo-de-la-cadena-de-valor-del-reciclaje-en-Centroamerica.pdf?sequence=1>
- [16] A. Valerín, Comunicación personal, junio 2018.
- [17] E. Androvetto, Comunicación personal, mayo 2018.

- [18] Asian Development Bank. (2013, Abr.). Materials Recovery Facility Tool Kit [En línea]. Disponible: <https://www.adb.org/publications/materials-recovery-facility-tool-kit>.
- [19] L. Meléndez, Comunicación personal, agosto 2017.
- [20] United Nations Environment Programme (2017). Asia Waste Management Outlook [En línea]. Disponible: <https://goo.gl/VH958N>.
- [21] G. Villalobos; Comunicación personal, mayo 2018.
- [22] W. Brenes, Comunicación personal, junio 2018.
- [23] M. Jones. (1992). Times and motion analyses of manual sorting procedures at materials recovery facilities [En línea]. Disponible: <http://www.seas.columbia.edu/earth/wtert/sofos/nawtec/1992-National-Waste-Processing-Conference/1992-National-Waste-Processing-Conference-24.pdf>
- [24] United States Environmental Protection Agency. (1995, Ago). MITE Program Evaluation: Environmental, Economic and Energy Impacts of Material Recovery Facilities [En línea]. Disponible: <https://goo.gl/4nuAfP>
- [25] F. Alzate. (2011, Feb. 23). Importancia de la documentación de un sistema de calidad [En línea]. Disponible: <http://iso9001-calidad-total.com/importancia-de-la-documentacion-de-un-sistema-de-calidad/>
- [26] Agencia de Residuos de Cataluña. (2012, May.). Guía de Buenas Prácticas para el Reciclaje y la Recuperación de Papel y Cartón en Cataluña [En línea]. Disponible: http://residus.gencat.cat/web/.content/home/lagencia/publicacions/prevenio/guiapapercartro_web_es.pdf
- [27] Waste and Resources Action Programme. (2006, Sep.). MRFs Comparison of Efficiency and Quality [En línea]. Disponible: http://www.wrap.org.uk/sites/files/wrap/MRF_v6_19Dec06_LC.pdf

Determinación del caudal ambiental en el río Birrís, Costa Rica

Determination of Environmental Flow of the Birrís River, Costa Rica

Isabel Guzmán-Arias¹, Fernando Watson², Karolina Villagra-Mendoza³


Fecha de recepción: 12 de diciembre de 2018

Fecha de aceptación: 17 de febrero de 2019


Guzmán-Arias, I; Watson, F; Villagran-Mendoza, K. Determinación del caudal ambiental en el río Birrís, Costa Rica. *Tecnología en Marcha*. Vol. 32-4. Octubre-Diciembre 2019. Pág 18-27.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i4.4786>

1 Escuela de Ingeniería Agrícola. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
Correo electrónico: iguzman@tec.ac.cr.

 <https://orcid.org/0000-0002-5553-3977>

2 Escuela de Ingeniería Agrícola. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
Correo electrónico: fwatson@tec.ac.cr.

 <https://orcid.org/0000-0001-8258-4668>

3 Escuela de Ingeniería Agrícola. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
Correo electrónico: kvillagra@tec.ac.cr

 <https://orcid.org/0000-0002-2335-0615>



Palabras clave

Caudal ambiental; hidrológico; curva de duración; régimen de caudal.

Resumen

En Costa Rica el caudal ambiental se calcula como un 10% del aforo caudal medio del río. Este porcentaje ha carecido de fundamento científico en relación con las condiciones fluviales aptas para preservar los ecosistemas presentes en los cauces. Las concesiones de agua para los diferentes usos han provocado un impacto en disponibilidad de agua para algunos lugares y épocas del año y en la calidad del recurso transformando las condiciones fisicoquímicas y ecológicas de los cauces. Del sistema fluvial del río Birrís, se concede un 20% para uso consuntivo como producción agrícola, humano y riego, y el restante se utiliza para la generación hidroeléctrica. Debido a la baja calidad de sus aguas a la fecha no existen especies indicadoras lo que imposibilita el uso de enfoques que tomen en cuenta los ecosistemas para generar curvas de preferencia. El presente trabajo utilizó un enfoque hidrológico para determinar el caudal ambiental del río Birrís usando la metodología de curva de duración de caudales. Se basó en el análisis de series de datos de clima obtenidas por 10 años y series de caudales diarios de un periodo de tres años. Se realizaron tres aforos de biota y flujo en tres puntos distribuidos a lo largo del cauce principal distribuidos en un periodo de un año. Finalmente, se determinó el caudal ambiental para un régimen de flujo basado en valores medios mensuales.

Keywords

Environmental flow; hydrologic; duration curve; flow regime.

Abstract

In Costa Rica, the environmental flow corresponds to 10% of the average river flow. This percentage has lacked of scientific basis in relation to the fluvial conditions suitable for preserving the ecosystems present in the river. Water concessions for the main uses (human, agricultural and hydroelectric) have caused environmental damages, transforming the physical and chemical conditions of the channels. Of the water flow of the Birrís River, 20% is granted for consumptive use as agricultural, human and irrigation production, and the rest is used for hydroelectric generation. Due to the low quality of its waters to date there are no indicator species that makes it impossible to use approaches that take into account ecosystems to generate preference curves. The present work used a hydrological approach to determine the environmental flow of the Birrís River using the flow duration curve methodology. It is based on the analysis of series of climate data obtained for 10 years and series of daily flows from a period of three years. Three outflows of biota and flow were made in three points distributed along the main channel distributed over a period of one year. Finally, the environmental flow was determined based on the flow regime of the average monthly values.

Introducción

El desarrollo de las actividades socio-económicas ha ido creciendo de la mano con el incremento en el aprovechamiento del recurso hídrico. Adicionalmente, en los últimos años las condiciones climáticas se han vuelto extremas (períodos de largas sequías y lluvias extremas) comprometiendo las reservas de agua en las cuencas y amenazando el desarrollo y mantenimiento de los ecosistemas fluviales. Así mismo, el régimen natural de los ríos, los

ecosistemas fluviales y los servicios que se obtienen de estos sistemas se encuentra bajo una fuerte presión volviéndose cada vez más susceptibles a la intervención del hombre [1]. Por esta razón es necesario procurar hacer un aprovechamiento del agua bajo un enfoque de gestión integrada del recurso hídrico con el fin de garantizar la sostenibilidad del recurso y todos los beneficios asociados a él.

El uso sustentable del agua se define como caudal ambiental. La Declaración de Brisbane 2007 define al caudal ambiental como la cantidad, periodicidad y calidad del cauce de un río requerido para sostener los ecosistemas de las aguas dulces, estuarios y las vidas humanas que dependen de estos ecosistemas. Existen más de 200 metodologías usadas en más de 50 países alrededor del mundo [2]. Entre estas, las más utilizadas corresponden a la metodología hidrológica (29.5%), a pesar de que algunos autores no la recomiendan por no incluir la variable de hábitat o especies; la metodología de simulación de hábitat o hidrobiológica (28%), la hidráulica (11.1%) y la holística (7.7%). Además, en algunos países se han aplicado metodologías combinadas (16.9%) [2].

Para la determinación del caudal ambiental, algunos autores recomiendan considerar la variabilidad de los regímenes de los cauces en términos de magnitud, frecuencia y duración [3], [4]. Otros recomiendan el uso de metodologías que incluyan las variables climáticas, fisiográficas y ecológicas. Por ejemplo, [4] no recomiendan el uso de metodologías hidrológicas ya que no contribuyen a dar una solución integral a la relación régimen del río y condiciones ecológicas. [5] proponen para México el uso de metodologías que van desde las más simples (por ejemplo la hidrológica de Tennant adaptada a México) hasta el método holístico. [6] relacionaron la interacción entre variabilidad en el régimen del cauce del río Tempisque en Costa Rica con el desarrollo de especies indicadoras del cauce y propusieron un caudal ambiental basado en los caudales mínimos históricos. Por otro lado, [7] resume la posición de diversos autores que reconocen que el caudal mínimo es inadecuado para establecer el caudal ambiental. Contrariamente, recomiendan basar el caudal ambiental en la variación temporal de los caudales, por ejemplo, magnitud, frecuencia, periodicidad, duración y grado de cambio de los eventos de flujo en los ríos. [8] utilizaron variables indicadoras de calidad del agua como demanda bioquímica de oxígeno (DBO), nitrógeno total Kjeldahl (NTK) y oxígeno disuelto (OD) para establecer el caudal ambiental y concluyeron que el Q95 estimaba mejor el caudal ambiental y que el 7Q10 subestimaba los caudales ambientales. [9] compararon el caudal ambiental obtenido mediante enfoques hidrológicos e hidráulicos y reportó una pluralidad en los resultados, así mismo concluyó que la escogencia de un método de cálculo debe obedecer a criterios más allá de solo el método de cálculo sino que debe tomar en consideración criterios de caudal que garanticen la supervivencia de las especies y que permita aprovechar el recurso hídrico para los principales usos.

Este estudio propone la determinación del caudal ambiental para la cuenca del río Birrís basado en una adaptación del método de Hoppe utilizando el índice de curvas de duración con el fin de promover el uso sostenible del agua en el marco de concesiones de agua.

Materiales y Métodos

La cuenca del río Birrís pertenece a la cuenca alta del río Reventazón y se encuentra entre las coordenadas 551 000 – 561 000 Este y 205 000 – 218 000 Norte basado en las coordenadas Lambert Norte Costa Rica. Se ubica en la provincia de Cartago y las aguas reciben influencia de los cantones de Oreamuno, Alvarado, Paraíso y Pacayas. La cuenca comprende 83.5 hectáreas e inicia en las faldas del Volcán Irazú (3400 msnm) hasta los 100 msnm donde confluye con el río Reventazón (figura 1).

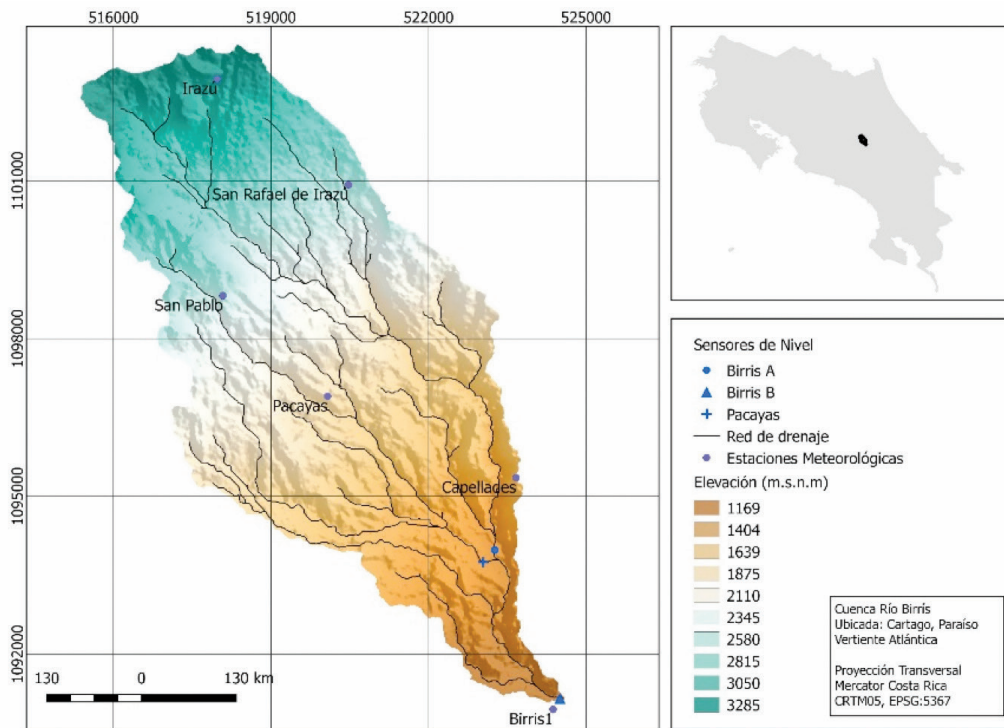


Figura 1. Ubicación de la cuenca del río Birris.

.Los suelos son profundos de origen volcánico clasificados como Andisoles [10]. Por medio de una clasificación semisupervisada en Qgis, utilizando imágenes multiespectrales Sentinel 2, se muestra que la parte alta de la cuenca presenta alta densidad de cobertura vegetal en forma de bosque (29%) y hacia la parte media y baja las tierras se usan más para la agricultura, especialmente pastos y hortalizas (42.6%). En la cuenca del Birris se encuentran todos los usos (consuntivos y no consuntivos). El agua se aprovecha en la industria (cuyo uso es despreciable), la producción agrícola de hortalizas (8.8%), consumo humano en términos de agua potable (11.3%) y generación hidroeléctrica (79.9%). Se realizaron estudios biológicos en diferentes periodos para diagnosticar el comportamiento biológico del río Birris. Las series de clima (precipitación y temperatura) se obtuvieron de los registros históricos de las estaciones meteorológicas con influencia en la cuenca obtenidos por medio del polígono de Thiessen. Además, se instalaron dos pluviómetros en la cuenca para utilizar esta información para correlacionar los datos faltantes y utilizar un análisis de regresión para la completación de las series de datos. Las series de caudal se obtuvieron de registros históricos.

De acuerdo a los resultados obtenidos del estudio biológico y las condiciones fisiográficas, hidráulicas y de concesiones de la cuenca se determinó que la metodología que mejor se adaptaba a la cuenca del río Birris era la del método del índice de curvas de duración (CDC). La modelación hidrológica se realizó con el software HBVlight v.2 [11]. Dicha modelación se dividió en dos partes: la calibración y la simulación. El pre-proceso incluyó la entrada de las series de precipitación y temperaturas diarias (2007 al 2017) y caudales diarios observados (2013 al 2016), Con estas series de datos se obtuvieron las series de caudales simulados del 2007 al 2017. Para el post-proceso se utilizaron los caudales teóricos y el coeficiente de Nash para realizar el ajuste de los modelos y obtener los parámetros de calibración del 2013 al 2016. Estos parámetros de calibración se utilizaron para realizar las simulaciones del periodo de 10 años (del 2007 al 2017) y obtener los caudales simulados para toda la serie de datos (figura 2).

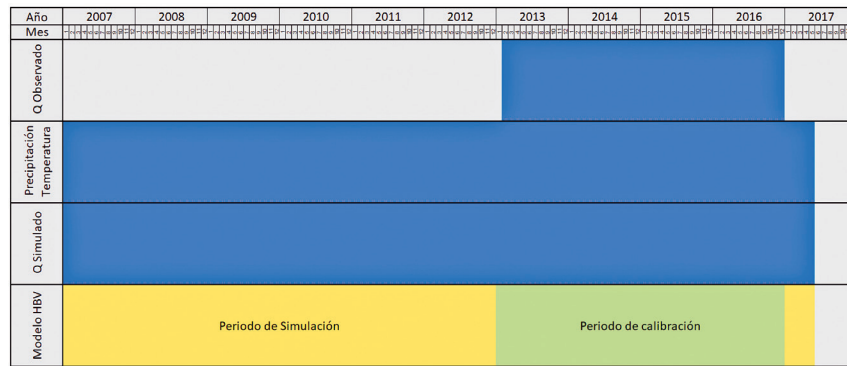


Figura 2. Procedimiento de la modelación hidrológica: periodos de simulación y datos de entrada y salida.

Resultados y discusión

La cuenca del río Birris es alargada lo que implica que en la región existe una menor tendencia a las crecidas. La cuenca tiene una alta densidad de drenaje la cual corresponde a 2.87 km/km² y el orden de la cuenca es de 6. Esto significa la cuenca presenta una respuesta rápida a los eventos de precipitación ya que el agua que corre por escorrentía drena rápidamente por los afluentes de la cuenca.

La curva hipsométrica muestra que la cuenca se encuentra en un estado compuesto, donde aproximadamente un 50% de la cuenca (parte alta) se encuentra en un estado joven con alta producción de sedimentos y en la otra mitad de la cuenca se deposita el sedimento. La frecuencia de altitudes de la cuenca va desde los 3400 msnm en las faldas del Volcán Irazú hasta los 1300 msnm (punto de aforo) y las elevaciones más frecuentes se encuentran en el rango de 1626 a 1990 msnm (figura 3).

El cauce principal del río Birris inicia a más de los 3000 msnm y se extiende con una pendiente promedio del 14%. Esta característica es propia de los cauces de montaña, turbulentos y con pendientes altas. Alrededor de los 1500 msnm el cauce disminuye su pendiente. Este cambio de pendiente genera una diferencia en la velocidad del flujo y la capacidad de transporte de sedimentos (figura 4).

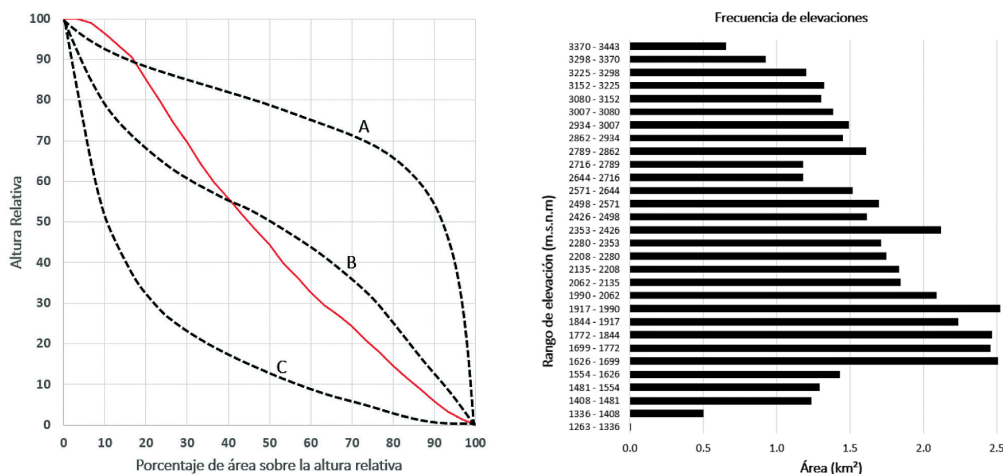


Figura 3. Hipsometría de la cuenca del río Birris y frecuencia de altitudes. Las etiquetas corresponden a A: cuenca en estado joven; B: cuenca madura en equilibrio; C: Cuenca vieja, sedimentaria.

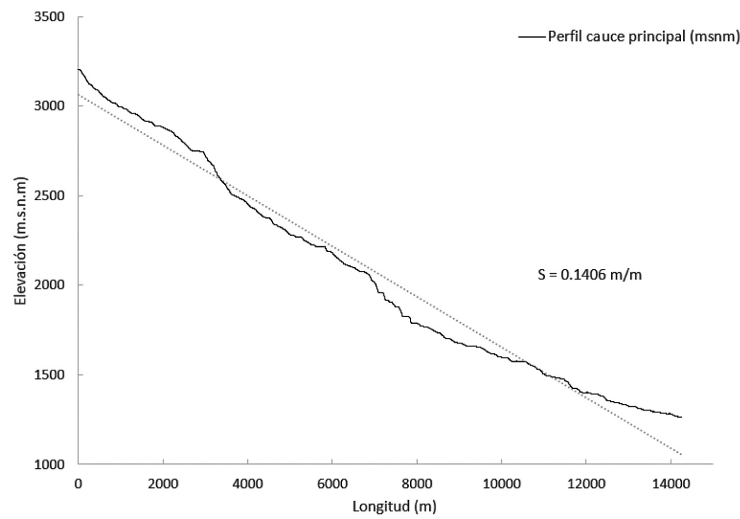


Figura 4. Perfil longitudinal del cauce del río Birris.

El cuadro 1 muestra una síntesis de las principales características del régimen fluvial y ambiental del río Birris. En él se resume un cauce alterado por las actividades que ahí se desarrollan, pero además, se encontró un alto nivel de contaminación lo que impidió encontrar especies indicadoras de caudal, contrariamente se encontraron una gran cantidad de especies indicadoras de contaminación. Desde el punto de vista del flujo, éste se ve alterado por las desviaciones de caudal se ocurren en la parte alta y media de la cuenca. Desde el punto de vista ecológico, además de las desviaciones de caudal, la gran cantidad de sedimentos y la interrupción natural de la catarata a la salida de la cuenca, evita que se den migraciones de especies hacia aguas arriba del cauce.

Cuadro 1. Síntesis del régimen fluvial y ambiental del río Birris.

Característica	Comentario
Continuidad	El cauce principal contiene dos embalses, un vertedero y una desviación de caudal hacia la generación hidroeléctrica principal
Régimen hidrológico	<p>El régimen de flujo se encuentra completamente alterado. En la parte alta del cauce existe una toma de desviación hacia el primer embalse (ubicado en la parte media de la cuenca). Flujo de acuerdo a estacionalidad: durante época seca se aprovecha la totalidad del flujo, durante época lluviosa se aprovecha una parte. Durante época seca la cantidad de caudal disponible no permite mantener el ecosistema. Durante época lluviosa la cantidad de sedimentos tampoco permite mantener los ecosistemas.</p> <p>La catarata de 75 m de altura, a la salida de la cuenca, no permite la migración natural de especies aguas arriba del cauce.</p>
Calidad del agua	Según el índice BMWP-CR la calidad del agua se encuentra entre muy contaminada a extremadamente contaminada. Esto es producto de las actividades agrícolas que se dan en la cuenca. Esto compromete el desarrollo de especies indicadoras de caudal.
Comunidades bióticas	No se encuentran ecosistemas indicadores de caudal, solo especies indicadoras de contaminación.

Después de la calibración del modelo hidrológico, los caudales simulados muestran que el año con mayor escurrimiento anual corresponde al 2008, sin embargo se observan elevados picos durante los periodos de invierno (de mayo a diciembre) de los años 2007, 2008, 2010, 2011, 2015 y 2016. Los caudales menos abundantes, durante el invierno, corresponden a los años 2012, 2013 y 2014. Estas diferencias en los regímenes de caudal en el periodo de invierno resultan en un aumento en la variabilidad de los datos medios de caudal.

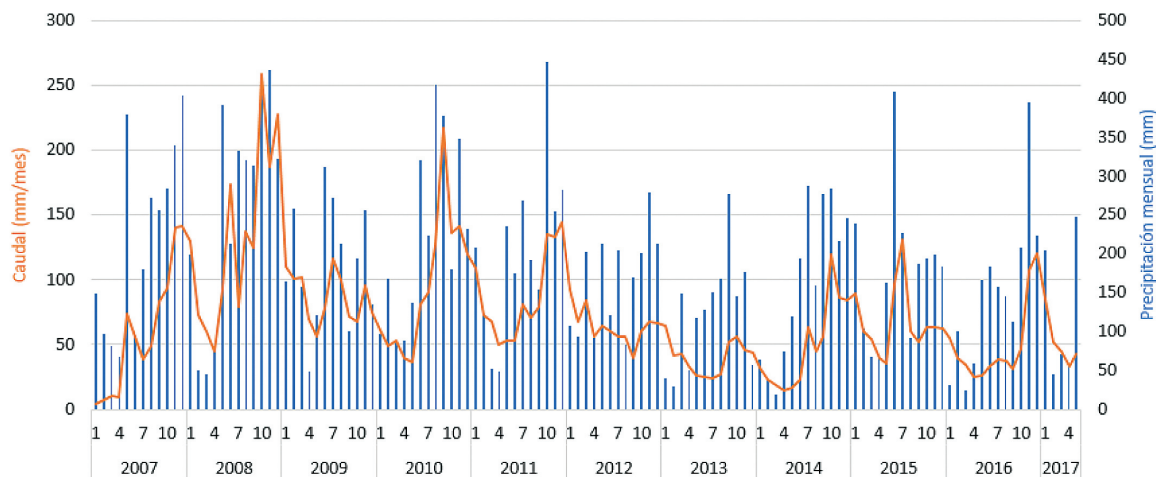


Figura 5. Caudales simulados durante el periodo 2007 al 2017.

La variabilidad natural se puede establecer entre los percentiles 25 y 75 [12]. El comportamiento estadístico de los datos muestra las menores diferencias en los meses de estiaje de enero a abril, mientras que durante los meses más lluvia, de mayo a diciembre, los coeficientes de variación se incrementan. Esto se debe probablemente a la alternancia de años secos y húmedos (figura 5). La figura 6 muestra los promedios diarios mensuales del río Birris. En esta se muestra con mayor claridad los meses de estiaje y avenidas con una gran variabilidad en los meses entre mayo y diciembre.

Debido a que el régimen anual de caudales es un indicador del comportamiento fluvial, la figura 7 muestra la curva de duración de caudales (CDC) para cada mes durante el periodo de 10 años (2007 al 2017). Se observa que para cada mes los regímenes promedio de caudal varían. En la mayoría de los meses del año (Enero, Febrero y de Julio a Diciembre) el Q50 es mayor o igual a 2 mm/día. Esto significa que el 50% del tiempo, en estos meses, el caudal específico de 2 mm/día es igualado o excedido. En marzo, abril y mayo el Q50 es menor a 2 mm/día. El Q90 y el Q95 tienen a variar de acuerdo al mes específico en el año, sin embargo, tienden a ser mayores en los meses de octubre a diciembre. Esto lo que indica es que durante estos tres meses, la excedencia del 90 % o 95% del tiempo del flujo del agua en el cauce tiende a ser mayor (mas flujo en el cauce). Con esto se muestra la variabilidad de los caudales a lo largo del año y se justifica la escogencia de valores de caudal ambiental para cada mes y no uno puntual para todo el año.

De acuerdo a la variabilidad en el régimen anual del río (estiaje y avenidas), la inexistencia de especies de calidad ambiental y basado en [12] se determinó que el rango óptimo de caudal ambiental se establece entre el Q85 y el Q95 de acuerdo a la demanda mensual de caudal, mientras exista el total del caudal concesionado en la cuenca (cuadro 2).

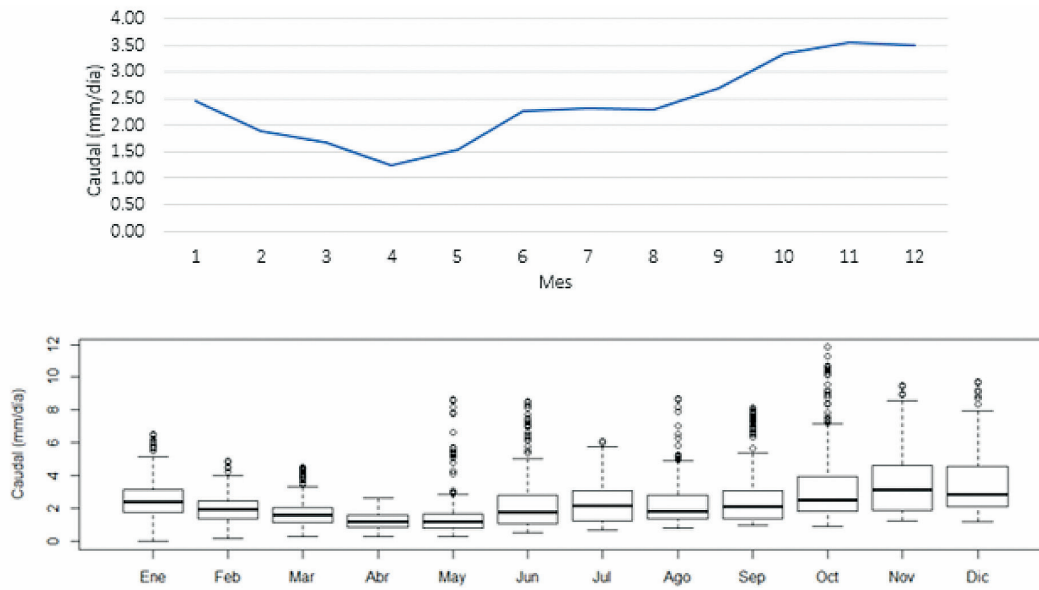


Figura 6. Estadísticos de caudales para el periodo 2007 al 2017.

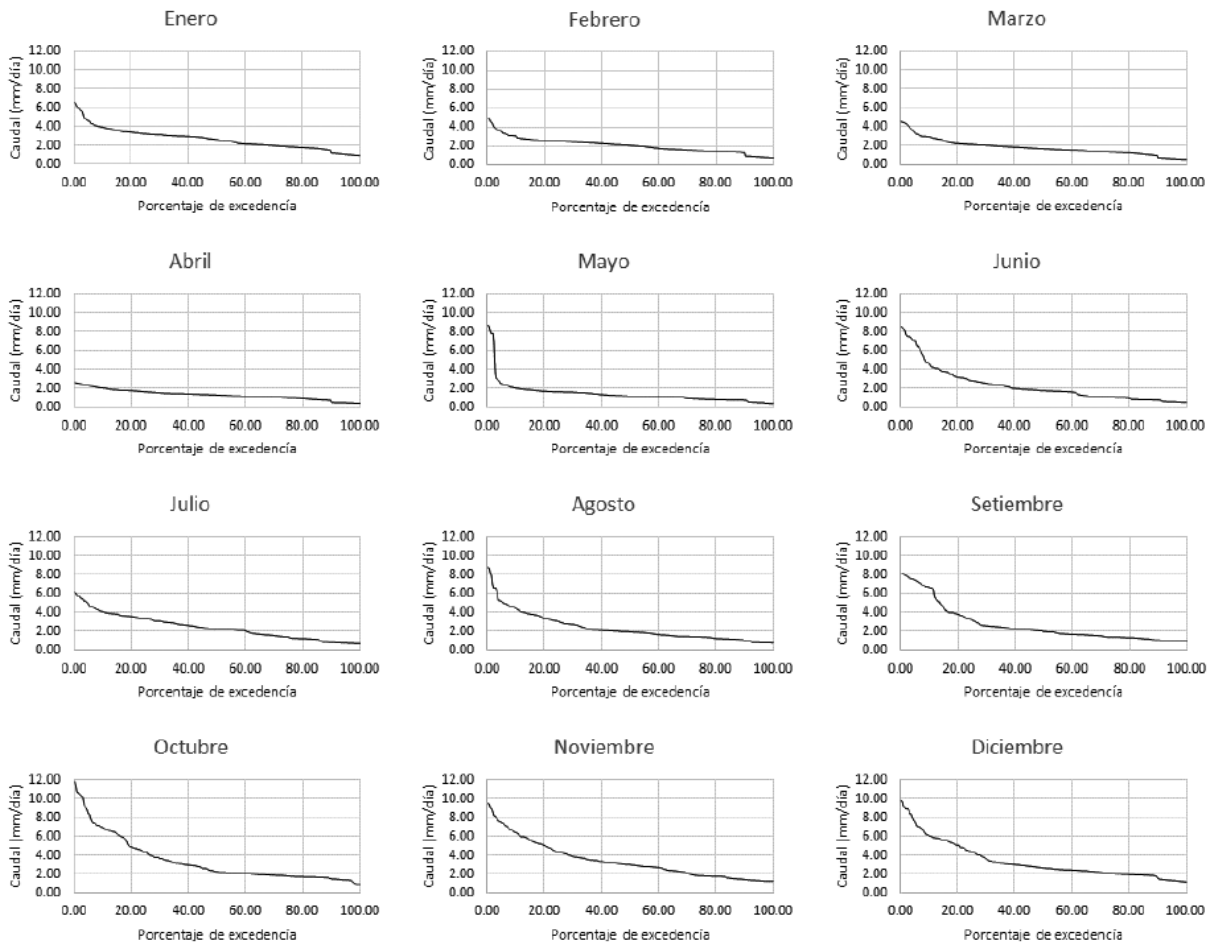


Figura 7. Curva de duración de caudales (CDC) por mes para el periodo 2007 al 2017.

Cuadro 2. Valores medios mensuales estadísticos de las excedencias de caudales que se recomiendan para caudal ambiental en la cuenca del río Birrís.

Mes	Q85	Q90	Q95
Enero	0.95	0.84	0.58
Febrero	0.75	0.70	0.45
Marzo	0.60	0.52	0.34
Abril	0.46	0.41	0.27
Mayo	0.44	0.42	0.29
Junio	0.45	0.43	0.33
Julio	0.64	0.46	0.42
Agosto	0.66	0.60	0.46
Setiembre	0.68	0.60	0.57
Octubre	0.93	0.84	0.76
Noviembre	0.87	0.80	0.73
Diciembre	1.05	0.94	0.74

Caudales en m³/s que son excedidos en 85% (Q85), 90% (Q90) y 95% (Q95) del tiempo durante el mes correspondiente.

Conclusiones

1. El estudio permitió reconocer el régimen teórico de los caudales ya que debido a que el flujo total se encuentra concesionado no fue posible establecer la condición de flujo natural.
2. La condición biológica del cauce indicó que no era posible establecer ninguna especie indicadora en el río para determinar el caudal ambiental por algún medio que incluya la biota. El grado de contaminación del río es alta para la reproducción de especies, por lo que se recomienda la intervención en la subcuenca para mejorar las condiciones de calidad de agua.
3. El grado de alteración del río no permite la aplicación de otra metodología que no sea la hidrológica.
4. El método utilizado para proponer el caudal ambiental se basó en el índice de curvas de duración (CDC) el cual establece el caudal ambiental dentro de un régimen de caudales donde se propone un rango de acuerdo a las excedencias de caudal entre Q95-Q85.

Agradecimientos

Los investigadores desean agradecer a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC) por el apoyo económico para realizar este proyecto. A la Dirección de Agua del MINAE por la cooperación tanto de información, económica y de personal para llevar este proyecto a un nivel de interés nacional. A la JASEC por el aporte de los datos de caudales históricos. A la Dra. Laura Chavarría de la Escuela de Biología del TEC por el apoyo en el análisis del estudio biológico, al Ing. Pablo Chacón y Andrey Aguilar por la valiosa colaboración en la toma de datos de campo y procesamiento de la información.

Referencias

- [1] M. López Pérez, L. Mendoza Camacho, and A. A. Schroeder Aguirre, "Determinación de la Alteración del Régimen Hidrológico Natural y Objetivo Ambiental para el Cálculo del Caudal Ecológico," in *1er Congreso Iberoamericano de Sedimentos y Ecología*, 2015.
- [2] R. E. Tharme, "A Global Perspective on Environmental Flow Assessment: Emerging Trends in the Development and Application of Environmental Flow Methodologies for Rivers," *River Res. Appl.*, vol. 19, pp. 397–441, 2003.
- [3] L. Poff *et al.*, "The Natural Flow Regime : A Paradigm for River Conservation and Restoration," *Bioscience*, vol. 47, no. 11, pp. 769–784, 1997.
- [4] A. H. Arthington, S. E. Bunn, N. L. Poff, and R. J. Naiman, "The challenge of providing environmental flow rules to sustain river ecosystems," *Ecol. Appl.*, vol. 16, no. 4, pp. 1311–1318, 2006.
- [5] J. E. Barrios-Ordóñez *et al.*, "Proposal for an Environmental Flows National Standard," in *31st Annual Meeting of the International Association for Impact Assessment*, 2011.
- [6] J. Calvo Alvarado, J. A. Jiménez, E. González, F. Pizarro, and A. Jiménez, "Determinación preliminar del caudal ambiental en el río Tempisque , Costa Rica : el enfoque hidrológico con limitación de datos," *Kurú*, vol. 5, no. 13, pp. 1–18, 2008.
- [7] P. Alonso-EguíaLis, "Requerimientos para Implementar el Caudal Ambiental en México," Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, Alianza World Wildlife Fund/Fundación Gonzalo Río Monte, Programa Hidrológico Internacional, Mexico, 2007.
- [8] J. F. Casanova and A. Figueroa, "Determinación del caudal Ambiental y su Relación con Variables Indicadoras de Calidad del Recurso Hídrico," *Luna Azul*, no. 40, pp. 5–24, 2015.
- [9] C. Consuegra Martínez, "Síntesis Metodológica para la Obtención de Caudales Ecológicos (Qe), Resultados y Posibles Consecuencias," Tesis de Posgrado en Ingeniería Civil, Especialización en Recursos Hidráulicos y Medio Ambiente, Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito, Bogotá, 2013.
- [10] E. Lianes, M. Marchamalo, and M. Roldán, "Evaluación del factor C de la Rusle para el manejo de coberturas vegetales en el control de la erosión en la cuenca del río Birris, Costa Rica," *Agron. Costarric.*, vol. 33, no. 2, pp. 217–235, 2009.
- [11] J. Seibert, "HBV Light Model," 2005. .
- [12] M. A. Gómez Balandra, M. del P. Saldaña Fabela, and S. Rodríguez Torres, "Importancia de los Componentes del Caudal Ecológico para el Aprovechamiento del Río Omitlán, Guerrero," in *1er Congreso Iberoamericano sobre Sedimentos y Ecología*, 2015, pp. 21–24.

Efecto de la sustitución de insumos en el crecimiento *in vitro* de Raicilla

Effect of culture media substitutions on *in vitro* growth of Ipecac

Alexander Jiménez-Rivera¹, Wayner Montero-Carmona²


Fecha de recepción: 21 de noviembre de 2018

Fecha de aceptación: 3 de marzo de 2019

Jiménez-Rivera, A; Montero-Carmona, W. Efecto de la sustitución de insumos en el crecimiento *in vitro* de Raicilla. *Tecnología en Marcha*. Vol. 32-4. Octubre-Diciembre 2019. Pág 28-38.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i4.4788>

1 Agrónomo. Licenciado en Agronomía. Escuela de Agronomía. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede San Carlos. Costa Rica. Correo electrónico: alexander09agrotec@gmail.com.

 <https://orcid.org/0000-0002-3886-3915>

2 Master en Biotecnología. Laboratorio de Biotecnología de Plantas; Escuela de Agronomía; Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede San Carlos. Costa Rica. Correo electrónico: wmontero@tec.ac.cr.

 <https://orcid.org/0000-0003-3418-7267>



Palabras clave

Medios de bajo costo; micropropagación; nudos; *Psychotria ipecacuanha*.

Resumen

La micropropagación de raicilla se ha visto como una alternativa para suplir la necesidad de materiales para productores interesados en el cultivo. No obstante, los costos poco competitivos del cultivo de tejidos tradicional han dificultado su implementación en la producción de vitroplantas para zonas de cultivo. Con el fin de evaluar diferentes sustituciones en la composición del medio de cultivo, se realizó una comparación del crecimiento de plantas en medios con sustituciones en las sales minerales (por sales hidropónicas), Vitaminas (por tiamina o complejo B1, B6 y B12) y gelificante (por almidón de maíz).

Se observaron diferencias significativas ($\alpha=0,05$) entre las características de crecimiento evaluadas (número de brotes, longitud de brotes, número de hojas y peso seco). Un análisis multivariado mostró una relación entre los medios con sustitución de sales hidropónicas, los medios con vitaminas (B1, B6 y B12) y el medio Testigo (MS); los cuales influenciaron la longitud de brotes y el número de hojas. Por su parte el medio con sustitución de almidón de maíz afectó el número de brotes y el peso seco. Esta última variable también se vio influenciada por el medio de Bajo Costo (sustitución de los tres componentes). De los tratamientos evaluados, el medio con sustitución de Tiamina fue el que presentó los rendimientos más bajos; mientras el medio de Bajo Costo los más elevados según Prueba de Hotelling - Bonferroni. El análisis de costos realizado mostró un ahorro significativo (hasta 59%) entre el medio de Bajo Costo y el tratamiento testigo (Medio MS).

Keywords

Low cost culture media; micropropagation; nodal segment; *Psychotria ipecacuanha*.

Abstract

The micropropagation of ipecac has been seen as an alternative to supply the need for materials from producers interested in this crop. However, the uncompetitive costs of traditional tissue culture have hampered their implementation in the production of vitroplants for growing areas. In order to evaluate different substitutions in the composition of the culture media, a comparison on plants growth in different media with substitutions in mineral salts (by hydroponic salts), vitamins (by thiamine or complex B1, B6 and B12) and gelling agent (by corn starch) was made.

Significant differences ($\alpha = 0.05$) between the evaluated growth characteristics (shoots number, shoots length, leaves number and dry weight) were observed. A multivariate analysis showed a relationship between culture media with hydroponic salts substitution, with vitamins (B1, B6 and B12) substitution and the control media (MS); which influenced the shoots length and the leaves number. On the other hand, the media with corn starch substitution affected the shoots number and the dry weight. This last variable was also influenced by the Low Cost media (substitution of the three components).

Of all treatments evaluated, the Thiamine substitution media was the one that presented the lowest yields; while the Low Cost media shows the highest according to Hotelling - Bonferroni Test. The cost analysis performed showed significant savings (up to 59%) between the Low Cost and the control treatment (MS media).

Introducción

La raicilla (*Psychotria ipecacuanha*) es una especie vegetal con amplias y reconocidas propiedades medicinales [1]. Esta especie, perteneciente a las Rubiáceas, es un cultivo perenne de entre 0,2 y 0,7 m de altura el cual se ha venido desarrollando con cierto éxito en zonas de alta humedad, bajo condiciones de sombra artificial o de áreas de cultivo en sotobosque [2]. No obstante, problemas de sobreexplotación de las poblaciones naturales existentes; así como dificultades en los procesos de propagación de semilla dificultan la obtención de materiales para solventar las necesidades de productores interesados en este cultivo [3]. Esto ha generado que el cultivo de tejidos se convierta en una alternativa para la multiplicación rápida de materiales con el fin de solventar las necesidades de materiales para su reproducción vegetativa [1, 4].

Los primeros trabajos sobre la micropropagación de *P. ipecacuanha* fueron reportados por Yoshimatsu y Shimomura [5]. A nivel *in vitro*, la raicilla puede propagarse mediante organogénesis directa [6] y embriogénesis somática [1, 6]. El método de propagación *in vitro* más utilizado es la microestaca; sin embargo, regeneración de explantes de hojas, segmentos internodales y raíces han sido reportadas [7, 8]. Por lo general, el medio de cultivo más utilizado es el Murashige y Skoog (MS) [9], suplementado con sacarosa al 2 - 3% y pH entre 5,7 y 5,8. Si bien diversas combinaciones de reguladores de crecimiento se han evaluado en dicho cultivo [1, 5, 7], la regeneración de brotes se ha reportado sin la necesidad de la adición de los mismos mediante síntesis endógena de auxinas y citoquininas [8].

A pesar de las grandes expectativas que se han generado con la micropropagación del cultivo, lo cierto es que esta tecnología no ha tenido el impacto esperado debido a la poca utilización que se le ha dado relacionado a los elevados costos de producción de dichos materiales [10]. Según Daud y colaboradores [11], los costos de producción del medio de cultivo tienen un fuerte impacto en el costo final de las plantas producidas; por lo que la sustitución de insumos para abaratar los costos de preparación del medio de cultivo podría generar una mayor accesibilidad de estas tecnologías al sector productivo de mayor necesidad [12].

Importantes avances se han realizado en la búsqueda de insumos que puedan sustituir los componentes esenciales del medio de cultivo [13, 14]. Sustituciones en las sales minerales, vitaminas, fuentes de carbono y agentes gelificantes han sido evaluadas en diversos cultivos [11, 15 – 21]. Estas sustituciones buscan disminuir los costos de producción por medio de materiales e insumos más baratos, que fusionen sin alterar la calidad del material vegetal, y que permitan una mayor rentabilidad [22].

Durante más de 10 años, el Laboratorio de Biotecnología de Plantas de la Escuela de Agronomía del Instituto Tecnológico de Costa Rica ha venido evaluando sustituciones de insumos en la formulación de medios de cultivos para especies de interés comercial. Entre los cultivos evaluados con potencial para el desarrollo en las regiones de impacto de dicho Laboratorio, la raicilla ha despertado un gran interés por parte de pequeños y medianos productores interesados en la exploración del cultivo.

Con el fin de evaluar diferentes sustituciones en la composición del medio de cultivo utilizado para la propagación de raicilla *in vitro*, se realizó una comparación del crecimiento de plantas de *P. ipecacuanha* en seis medios de cultivo.

Materiales y métodos

Ubicación del estudio

La investigación sobre el efecto de la sustitución de insumos en el crecimiento *in vitro* de raicilla se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas (LBP) de la Escuela de Agronomía, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede Regional San Carlos, Costa Rica.

Obtención de explantes

Se utilizaron plantas de raicilla (*P. ipecacuanha*) provenientes de condiciones estériles desarrolladas en el LBP. Para su propagación inicial, el material vegetal se mantuvo en condiciones *in vitro* en un medio con sales Murashige y Skoog (MS) [9], suplementados con 30 g/L de sacarosa y 6,2 g/L de agar como gelificante (pH=5,7). El material se mantuvo a $25 \pm 2^\circ\text{C}$; con un fotoperiodo de 16 horas ($28 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) y subcultivos constantes en lapsos de 30 días.

Sustitución de insumos

Para la producción de medios de bajo costo, se realizaron sustituciones de precio menor a los reactivos tradicionales utilizados en la formulación del medio MS (el cual se utilizó como testigo). Se reemplazaron las sales minerales, vitaminas del complejo B y el agente gelificante según el cuadro 1. Los materiales (nudos de ~5 mm) se mantuvieron en los diferentes medios a $25 \pm 2^\circ\text{C}$; con un fotoperiodo de 16 horas ($28 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) y subcultivos constantes en lapsos de 30 días. Se evaluaron diversas características de crecimiento (número de brotes, longitud de brotes, número de hojas y número de raíces) cada 15 días. El peso seco se evaluó una única vez al final del estudio a 90 días después de la siembra (dds).

Cuadro 1. Medios de cultivo evaluados en la sustitución de insumos durante el cultivo *in vitro* de Raicilla en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas, Tecnológico de Costa Rica, 2017.

Medio de cultivo	Sustitución	Componentes			
		Sales minerales	Vitaminas	Fuente de Carbono	Gelificante
MS (Testigo)	-----	Sales MS [9]	Vitaminas MS [9]	Sacarosa (30 g/L)	Agar (6,2 g/L)
Hidrop	Sales minerales	Sales Hidropónicas ¹	Vitaminas MS [9]		Agar (6,2 g/L)
Neurobión	Vitaminas	Sales MS [9]	Neurobión ²		Maicena ⁴
Tiamina	Vitaminas		Tiamina ³		
Maicena	Gelificante		Vitaminas MS [9]		
Bajo Costo	Sales minerales + Vitaminas + Gelificante	Sales Hidropónicas ¹	Neurobión ²		Maicena ⁴

¹ Solución elementos Mayores (10 mL/L) + Solución elementos Menores (5 mL/L) Ever Green® (San José, Costa Rica).

² Vitaminas B1, B6 y B12; Neurobión® (130 mg/L) MERCK® (Quito, Ecuador) + 100 mg/L de mio-inositol.

³ Vitamina B1, Tiamina (180 mg/L) MERCK® (Quito, Ecuador) + 100 mg/L de mio-inositol.

⁴ Almidón de Maíz (75 g/L) Maizena® (Unilever, México).

Análisis de costos

Debido a las variaciones realizadas en los insumos para la formulación de los distintos medios evaluados, se realizó un análisis del costo (a un litro de medio preparado) de las sustituciones evaluadas con el fin de comparar los costos aproximados de cada medio de cultivo evaluado.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental de irrestricto completamente al azar, en el cuál se evaluaron 50 repeticiones para los seis tratamientos. La unidad experimental correspondió a un nudo de

5 mm de longitud (aproximadamente) evaluado cada 15 días hasta alcanzar los 90 dds, para un total de 1800 unidades muestrales evaluadas. Cada explante se colocó en grupos de cinco por frasco de cultivo; los diez frascos utilizados por tratamiento se analizaron como covariable. La distribución de los tratamientos, los tiempos de evaluación y el frasco de cultivo se asignaron al azar a las unidades muestrales.

Se realizó un análisis multivariado mediante exploración con el análisis de componentes principales y posteriormente un análisis de conglomerados para agrupar los tratamientos evaluados. Los grupos formados se valoraron mediante análisis de varianza multivariado y una prueba de comparación múltiple (Hotelling-Bonferroni).

Los análisis de covarianza (ANCOVA) y comparaciones LSD Fisher; así como el análisis multivariado, se realizaron en el programa estadístico InfoStat/P [23] mediante análisis de modelos lineales generales.

Resultados y discusión

Crecimiento de los explantes en medios con sustitución de insumos

El número de brotes presentó un crecimiento sostenido para los seis tratamientos evaluados, mostrando dos brotes para los 60 dds y un máximo de tres brotes para los 90 dds (figura 1A). El medio de cultivo con sustitución de vitaminas por Tiamina fue el que presentó menor número de brotes ($2,29 \pm 0,82$ brotes) en todo el periodo de evaluación. Este medio presentó diferencias significativas ($p = 0,0081$) con los demás medios con sustitución de insumos y el tratamiento testigo (MS) evaluados. El análisis del frasco como covariable (ANCOVA) no mostró diferencias significativas ($p = 0,1372$) para los tratamientos evaluados.

En general, la producción de brotes fue baja en comparación con experimentos realizados por otros investigadores en la micropropagación convencional de raicilla [6, 8]. Esto puede deberse a la ausencia de reguladores de crecimiento en los medios evaluados, los cuales tienden a estimular la producción de brotes adventicios [7]. Por su parte, la sustitución de vitaminas MS por tiamina no dio el resultado esperado. Algunos investigadores [24, 25], señalan que esta vitamina está asociada a la producción de citoquininas y a la inducción de crecimiento en callos y el enraizamiento, por lo que resulta esencial para el desarrollo organogénico de plantas. En este estudio, la adición de solo la vitamina B1 no fue suficiente para mantener el crecimiento de los explantes; por su parte, el medio con Neurobión® como sustitución de vitaminas B1, B6 y B12 presentó un número de brotes similar a los obtenidos por el testigo (MS). Esto resalta la importancia de la incorporación de suplementos vitamínicos del complejo B en el medio de cultivo [26].

Con relación a la longitud de los brotes obtenidos, el crecimiento observado fue ascendente para todos los medios evaluados. Se presentó diferencia altamente significativa ($p < 0,0001$) entre los tratamientos evaluados y el testigo (MS); siendo los medios con sustitución de sales hidropónicas ($27,74 \pm 8,76$ mm) y el medio con sustitución de vitaminas mediante la adición de Neurobión® ($25,52 \pm 7,75$ mm) los que presentaron crecimientos similares a los mostrados por el medio MS ($24,16 \pm 6,99$ mm). Los demás tratamientos presentaron longitudes inferiores a los $21,24 \pm 5,23$ mm para los 90 dds (figura 1B). El análisis de covarianza (ANCOVA) con el frasco como covariable, no mostró diferencias significativas ($p = 0,1322$) para los tratamientos evaluados.

El crecimiento en longitud está fuertemente relacionado a la capacidad del medio de cultivo utilizado para solventar los requerimientos nutricionales de los explantes [27]. Siendo el nitrógeno y el potasio dos elementos de importancia al mantener las condiciones de crecimiento

de los explantes [28]. Esto pudo favorecer al medio con sustitución de nutrientes mediante sales hidropónicas, las cuales presentaron los mayores crecimientos en longitud. Romero y colaboradores [16] por su parte obtuvieron crecimientos favorables en longitud de los explantes de *Laelia anceps* al utilizar sustitución de los nutrientes por fertilizantes comerciales al 50% en N y K respecto a las concentraciones del medio MS. En nuestro estudio, las sales hidropónicas presentaron efectos similares a los reportados por dichos investigadores.

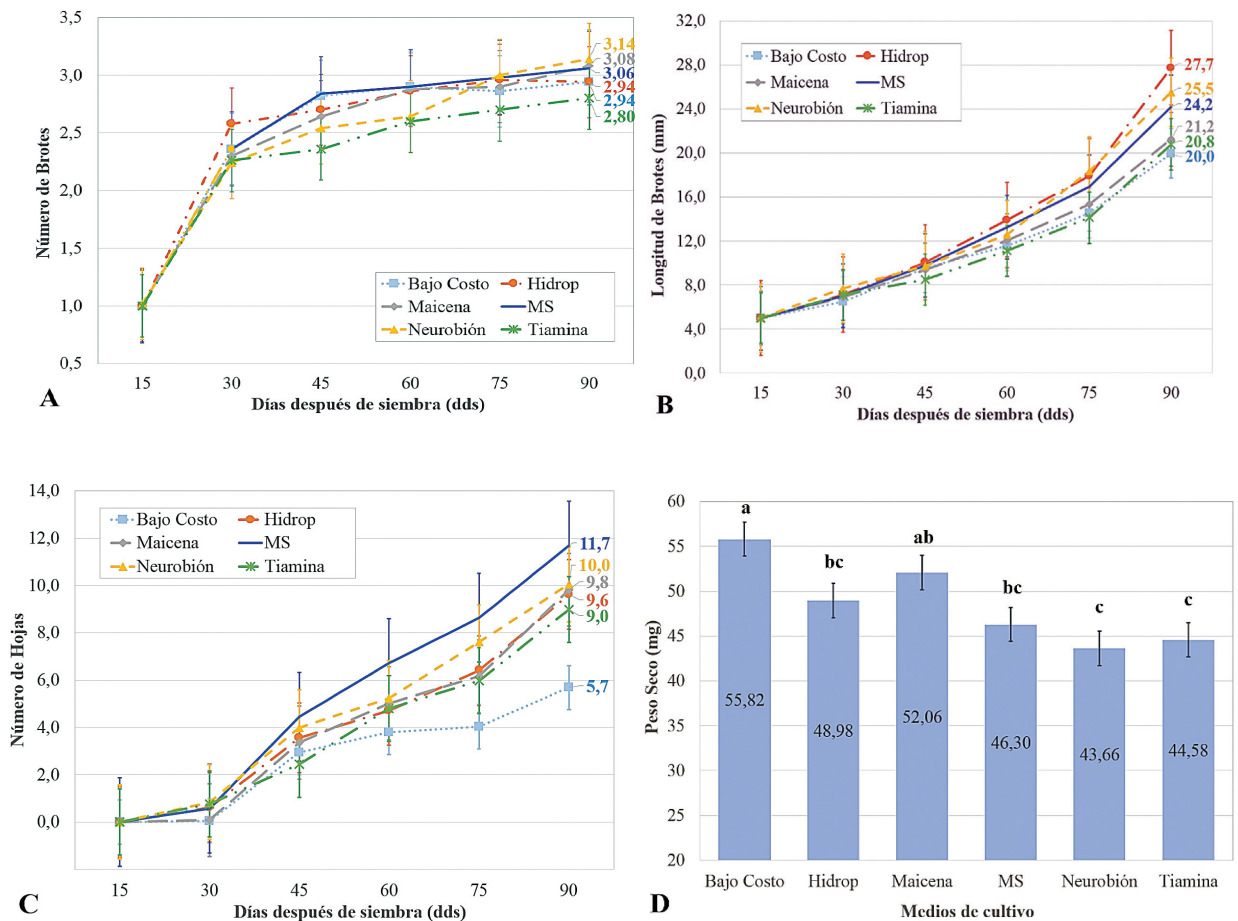


Figura 1. Crecimiento obtenido en el cultivo *in vitro* de raicilla en diferentes medios con sustitución de insumos. Laboratorio de Biotecnología de Plantas, Tecnológico de Costa Rica, 2017. (A. Número de brotes; B. Longitud de brotes; C. Número de Hojas; D. Peso Seco, letras distintas representan diferencias significativas con $\alpha = 0,05$). Las barras representan la desviación estándar.

En el caso de los medios con sustitución de vitaminas por Tiamina, el uso una única vitamina restringió el crecimiento de los brotes, debido a la función de síntesis que realizan otras vitaminas del complejo B adicionadas al medio como que favorecen en el desarrollo de los explantes [25]. Por su parte los medios con sustitución de gelificante (Maicena y Bajo Costo), presentaron crecimiento disminuido debido a que los almidones presentes en el sustituyente pueden provocar una disminución en el crecimiento longitudinal de las plantas [15, 18].

Al comparar el número de hojas obtenido por los tratamientos evaluados se observó una diferencia altamente significativa ($p < 0,0001$) de la sustitución de Bajo Costo (Sales hidropónicas + Neurobión + Maicena), el cual presentó el menor número de hojas ($5,68 \pm 2,63$ hojas) con

respecto al testigo MS ($11,68 \pm 4,90$ hojas). Los demás tratamientos presentaron valores crecientes inferiores a los obtenidos por el medio MS, siendo la sustitución de vitaminas con Neurobión ($10,04 \pm 4,20$ hojas) la que presentó resultados más cercanos a los del tratamiento testigo a los 90 dds (figura 1C). Nuevamente, el análisis de covarianza (ANCOVA) no mostró diferencias significativas para el frasco como covariable ($p = 0,5845$).

Rodríguez [29] obtuvo gran cantidad de hojas de *P. ipecacuanha* al sustituir los nutrientes con fertilizantes que equipararon las concentraciones del medio MS. En nuestro estudio la cantidad de hojas fue baja en comparación con el testigo para todos los tratamientos evaluados. No obstante, solo el tratamiento de Bajo Costo (al combinar las sustituciones de sales hidropónicas, Neurobión® y maicena) presentó el menor número de hojas desde los 60 dds y acentuándose a los 90 dds. Esta diferencia se le puede atribuir a las concentraciones bajas en nitrógeno y potasio (uno 50% inferiores en comparación con el MS) presentes en las soluciones hidropónicas utilizadas para la sustitución de las sales minerales. La importancia de estos minerales para la formación de nuevas hojas ya ha sido reportado con anterioridad [30]. Para este mismo tratamiento, la presencia de maicena como sustituyente al gelificante potenció un efecto sinérgico negativo disminuyendo el número de hojas debido a la reducción en la disponibilidad de nutrientes y afectando la absorción de agua [19].

Durante los 90 dds en los que se evaluó este estudio, no se presentó la formación de raíces en los explantes de raicilla. Aun cuando existen reportes de la producción de raíces en medios con sustitución de insumos [29]; este y otros trabajos relacionadas a la producción de raíces en *P. ipecacuanha* han requerido la adición de reguladores del crecimiento para dicho fin [6, 31]. Una de las características de los medios de cultivo con sustitución de insumos implementados en este estudio es la ausencia de regulares de crecimiento, por lo que se podría justificar la falta de raíces debido a la carencia del estímulo apropiado. Además, el periodo de evaluación máximo fue de 90 dds, siendo un periodo corto para observar la producción de raíces en *P. ipecacuanha* sin ayuda de estimuladores hormonales, esto debido al lento crecimiento que presenta de forma general el cultivo [1].

Al llegar los 90 dds, se realizó una evaluación del peso seco obtenido en cada tratamiento evaluado con respecto al testigo (MS). El medio de Bajo Costo (sustitución de sales hidropónicas con Neurobión® y Maicena) mostró el mayor valor de peso seco ($55,82 \pm 1,98$ mg) en comparación al medio MS ($46,30 \pm 1,92$ mg). Se presentó diferencia significativa ($p = 0,0009$) para los tratamientos evaluados, siendo los medios de bajo costo y maicena los de mayor peso seco obtenido (figura 1D). Nuevamente el análisis del frasco como covariable (ANCOVA) no mostró diferencia significativa ($p = 0,2222$).

Las diferencias observadas entre los pesos secos obtenidos pueden haberse visto influenciadas por la presencia de almidones como sustituyentes del gelificante; debido a que la presencia de almidones en el medio tiende a aumentar el peso seco de los explantes [32]. Por lo que las diferencias entre estos medios (Bajo Costo y Maicena) presentaron un peso superior a los observados en el medio con sustitución de sales hidropónicas y el MS (testigo).

Análisis multivariado

Para determinar cuál de las sustituciones de insumos favoreció el mayor crecimiento en los explantes de *P. ipecacuanha*, se realizó un análisis multivariado con el fin de evaluar las interacciones entre variables a los 90 dds. De esta forma el análisis de componentes principales estableció una relación entre los medios con sustitución de sales hidropónicas, los medios con Neurobión® como sustitución de vitaminas y el medio Testigo (MS); los cuales influenciaron la longitud de los brotes y el número de hojas. Por su parte el medio con sustitución de Maicena como agente gelificante ejerció su efecto sobre el número de brotes y el peso seco

(figura 2A). Esta última variable también se vio afectada por el medio de Bajo Costo (sustitución de sales hidropónicas + Neurobión® + Maicena). De los tratamientos evaluados, el medio con sustitución de Tiamina como fuente de vitamina fue el que presentó los rendimientos más bajos. Esto se evidenció al ser el único medio evaluado que no tuvo un efecto positivo en las variables evaluadas.

Al tratar de evidenciar las similitudes entre los tratamientos mediante un estudio de conglomerados, la distancia Euclídea (0,870) mostró gran similitud entre los medios con sustitución de sales minerales, Neurobión® como sustitución de vitaminas y la sustitución de gelificante por maicena con el medio MS (figura 2B). De esta forma el análisis de conglomerados destacó a los medios con sustitución de vitaminas por tiamina como el medio con rendimientos más bajos y el medio de Bajo Costo como el tratamiento de mayores rendimientos (cuadro 2).

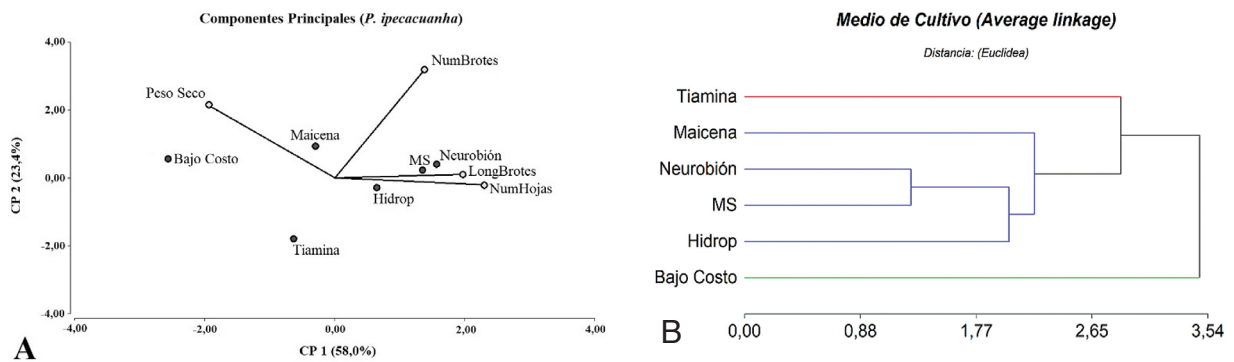


Figura 2. Análisis multivariado para el cultivo *in vitro* de raicilla en diferentes medios con sustitución de insumos a los 90 dds. Laboratorio de Biotecnología de Plantas, Tecnológico de Costa Rica, 2017. (A. Componentes principales; B. Conglomerados).

Cuadro 2. Comparación entre las variables de crecimiento para el cultivo *in vitro* de raicilla en diferentes medios con sustitución de insumos a los 90 dds.

Medio de cultivo *	n	NumBrotos **	LongBrotos ** (mm)	NumHojas **	PesoSeco ** (mg)
Bajo Costo (a)	50	2,94 ± 0,81 (a)	19,98 ± 5,92 (c)	5,68 ± 2,63 (c)	55,82 ± 11,69 (a)
MS (b)	50	3,06 ± 0,92 (a)	24,16 ± 6,99 (b)	11,68 ± 4,90 (a)	46,30 ± 17,71 (c)
Neurobión (c)	50	3,14 ± 0,95 (a)	25,52 ± 7,75 (b)	10,04 ± 4,20 (b)	43,66 ± 11,86 (c)
Hidrop (c)	50	2,94 ± 0,86 (a)	27,74 ± 8,76 (a)	9,62 ± 4,04 (b)	48,98 ± 17,54 (c)
Maicena (d)	50	3,08 ± 0,84 (a)	21,24 ± 5,83 (c)	9,82 ± 3,80 (b)	52,06 ± 14,16 (b)
Tiamina (d)	50	2,29 ± 0,82 (b)	20,78 ± 5,74 (c)	8,98 ± 3,73 (b)	44,58 ± 11,19 (c)

* Entre paréntesis, agrupación según Prueba de Hotelling - Bonferroni ($\alpha=0,05$).

** Entre paréntesis agrupación según comparación de medias LSD FISHER ($\alpha=0,05$).

Análisis de costos

La sustitución de componentes del medio de cultivo MS promovió un ahorro significativo en los costos de micropropagación de explantes de raicilla (cuadro 3). Los medios de cultivo que mayor ahorro presentaron fueron los medios con sustitución de sales hidropónicas y el medio de bajo costo. Los cuales mostraron un ahorro de 54% y 59% respectivamente, en comparación con el costo de preparación del medio testigo (MS). Este ahorro tan significativo se debe a los costos de importación requeridos para la compra de algunas sales minerales importantes en la composición del Medio MS, los cuales pueden tener precios muy elevados o que por su bajo requerimiento en el país solo se importa contra pedido por las casas comerciales que los comercializan en el país.

Cuadro 3. Costo aproximado de la composición base de un litro de diferentes medios con sustitución de insumos para el cultivo *in vitro* de *P. ipecacuanha* en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas, Tecnológico de Costa Rica, 2017.

Medio de cultivo	Costo por Litro de medio (US\$) según componentes				Total (US\$)	Porcentaje de ahorro
	Sales minerales	Vitaminas	Fuente de Carbono	Gelificante		
MS (Testigo)	\$12,01	\$7,43	\$1,69	\$0,86	\$21,99	----
Hidrop	\$ 0,06	\$7,43	\$1,69	\$0,86	\$10,04	54%
Neurobión	\$12,01	\$7,11	\$1,69	\$0,86	\$21,67	1%
Tiamina	\$12,01	\$6,96	\$1,69	\$0,86	\$21,52	2%
Maicena	\$12,01	\$7,43	\$1,69	\$0,15	\$21,28	3%
Bajo Costo	\$ 0,06	\$7,11	\$1,69	\$0,15	\$ 9,01	59%

Conclusiones

Gracias a este estudio, se estableció un sistema de propagación mediante medios con sustitución de insumos, los cuales permitieron la reducción de los costos de producción de medios y por consiguiente los de micropropagación de explantes de raicilla (*Psychotria ipecacuanha*). De los medios de cultivo evaluados, los medios con sustitución de sales minerales + Neurobión® + maicena como gelificante presentaron el mayor porcentaje de ahorro sin variar significativamente la integridad y calidad de los explantes producidos.

Agradecimientos

Un profundo agradecimiento a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica, por el financiamiento del proyecto “Propagación Masiva de Raicilla (*Psychotria ipecacuanha*) mediante Sustitución de Insumos de Bajo Costo” (Centro Funcional 2151065); del cual deriva esta publicación.

Referencias

- [1] E. Naranjo *et al.*, Avances en la propagación vía embriogénesis somática de *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes, planta medicinal en peligro crítico, Biotecnología Colombiana, Vol.16, No1, pp. 86–92, 2014.

- [2] LF. Oliveira and ER. Martins, A quantitative assessment of genetic erosion in ipecac (*Psychotria ipecacuanha*), Genetic Resources and Crop Evolution, Vol.49, pp. 607–617, 2002.
- [3] Alves-García *et al.*, Variation in emetine and cephaeline contents in roots of wild Ipecac (*Psychotria ipecacuanha*). Biochemical Systematics and Ecology, Vol.33, pp. 233–243, 2005.
- [4] N. Albany *et al.*, Una metodología para la propagación *in vitro* de *Aloe vera* L., Revista de la Facultad de Agronomía (Caracas), Vol. 23, No.2 pp 213–222, 2006.
- [5] K. Yoshimatsu and K. Shimomura, *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard (Brazilian Ipecac): Micropropagation and the Production of Emetine and Cephaeline, In: Y.P.S. Bajaj (ed), Biotechnology in Agriculture and Forestry: Medicinal and Aromatic Plants, SpringerVerlag, Berlin Heidelberg, Vol.21, pp. 87–103, 1993.
- [6] A. Lara *et al.*, Micropropagación de la planta medicinal *Psychotria acuminata*, Agronomía Costarricense, Vol.27, No.2, pp. 7–20, 2003.
- [7] C. Botero *et al.*, Potencial de regeneración de *Psychotria ipecacuana* (Rubiaceae) a partir de capas delgadas de células, Acta Biológica Colombiana, Vol.20, No.3, pp. 181–192, 2015.
- [8] I. Koike *et al.*, Dynamics of Endogenous Indole-3-acetic Acid and Cytokinins During Adventitious Shoot Formation in Ipecac, J Plant Growth Regul, Vol.36, pp. 805–813, 2017.
- [9] T. Murashige and F. Skoog, A Revised Medium for Rapid Growth and BioAssays with Tobacco Tissue Cultures, Physiologia Plantarum, Vol.15, No.3, pp. 473–497, 1962.
- [10] V. Savangikar, Low cost options for tissue culture technology in developing countries: Physical components of tissue culture technology, IAEA. Vienna, Austria, pp. 17–28, 2004.
- [11] N. Daud *et al.*, Provision of low cost media options for *in vitro* culture of *Celosia* sp., African Journal of Biotechnology, Vol.10, No.80, pp. 18349–18355, 2011.
- [12] G. Romay *et al.*, Almidón modificado de yuca con sustituto económico del agente solidificante para medios de cultivo de tejidos vegetales, Interciencia, Vol.31, No.9, pp. 686–689, 2006.
- [13] S. Prakash *et al.*, Low cost options for tissue culture technology in developing countries: Culture media and containers. IAEA. Vienna, Austria, pp. 29–40, 2004.
- [14] N. Daud *et al.*, Potential of alternative gelling agents in media for the *in vitro* micro-propagation of *Celosia* sp., Internacional Journal of Botany, Vol.7, No.2, pp. 183–188, 2011.
- [15] F. Maliro and G. Lameck, Potential of cassava flour as a gelling agent in media for plant tissue cultures, African Journal of Biotechnology, Vol.3, No.4, pp. 244–247, 2004.
- [16] R. Romero *et al.*, Uso de complejos comerciales como sustitutos de componentes del medio de cultivo en la propagación *in vitro* de *Laelia anceps*. Lankesteriana International Journal on Orchidology, Vol.7, No.2, pp. 353–356, 2007.
- [17] A. Azofeifa *et al.*, Uso de abonos foliares comerciales en la elaboración de medios de cultivo, Agronomía Costarricense, Vol.32, No.2. pp. 149–160, 2008.
- [18] E. Mbanaso, Effect of multiple subcultures on *Musa* shoots derived from cassava starch-gelled multiplication medium during micropropagation, African Journal of Biotechnology, Vol.7, No.24, pp. 4491–4494, 2008.
- [19] D. Martín *et al.*, Sustancias utilizadas como agentes gelificantes alternativas al agar en medios de cultivo para propagación *in vitro*. Investigación Agraria y ambiental, Vol.3, No.2, pp. 49–62, 2012.
- [20] D. Martín *et al.*, Almidón de papa, agente gelificante alternativo en medios de cultivo para propagación *in-vitro* de lulo *Solanum quitoense* Lam., Revista de Ciencias Agrícolas, Vol.30, pp. 3–11, 2013.
- [21] R. Sosa *et al.*, Propagación *in vitro* de camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) en medio de cultivo suplementado con fertilizantes convencionales, Avances en la Investigación Agropecuaria, Vol.21, No.2, pp. 7–24, 2017.
- [22] A. Kodym and F. Zapata, Low-cost alternatives for the micropropagation of banana, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Vol.66, pp. 67–71, 2001.
- [23] JA. Di Rienzo *et al.*, InfoStat versión 2017, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 2017.
- [24] H. Prieto *et al.*, Biotecnología Vegetal: El Cultivo de Tejidos, 1er edición. L. Barrueto, Santiago, Chile, INIA, pp. 31–53, 2005.
- [25] P. Abrahamian and A. Kantharajah, Effect of vitamins on *in vitro* organogenesis of plant, Scientific Research, Vol.2, pp. 669–674, 2011.
- [26] T. Thorpe *et al.*, The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems, In: Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd edition, Aberystwyth, Wales, Springer, Dordrecht, pp. 115–173, 2008.
- [27] MJ. Cañal *et al.*, Fisiología del cultivo *in vitro*, Biotecnología vegetal, Vol.1, pp. 3–9, 2001.

- [28] F. Jiménez and D. Agramonte, Cultivo *in vitro* y macropropagación como vía de sostenibilidad de la propagación de especies forestales, *Biotecnología vegetal*, Vol.13, pp. 3–21, 2014.
- [29] A. Rodríguez, Organogénesis *in vitro* de raicilla (*Psychotria ipecacuanha*) con sustitución de insumos, Tesis Licenciatura, San Carlos, Costa Rica, Instituto Tecnológico de Costa Rica, pp. 91, 2005.
- [30] C. Ramage y R. Williams, Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, Vol.38, pp. 116–124, 2002.
- [31] G. Mota *et al.*, Efeito de diferentes concentrações de nitrogênio no desenvolvimento e enraizamento *in vitro* de *Psychotria ipecacuanha*, Rubiaceae, *In: Seminário de iniciação científica da Embrapa*, Brasil, Belém, Embrapa Amazônia Oriental, 2010.
- [32] M. Mohamed *et al.*, Corn and potato starch as an agar alternative for *Solanum tuberosum* micropropagation, *African Journal of Biotechnology*, Vol.9, pp. 12–16, 2010.

Mutagénesis dirigida del conector interdominio ácido FVIIIa3 del factor VIII de la coagulación como estrategia para favorecer la cristalización de sus complejos con la trombina




Site-directed mutagenesis of the acidic interdomain linker FVIIIa3 of the coagulation factor VIII as a strategy to favor crystallization of its complexes with thrombin

Jeremy Rojas-Murcia¹, Silvia Arce-Solano², Pablo Fuentes-Prior³,
Erick Hernández-Carvajal⁴

Fecha de recepción: 23 de noviembre de 2018
Fecha de aceptación: 21 de febrero de 2019

Rojas-Murcia, J; Arce-Solano, S; Fuentes-Prior, P; Hernández-Carvajal, E. Mutagénesis dirigida del conector interdominio ácido FVIIIa3 del factor VIII de la coagulación como estrategia para favorecer la cristalización de sus complejos con la trombina. *Tecnología en Marcha*. Vol. 32-4. Octubre-Diciembre 2019. Pág 39-50.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i4.4789>

- 1 Ingeniero en Biotecnología. Centro de Investigación en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
- 2 Investigadora Instructora. Ing. Licenciada en Biotecnología. Centro de Investigación en Biotecnología Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
 <https://orcid.org/0000-0003-4357-3661>
- 3 Investigador Titular. Doctor en Bioquímica. Institut d'Investigació Biomèdica (IIB) Sant Pau, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona, España.
 <https://orcid.org/0000-0002-6618-3204>
- 4 Investigador Asociado. Doctor en Biomedicina. Centro de Investigación en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: erhernandez@itcr.ac.cr.
 <https://orcid.org/0000-0002-5585-9125>



Palabras clave

Enfermedades cardiovasculares; trombina; factor VIII; mutagénesis dirigida; cristalización de proteínas.

Resumen

Las enfermedades cardiovasculares representan una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, lo que se traduce en un fuerte impacto económico en el sector salud. El factor VIII (FVIII) es un cofactor esencial en los procesos hemostáticos que participa en la formación del coágulo ante alguna señal de daño vascular. La proteasa trombina es el principal activador fisiológico del FVIII, pero los mecanismos moleculares de reconocimiento del FVIII por la trombina y la formación de los complejos transitorios Michaelis-Menten correspondientes aún no se han descrito en detalle. La cristalografía de rayos X es una técnica que permite resolver la estructura 3D de complejos proteicos, pero requiere la cristalización previa de la muestra a estudiar. Con el objetivo de favorecer la formación de cristales del FVIIIa3 humano (residuos Glu¹⁶⁴⁹-Arg¹⁶⁸⁹) acomplejado con la trombina, se realizó mutagénesis dirigida para generar los doble-mutantes FVIIIa3 (R1689Q, G1690P) y FVIIIa3 (R1689G, G1690P). Estos fragmentos fueron sobreexpresados de forma heteróloga y purificados, obteniendo rendimientos de ~1.5 mg por cada litro de cultivo bacteriano. Esto permitió generar los complejos proteicos FVIIIa3 (R1689Q, G1690P)•trombina y FVIIIa3 (R1689G, G1690P)•trombina en cantidades suficientes para explorar sus espacios de solubilidad de forma extensiva. En total, en cada caso se evaluaron entre 630 y 820 condiciones de cristalización distintas. A partir de esta búsqueda inicial se obtuvo algún tipo de precipitado cristalino en 22 condiciones, 10 de las cuales lograron ser optimizadas para obtener monocristales de alta calidad para posteriores ensayos de difracción con rayos X.

Keywords

Cardiovascular diseases; thrombin; factor VIII; site-directed mutagenesis; protein crystallization.

Abstract

Cardiovascular diseases are one of the most important causes of morbidity and mortality worldwide, which translates into a strong economic impact in the health sector. Factor VIII (FVIII) is an essential cofactor within the hemostatic processes involved in blood clot formation upon vascular damage. The proteinase thrombin is the most important physiological activator of FVIII, but the molecular mechanisms underlying recognition of FVIII by thrombin and the formation of the corresponding, transient Michaelis-Menten complexes are still only poorly understood. X-ray crystallography allows the resolution of the 3D structure of protein complexes, but a prerequisite is the crystallization of the sample to be analyzed. To grow crystals of the human FVIIIa3 (residues Glu¹⁶⁴⁹-Arg¹⁶⁸⁹) complexed with thrombin, site-directed mutagenesis was performed to generate the double-mutants FVIIIa3 (R1689Q, G1690P) and FVIIIa3 (R1689G, G1690P). Both fragments were overexpressed as heterologous proteins and purified with yields of ~1.5 mg per liter of bacterial culture. Availability of these recombinant proteins allowed in turn generation of FVIIIa3 (R1689Q, G1690P)•thrombin and FVIIIa3 (R1689G, G1690P)•thrombin complexes to perform extensive screenings of their solubility space. Altogether, a total of 630 to 820 different crystallization conditions were evaluated for both complexes. From these initial screen, some sort of crystalline precipitate was obtained in 22 conditions, 10 of which could be optimized to grow high-quality single crystals for subsequent X-ray diffraction analysis.

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) representan una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. En España, aproximadamente uno de cada tres decesos es causado por una ECV, esto se traduce en un elevado coste al sistema sanitario de más de 9.000 millones de euros al año [1]. De forma similar, según un estudio de la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicado en el 2014 [2], en Costa Rica el 30% de las muertes son debido a ECVs, tanto en hombres como en mujeres de entre 30 y 70 años. Dentro de este grupo de enfermedades se encuentran las isquemias cardíacas o infartos y los derrames cerebrovasculares o ictus, los cuales en muchos de los casos se deben a eventos de trombosis, caracterizados por la formación de coágulos de sangre que se alojan en los vasos sanguíneos en el corazón o en el cerebro, interrumpiendo el suministro de oxígeno y nutrientes en estos órganos [1]. El proceso de formación del coágulo es complejo y altamente regulado por un gran número de proteínas que interaccionan entre sí y con células como las plaquetas. Un elemento esencial de este proceso de coagulación es la activación de la protrombina a trombina, la cual es considerada una de las proteasas con actividad procoagulante más importante, ya que participa en la activación del fibrinógeno, del factor XIII y de receptores activados por proteasas (PARs) en la superficie de las plaquetas, así como de los cofactores V y VIII, favoreciendo la formación del coágulo [3]. La activación de estas moléculas, mediada por la trombina, requiere de una serie de cortes proteolíticos específicos, gracias a la formación de complejos transitorios con los sustratos correspondientes [4]. En el caso del FVIII, estudios bioquímicos sugieren que las secuencias interdominio del FVIII (conocidas como conectores a1, a2 y a3) presentan características específicas que les permiten orientar los sitios de corte y activación del factor VIII hacia el sitio activo de la trombina, favoreciendo la proteólisis y por tanto la activación del cofactor. Sin embargo, actualmente no existe suficiente información a nivel atómico-molecular sobre los mecanismos moleculares detallados de interacción del FVIII con la trombina, lo que impide su utilización como diana para el desarrollo de fármacos antitrombóticos novedosos, capaces de tratar con éxito las ECVs. La cristalografía de proteínas mediante rayos X, es la técnica más utilizada para resolver las estructuras tridimensionales (3D) de macromoléculas a nivel atómico [5]. Resolver la estructura del complejo trombina-FVIII permitirá comprender mejor el mecanismo de activación por proteólisis del FVIII mediado por la trombina, pero para ello se requiere crecer monocristales del complejo proteico para la posterior colecta de datos de difracción de rayos X. Con el objetivo de fomentar la obtención de monocristales del conector FVIIIa3 acomplejado con la proteinasa humana, en este trabajo se realizó mutagénesis dirigida de residuos específicos del FVIIIa3 para la sobreexpresión y purificación de los doble-mutantes FVIIIa3 (R1689Q, G1690P) y FVIIIa3 (R1689G, G1690P).

Materiales y métodos

Mutagénesis dirigida: A partir de la confirmación de la clonación en el vector de expresión pET-3a de la secuencia del FVIIIa3 (residuos aminoácidos 1649-1689), fusionada a una cola de histidinas en el extremo N-terminal, se procedió a diseñar *in silico* la mutagénesis dirigida para la obtención de los doble-mutantes FVIIIa3 (R1689Q, G1690P) y FVIIIa3 (R1689G, G1690P). Las secuencias de los fragmentos respectivos, junto a algunas de sus características fisicoquímicas relevantes se presentan en el cuadro 1.

Empleando la secuencia nucleotídica teórica del FVIIIa3, se realizó el diseño de los imprimadores requeridos para generar el FVIIIa3 (R1689Q, G1690P) y FVIIIa3 (R1689G, G1690P) con la herramienta del kit *Q5™ Site-Directed Mutagenesis* (New England Biolabs, NEB). La síntesis de los imprimadores fue contratada a Macrogen (Korea). Para ambos fragmentos doble-mutantes del FVIIIa3 se llevó a cabo un protocolo de mutagénesis dirigida, siguiendo las

recomendaciones indicadas en el kit *Q5™ Site-Directed Mutagenesis* (NEB). Posteriormente, se realizó una transformación de las células competentes *E. coli* NEB 5-*alpha*, y para comprobar la generación del mutante deseado, se realizó una extracción del ADN plasmídico empleando el kit de purificación *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen). Las muestras de ADN plasmídico extraídas por triplicado, se cuantificaron en un espectrofotómetro (NanoDrop™ Lite), se visualizaron en un gel de agarosa al 1%, y se secuenciaron para confirmar la secuencia mutante de interés (Macrogen, Korea).

Cuadro 1. Secuencias y características fisicoquímicas básicas de los fragmentos del FVIIIa3 humano silvestre y los mutantes específicos. Los residuos modificados por mutagénesis dirigida se destacan con negrita y subrayado. Las secuencias correspondientes a las colas de histidinas añadidas para la purificación de las proteínas recombinantes se destacan en cursiva. Se incluye el peso molecular promedio (P_m), el punto isoeléctrico teórico (pI) y la absorbancia teórica para una solución de 1 g/L de la proteína pura a 280 nm (Abs_{280} 0.1%). Los datos teóricos fueron calculados utilizando la herramienta SIB ExpASY Bioinformatics Resources Portal (<http://web.expasy.org/protparam/>).

Fragmento	Secuencia de aminoácidos	P_m (Da)	pI	Abs_{280} 0.1%
FVIIIa3	ASHHHHHHGEITRRTLQSDQEEIDYDDTISV EMKKEDFDIYDEDENQSPRQSGC	6284.55	4.54	0.474
FVIIIa3 (R1689Q, G1690P)	ASHHHHHHGEITRRTLQSDQEEIDYDDTISV EMKKEDFDIYDEDENQSP <u>Q</u> PSGC	6296.56	4.42	0.473
FVIIIa3 (R1689G, G1690P)	ASHHHHHHGEITRRTLQSDQEEIDYDDTISV EMKKEDFDIYDEDENQSP <u>G</u> PSGC	6225.48	4.42	0.479

Clonaje y sobreexpresión heteróloga de los doble-mutantes del FVIIIa3: Se transformaron por triplicado cepas competentes de *E. coli* One Shot™ BL21 Star™ (DE3) pLysS (Invitrogen™) con los plásmidos de expresión que codifican para los fragmentos mutantes del FVIIIa3 confirmados por secuenciación, FVIIIa3 (R1689Q, G1690P) y FVIIIa3 (R1689G, G1690P), mediante choque térmico. Las cepas transformadas se incubaron en placas de Petri con agar LB, y los antibióticos correspondientes [ampicilina (100 µg/mL) y/o cloranfenicol (34 µg/mL)], y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Posteriormente, se tomó una colonia bacteriana transformada y se inoculó en 40 mL de medio LB con los antibióticos correspondientes. El cultivo se incubó durante la noche a 37°C con agitación constante de 220 rpm. Al día siguiente, se inoculó el precultivo en 400 mL de medio LB con antibióticos, en un matraz de 2 litros, a 37°C con agitación constante de 220 rpm. Una vez alcanzada una densidad óptica (OD) de entre 0.4-0.6 a 600 nm, se indujo la expresión de la proteína recombinante adicionando IPTG a una concentración final de 0.55 mM. El cultivo se incubó durante 6 horas a 37°C con agitación constante a 220 rpm. Finalmente, se centrifugó el cultivo a 4.000 rpm durante 20 minutos, y el sedimento obtenido se congeló a -20°C hasta su procesamiento.

Extracción y purificación de los doble-mutantes del FVIIIa3: La extracción de las proteínas sobreexpresadas en *E. coli* One Shot™ BL21 Star™ (DE3) pLysS, se realizó mediante lisis celular, resuspendiendo el sedimento bacteriano en 1 mL de tampón de lisis (40 mM Tris, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM β-mercaptoetanol, 0.5 µg/mL ADNasa y 20 mM MgCl₂). Se incubó durante 30 minutos en rotor y luego se centrifugó a 12.000 rpm durante 30 minutos a

4°C para eliminar el material insoluble. A partir de la fracción soluble se purificó la proteína de interés mediante incubación con la resina de afinidad Ni-NTA acoplada a agarosa (Qiagen) a 4°C durante 3 horas con agitación suave y constante en un agitador orbital. La suspensión con resina se trasvasó a una columna, se recuperó la fracción no unida a la resina, y se realizaron dos lavados con 10 y 20 mM imidazol, y con 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, pH 8.0. Finalmente, se eluyó el material unido de forma específica a la resina empleando 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, pH 8.0, 500 mM imidazol. La pureza de las muestras purificadas se evaluó mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%. La autenticidad y pureza de los fragmentos recombinantes purificados se comprobó mediante espectrometría de masas con un equipo LTQ-FT Ultra (Thermo Scientific) empleando un nanoelectrospray con modo de polaridad positiva. Los resultados de espectrometría se analizaron con el programa *Protein Pilot*.

Ensayos de interacción (band shift) de los doble-mutantes del FVIII: Previo a los ensayos de interacción (*band shift*) y de cristalización los fragmentos FVIIIa3 (R1689Q, G1690P) y FVIIIa3 (R1689G, G1690P) purificados, estos se dializaron con la finalidad de eliminar el imidazol añadido durante el proceso de purificación, y cambiar el tampón a 10 mM HEPES pH 7.0, 25 mM NaCl, empleando centrifugación en concentradores (Amicon Ultra 3K). Los ensayos de interacción o desplazamiento de banda ("*band shift*") se realizaron mediante electroforesis en geles nativos de poliacrilamida al 7.5%. Para el ensayo se incubó una cantidad fija de trombina humana (15 μg) con cantidades variables de los fragmentos doble-mutantes del FVIIIa3 en relaciones molares de 1:0.5, 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8. Los complejos formados fueron separados de los componentes mediante electroforesis nativa en geles de poliacrilamida al 7.5%, y las bandas de proteína fueron visualizadas con azul de Coomassie.

Ensayos de cristalización de los complejos de la trombina con los doble-mutantes del FVIIIa3: Para los ensayos de cristalización, los complejos entre la trombina y las variantes del FVIIIa3 se prepararon con un exceso molar del fragmento recombinante (10:1) en el mismo tampón, a temperatura ambiente por 30 minutos, y se concentraron a 5 mg/mL utilizando dispositivos Amicon Ultra-15 con poro nominal de 3 kDa (Millipore). Los ensayos de cristalización se llevaron a cabo mediante la técnica de difusión de vapor a 20°C. Se evaluaron 820 condiciones diferentes de cristalización, incluyendo las 192 condiciones de los kits *PAC PROPLEX* y *PAC PEGRx* en placas de 96 pozos (MRC 2-well), empleando un robot *Cartesian Microsys*, en el Parc Científic de Barcelona. Se mezcló en cada condición 0.1 μL de la disolución del complejo FVIIIa3-trombina con 0.1 μL de la solución de cristalización, y se dejó equilibrar a través de la fase de vapor con un reservorio de la solución de cristalización. En el CIB, se evaluaron 628 condiciones de cristalización de los kits *Morpheus™ I y II*, *JCSG-plus™*, *ProPlex™*, *Structure Screen I y II*, *Structure Screen 3D* y *PACTpremier™* (Molecular Dimensions), en placas de 24 pozos (ComboPlates™). En cada condición se mezcló 1 μL de la disolución del complejo respectivo con 1 μL de la solución de cristalización, y se equilibró contra 0.5 mL de la solución de cristalización. Las gotas fueron periódicamente inspeccionadas en busca de cristales con un estereoscopio Nikon SMZ-800N.

Resultados

Generación de los doble-mutantes del FVIIIa3 por mutagénesis dirigida y confirmación por secuenciación de ADN.

A partir del análisis *in silico*, se identificaron los nucleótidos a ser mutados y se diseñaron los imprimadores para realizar la mutagénesis dirigida y obtener así las secuencias codificantes para las variantes FVIIIa3 (R1689Q, G1690P) y FVIIIa3 (R1689G, G1690P) (cuadro 2).

Cuadro 2. Secuencias de imprimadores específicos para la mutagénesis dirigida. Los nucleótidos modificados para inducir los cambios de interés se presentan en mayúscula.

Fragmento modificado	Imprimador	Secuencia
FVIIIa3 (R1689Q, G1690P)	Sentido	5'-accagtctccgcagCCatccggctgctaac-3'
	Antisentido	5'-tggtcagaggcgctcGGtaggccgacgattg-3'
FVIIIa3 (R1689G, G1690P)	Sentido	5'-ccagtctccgGGgccatccggc-3'
	Antisentido	5'-tttcatcctcatcgtagatgtc-3'

Tras realizar el procedimiento de mutagénesis dirigida siguiendo el protocolo establecido por el fabricante del *kit* se transformaron células con los productos de las reacciones de mutagénesis. Se seleccionaron clones bacterianos y su ADN plasmídico se purificó y secuenció, lo cual permitió confirmar las secuencias de nucleótidos codificantes para los fragmentos FVIIIa3 (R1689Q, G1690P) [figura 1] y FVIIIa3 (R1689G, G1690P) [datos no mostrados].

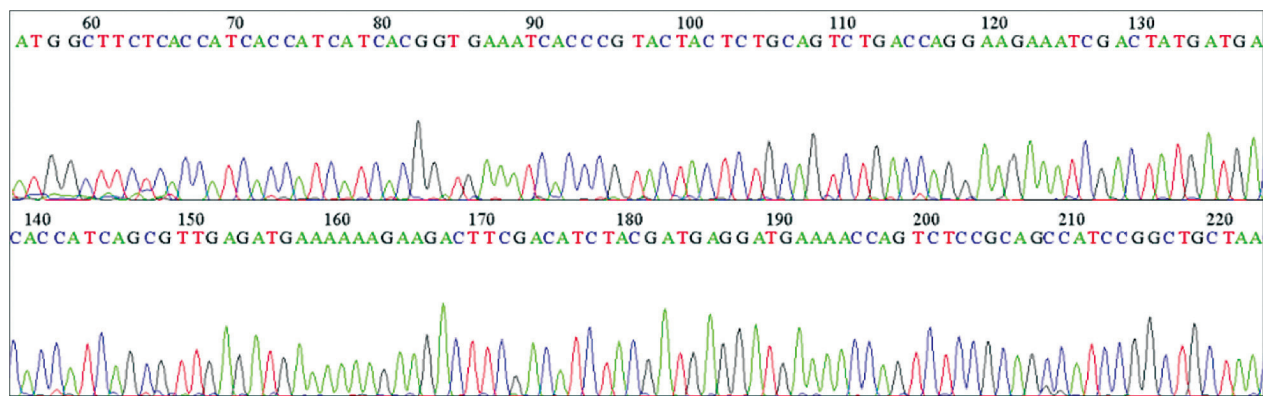


Figura 1. Electroferograma obtenido a partir de la secuenciación del ADN plasmídico que codifica para el fragmento FVIIIa3 (R1689Q, G1690P). Los tripletes CAG (nucleótidos 206-208) y CCA (nucleótidos 209-211) corresponden a los residuos de aminoácidos de glutamina (Q) y prolina (P) introducidos en las posiciones P1 y P1' del FVIIIa3, respectivamente.

La traducción *in silico* de las secuencias nucleotídicas obtenidas permitió verificar las secuencias de aminoácidos que se obtendrían al sobreexpresar las variantes FVIIIa3 (R1689Q, G1690P) [figura 2] y FVIIIa3 (R1689G, G1690P) [datos no mostrados].

Los fragmentos FVIIIa3 (R1689Q, G1690P) y FVIIIa3 (R1689G, G1690P) lograron ser sobreexpresados y purificados a homogeneidad y con un buen rendimiento

Posterior a la extracción y purificación de los fragmentos FVIIIa3 (R1689Q, G1690P) [figura 3A] y FVIIIa3 (R1689G, G1690P) [figura 3B] por cromatografía de afinidad (ver "Materiales y Métodos"), los análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) permitieron confirmar un alto grado de pureza y un buen rendimiento de la sobreexpresión.

```

catatggcttctcaccatcaccatcatcacggtgaaatcacccgtactactctgcagtct
H M A S H H H H H G E I T R T T L Q S
gaccaggaagaaatcgactatgatgacaccatcagcgttgagatgaaaaagaagacttc
D Q E E I D Y D D T I S V E M K K E D F
gacatctacgatgaggatgaaaaccagtctccgcagccatccggctgctaa
D I Y D E D E N Q S P Q P S G C -
    
```

Figura 2. Traducción *in silico* de la secuencia nucleotídica del FVIIIa3 (R1689Q, G1690P). La secuencia aminoacídica correspondiente al fragmento recombinante del doble-mutante FVIIIa3 (R1689Q, G1690P) se confirmó con la herramienta *SIB ExPASy Bioinformatics Resources Portal*. Los nucleótidos se representan con letras minúsculas y los aminoácidos se representan con código de una letra en mayúscula.

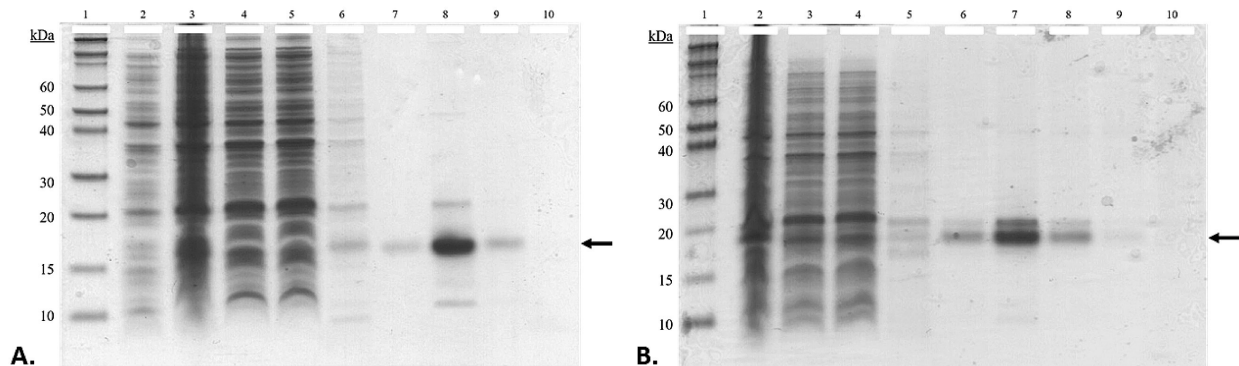


Figura 3. Análisis por SDS-PAGE de la sobreexpresión y purificación de los doble-mutantes FVIIIa3 (R1689Q, G1690P) [A] y FVIIIa3 (R1689G, G1690P) [B] expresados en *E. coli* One Shot™ BL21 Star™ (DE3) pLysS. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular (*Novex Sharp*); en los carriles del 2 al 6, se muestran alícuotas de células totales, los extracto solubles en tampón de lisis, las fracciones de proteínas no unidas a la resina de afinidad Ni-NTA, y los lavados sucesivos con 10 mM y 20 mM de imidazol, respectivamente; y en los carriles del 7 al 10 se muestran las eluciones sucesivas con tampón de elución (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8.0, 500 mM imidazol). A la izquierda de la imagen se indica el peso correspondiente, en kilodaltons, de las bandas relevantes del marcador *Novex Sharp*. A la derecha de la imagen se señala con una flecha la banda de interés.

En los diferentes experimentos de expresión realizados, tras los procesos de purificación y diálisis, se obtuvo un rendimiento promedio de ~1.5 mg de cada fragmento recombinante de interés por litro de cultivo bacteriano. Finalmente, la identidad de las variantes de los fragmentos recombinantes del FVIIIa3 purificados se evaluaron mediante espectrometría de masas. Con respecto al FVIIIa3 (R1689Q, G1690P), la especie monoisotópica experimental con relación masa/carga (*m/z*) 6292.7222 Da detectada corresponde exactamente a la secuencia del fragmento recombinante (masa molecular teórica: 6292.72 Da) (figura 4).

La interacción de los doble-mutantes del FVIIIa3 con la trombina permitió cristalizar los complejos trombina•FVIIIa3

El objetivo de los ensayos de cristalización es obtener cristales de los complejos de la trombina humana con cada uno de los fragmentos recombinantes de interés. Para ello se evaluó la formación de los complejos FVIIIa3 (R1689Q, G1690P) y FVIIIa3 (R1689G, G1690P) con la trombina, mediante geles de poliácridamida nativos al 7.5%. En las figuras 5.A y 5.B se muestra el patrón de bandas resultante, donde se evidencia el desplazamiento de la banda por la

formación de los complejos de FVIIIa3 (R1689Q, G1690P) o FVIIIa3 (R1689G, G1690P) con la trombina humana. Nótese la aparición de una nueva banda que parece corresponder al complejo trombina•FVIIIa3 respectivo, debido a la interacción entre las proteínas.

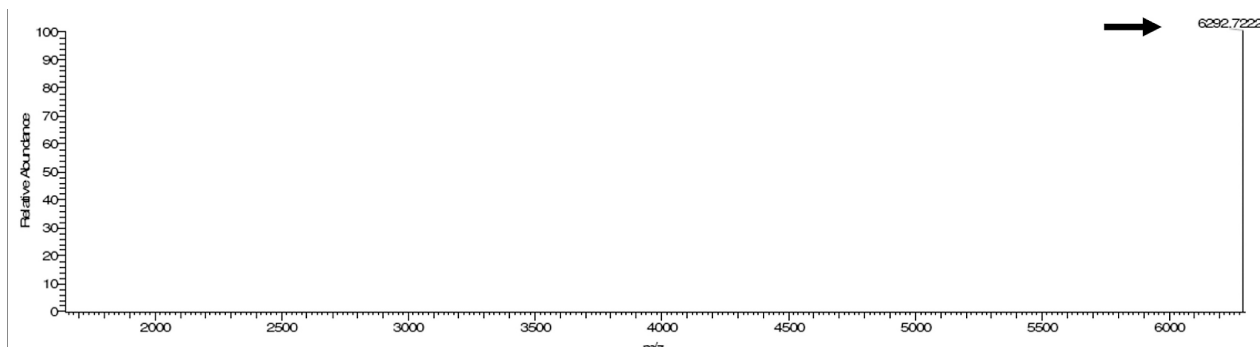


Figura 4. Verificación de la identidad del fragmento recombinante FVIIIa3 (R1689Q, G1690P) mediante espectrometría de masas. Especie monoisotópica experimental detectada en el extremo de la ventana espectral empleada (se señala con una flecha). Los experimentos se realizaron con un equipo LTQ-FT Ultra (Thermo Scientific) empleando un nanoelectrospray.

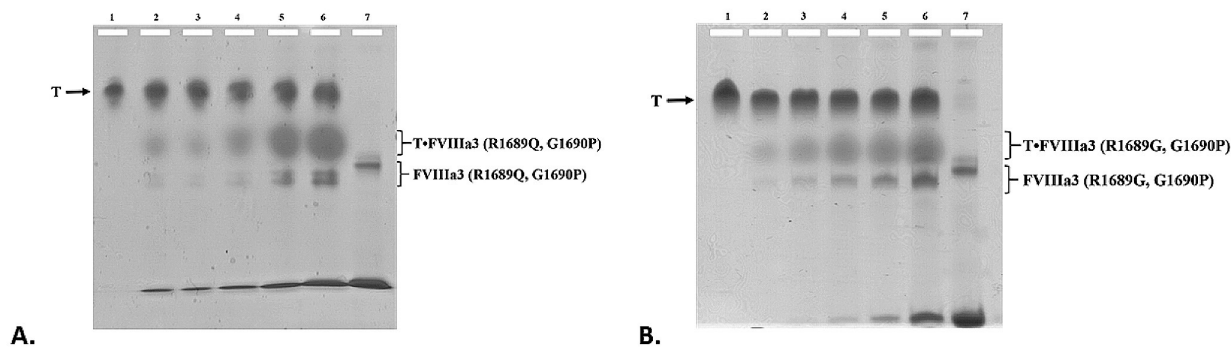


Figura 5. Demostración de la formación de complejos entre el FVIIIa3 recombinante y la trombina humana mediante experimentos de *band-shift*. A. Complejo trombina•FVIIIa3 (R1689Q, G1690P). B. Complejo trombina•FVIIIa3 (R1689G, G1690P). Se emplearon geles al 7.5% de poliacrilamida nativos preparados con tampón Tris-Glicina. En el carril 1 se cargaron 15 µg de trombina (T); en los carriles del 2-6 se aplicaron diferentes relaciones molares del fragmento recombinante respecto a la trombina (0.5:1, 1:1, 2:1, 4:1, 8:1, respectivamente); en el carril 7 se cargó una alícuota del doble-mutante de FVIIIa3 correspondiente. Nótese en cada caso la aparición de una nueva banda que migra entre las de trombina y la variante del conector ácido del FVIII analizado, y que corresponde al complejo T•FVIIIa3.

Una vez confirmada la formación de los complejos mediante ensayos de *band-shift*, se prepararon grandes cantidades del complejo de FVIIIa3 (R1689Q, G1690P) con la trombina, y se realizó una búsqueda de las condiciones de cristalización utilizando los *kits* PROPLEX y PEGRx (192 condiciones). A los 3 meses de realizado el *screening* se observaron posibles microcristales en 7 condiciones del *kit* PROPLEX, y en 5 condiciones con el *kit* PEGRx (datos no mostrados). Posteriormente, se prepararon complejos de la trombina tanto con la variante FVIIIa3 (R1689Q, G1690P) como con el FVIIIa3 (R1689G, G1690P), y se realizó una nueva búsqueda de condiciones de cristalización utilizando los *kits* de cristalización Morpheus™, Morpheus™ II, JCSG-plus™, ProPlex™, Structure Screen I, Structure Screen II, Structure Screen

3D y PACT^{premier}[™]. De un total de 628 condiciones evaluadas para cada complejo, en 10 de ellas se obtuvieron mono-cristales de tamaño apropiado. Cabe resaltar que en la condición I-16 de *Morpheus*[™], compuesta por 0.09 M halógenos, 0.1 M tampón No. 1, pH 6.5, 50% (v/v) mezcla de precipitantes No. 4, se obtuvieron cristales de ambos complejos. En la figura 6 se muestran algunos ejemplos de los microcristales o precipitados cristalinos que se obtuvieron a partir del *screening* realizado.

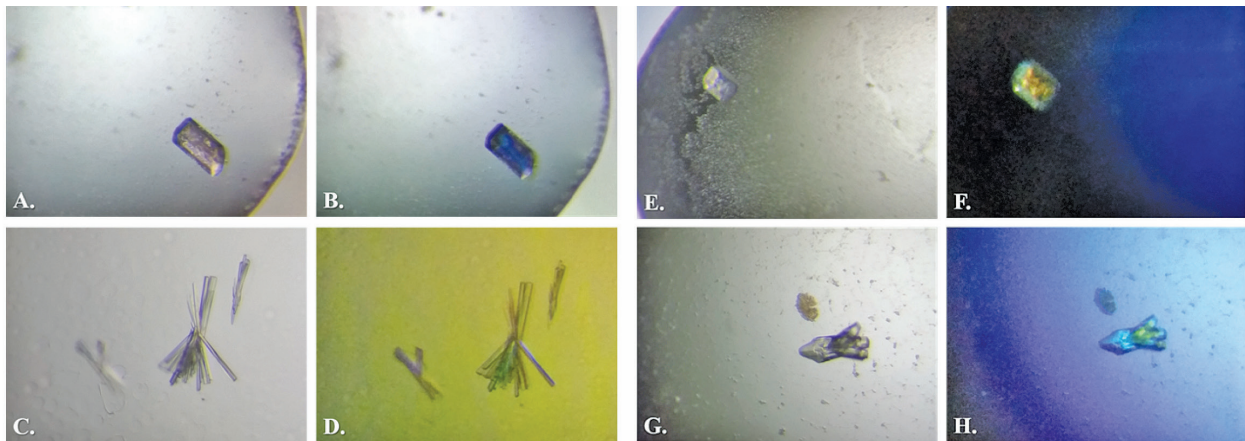


Figura 6. Formaciones cristalinas obtenidas a partir de los complejos de la trombina con los doble-mutantes del FVIIIa3. (A-D) Cristales obtenidos a partir del complejo FVIIIa3 (R1689Q, G1690P)•trombina. Las imágenes mostradas en los paneles A/C y B/D corresponden a las condiciones I-16 e I-36 del *kit Morpheus*, iluminadas con luz natural y con luz polarizada, respectivamente. (E-H) Cristales obtenidos a partir del complejo FVIIIa3 (R1689G, G1690P)•trombina en las condiciones I-16 (E/F) e I-28 (G/H) de *Morpheus*, respectivamente. Los paneles F y H muestran las imágenes obtenidas con luz polarizada.

Discusión

Análisis de la sobreexpresión y purificación de los doble-mutantes del FVIIIa3

El requisito imprescindible para poder resolver la estructura 3D de una proteína o complejo proteico utilizando cristalografía de proteínas es la obtención de al menos un cristal de buena calidad para coleccionar datos de difracción de rayos X. La condición o condiciones en las cuales crecen monocristales no pueden ser predichas, sino que han de ser determinadas a partir de experimentos en los que se explora un gran número de variables (pH, agentes cristalizantes, etc.). Es por ello que el limitante en este tipo de estudios es la necesidad de contar con gran cantidad de proteína, con un alto grado de pureza y homogeneidad [6]. Estudios previos de nuestro grupo [7], evidenciaron la posibilidad de sobreexpresar el conector ácido FVIIIa3 como proteína recombinante, en cantidades suficientes para ensayos bioquímicos y de cristalización. Siguiendo las mismas condiciones de expresión empleadas por [7], en este trabajo se lograron sobreexpresar satisfactoriamente los fragmentos recombinantes de dos doble-mutantes del FVIIIa3, diseñados para estabilizar su complejo con la proteasa activadora (figuras 3A y 3B). Al analizar mediante SDS-PAGE estas variantes del FVIIIa3, con masas moleculares teóricas inferiores a 6.3 kDa, observamos que los fragmentos migran como las bandas de 15 y 20 kDa del marcador de peso molecular. Esta migración anómala se debe al fenómeno conocido como “*gel shifting*”, el cual consiste en la notable disminución de la distancia migrada por ciertas proteínas en geles de poliacrilamida-SDS, y se atribuye a las características bioquímicas de las proteínas analizadas y a la composición de los tampones empleados durante los experimentos.

Estudios previos han demostrado que polipéptidos con un alto contenido de residuos ácidos, como lo es el FVIIIa3, repelen las moléculas de SDS, y como consecuencia migran como especies con una masa muy superior a la teórica en geles de poliacrilamida-SDS [8, 9]. Ante esta anomalía, y con el objetivo de confirmar la identidad de las variantes del conector FVIIIa3 expresadas, se analizaron las muestras por espectrometría de masas, confirmándose la identidad del fragmento FVIIIa3 (R1689Q, G1690P) (figura 4). (En el caso del fragmento FVIIIa3 (R1689G, G1690P) se deberá repetir el ensayo, ya que el análisis que se realizó no detectó la especie monoisotópica experimental, probablemente por una ionización deficiente de la muestra). Cabe destacar que el rendimiento promedio obtenido tanto para las variantes FVIIIa3 (R1689Q, G1690P) y FVIIIa3 (R1689G, G1690P) fue de ~1.5 mg por litro de cultivo bacteriano, el cual es tres veces mayor comparado con el rendimiento reportado para la sobreexpresión del conector FVIIIa3 silvestre [7].

Efecto de las mutaciones introducidas en la cristalización del complejo trombina•FVIIIa3

La resolución de estructuras por medio de la cristalografía de macromoléculas permite la descripción detallada de complejos a nivel molecular e inclusive atómico [10], siendo una de las técnicas básicas para entender el mecanismo de interacción de enzimas en general, y de proteinasas en particular. Por esta razón, la cristalografía fue la técnica escogida para estudiar el mecanismo gracias al cual la trombina proteoliza con gran eficiencia y especificidad los enlaces peptídicos Arg-Xxx en los extremos C-terminales de los conectores interdominio del FVIII (a1, a2 y a3). Para formar un cristal de un complejo proteico, es necesario que este se encuentre de forma estable [11]. Dado que la trombina tiene actividad proteolítica sobre los fragmentos interdominio del FVIII, después de formarse el complejo del FVIIIa3 con la proteasa, esta proteoliza el enlace entre el residuo de arginina en la posición 1689 (Arg1689) y la Ser1690, liberándose a continuación el fragmento interdominio y deshaciendo el complejo [4]. Con el objetivo de reducir la capacidad de la trombina para hidrolizar dicho enlace peptídico, se cambió la secuencia del sitio de corte mediante mutagénesis dirigida, tanto de la Arg1689 como de la Ser1690. (En el caso del FVIIIa3 clonado en el vector de expresión, la Arg1689 es seguida de una glicina). Estos dos sitios modificados en el FVIIIa3 corresponden, bioquímicamente hablando, a las posiciones P1 y P1' reconocidos por la trombina en sus sustratos, y al modificarlos se altera la eficiencia del corte mediado por esta proteasa. Los residuos de arginina y serina se han reportado como los más eficientemente reconocidos por la trombina en las posiciones P1 y P1', respectivamente, tal y como se indica en la base de datos de peptidasas MEROPS (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>). La arginina se caracteriza por tener una cadena lateral terminada en un grupo guanidinio cargado positivamente, que es esencial para su reconocimiento por el residuo Asp¹⁸⁹ en el fondo del bolsillo S1 de la proteasa. En el FVIIIa3 (R1689Q, G1690P), la arginina (R) en la posición P1 fue sustituida por glutamina (Q), un aminoácido polar que tiene una cadena lateral más corta y que termina con un grupo amida no cargado, mientras que para el FVIIIa3 (R1689G, G1690P) el cambio es más radical, ya que la glicina (G) es un aminoácido que carece de cadena lateral (sólo un hidrógeno). Por otra parte, en los dos dobles-mutantes estudiados, la glicina (G) de la posición P1' se sustituyó por la prolina (P), un aminoácido no polar y cíclico, dada la ausencia de un grupo NH libre e impedimentos estéricos hacen que los enlaces Xxx-Pro sean atacados muy poco eficientemente, o no atacados en absoluto. Estos cambios en las posiciones P1 y P1' se supone que sólo alteran las interacciones más directas entre el sitio de corte del FVIIIa3 y el sitio activo de la trombina. En apoyo a esta hipótesis, estudios bioquímicos han demostrado que la sustitución Arg>His en la posición P1 disminuye sustancialmente la cinética del corte catalizado por la trombina, pero sin afectar la formación del complejo trombina-factor VIII. Esta observación sugiere que otras regiones de la proteasa serínica, como los llamados 'exositos', gobiernan el anclaje del sustrato FVIII, en el sitio activo de la proteasa, en una conformación óptima para su activación [12]. De esta manera,

se espera que los cambios realizados dificulten la actividad proteolítica de la trombina sobre los fragmentos del FVIIIa3, favoreciendo la formación de complejos más estables, y por tanto, incrementando la posibilidad de observar el conector intacto (no proteolizado) en los cristales crecidos. Para evaluar los resultados de la mutagénesis dirigida y confirmar la formación de los complejos proteicos de interés, previo a los ensayos de cristalización, realizamos ensayos de “*band shift*”. Gracias a estos ensayos logramos confirmar cualitativamente la interacción entre las variantes del FVIIIa3 y la trombina en condiciones nativas. A la hora de realizar estos ensayos se consideró la diferencia entre los puntos isoeléctricos (pI) de la trombina (7.0-7.6) y de las dos variantes del FVIIIa3 (alrededor de 4.5). Esto permite que las distancias migradas por las bandas correspondientes a la trombina y los fragmentos del FVIIIa3 aislados no sólo se diferencien entre sí, sino también de los complejos formados, ya que el aumento en masa se ve compensado por la mayor electronegatividad conferida por el FVIIIa3 unido (figuras 5A y 5B). Una vez confirmada la formación cualitativa de los complejos de la trombina con las variantes del FVIIIa3, se realizaron búsquedas sistemáticas iniciales de condiciones de cristalización siguiendo dos estrategias: 1) empleando un robot que dispensa gotas con volúmenes de nanolitros (nL) (en la Plataforma de Cristalografía Automatizada del Parc Científic de Barcelona), y 2) dispensando manualmente microgotas (μL) (en el CIB). La estrategia automatizada permitió encontrar 12 condiciones en las cuales se observaron formaciones microcristalinas, mientras que la estrategia de micro-gotas, permitió encontrar formas cristalinas de mayor tamaño en 10 condiciones diferentes (figura 6). Cabe destacar en particular la condición I-16 del *kit* de *Morpheus* [0.09 M halógenos, 0.1 M tampón No.1, pH 6.5 y 50% (v/v) mezcla de precipitantes No.4], en la que se obtuvieron los cristales de mayor tamaño para ambos complejos. A partir de los resultados del *screening* primario, es posible optimizar parámetros como pH, concentraciones de agentes precipitantes y de proteína, etc. alrededor de las condiciones más prometedoras (*screening* secundarios), con el objetivo de mejorar la calidad de los cristales obtenidos. Esto a su vez, permitirá coleccionar mejores conjuntos de datos de difracción de rayos X, que permitan resolver y refinar la estructura 3D de las proteínas presentes en el cristal a la mayor resolución posible. En el caso concreto de este proyecto, esto permitiría eventualmente conocer a nivel atómico las regiones del FVIIIa3 que interactúan con la trombina, tanto con el sitio activo como con los exositos I y II, y con ello, comprender el mecanismo de activación del FVIII mediado por la trombina.

Conclusiones

Se lograron generar los dobles-mutantes del conector interdominio del FVIIIa3 humano, a saber, FVIIIa3 (R1689Q, G1690P) y FVIIIa3 (R1689G, G1690P) mediante mutagénesis dirigida y se confirmaron mediante secuenciación de ADN. Ambos dobles-mutantes del FVIIIa3 se sobreexpresaron de forma heteróloga en *E. coli* y se purificaron a homogeneidad con alto rendimiento. La formación de los complejos de las variantes mutadas del FVIIIa3 con la trombina se confirmaron mediante *band shift*, y la búsqueda de condiciones de cristalización permitió obtener algún tipo de precipitado cristalino en 22 condiciones, 10 de las cuales lograron ser optimizadas para crecer mono-cristales de calidad para posteriores ensayos de difracción con rayos X.

Agradecimientos

A la Vicerrectoría de Vida Estudiantil por apoyar el financiamiento de la estancia científica de J.R-M. en la Unidad de Bases Moleculares de las Enfermedades del Institut d'Investigació Biomèdica, del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, España), y a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del TEC por el financiamiento del proyecto (CF 1510078).

Referencias

- [1] A. Timmis et al., "European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2017", Brussels: European Heart Journal, vol. 39, no. 7, pp. 508-579, 2018.
- [2] "Enfermedades cardiovasculares", Organización Mundial de la Salud, 2014.
- [3] B. Furie, B y B. C. Furie, "Mechanisms of thrombus formation", N. Engl. J. Med., vol. 359, no. 9, pp. 938-949, 2008. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0801082>
- [4] P. J. Fay, "Activation of factor VIII and mechanisms of cofactor action". Blood Rev., vol. 18, no. 1, pp. 1-15, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0268-960X\(03\)00025-0](https://doi.org/10.1016/S0268-960X(03)00025-0)
- [5] P. W. Rose et al., "The RCSB Protein Data Bank: views of structural biology for basic and applied research and education", Nucleic Acids Res., vol. 43, no. D1, pp. 345-356, 2014. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1214>
- [6] B. Rupp, "Biomolecular crystallography: principles, practice, and application to structural biology", Garland Science, 2009.
- [7] E. Hernández-Carvajal et al. "Producción heteróloga y caracterización bioquímica del procoagulante humano Factor VIII para ensayos de cristalización de macromoléculas proteicas", Tecnol. Marcha, vol. 29, no. 4, pp. 78-91, 2017.
<http://dx.doi.org/10.18845/tm.v29i4.3039>
- [8] A. Rath et al., "Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 106, no. 6, pp. 1760-1765, 2009. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813167106>
- [9] Y. Shi et al., "Abnormal SDS-PAGE migration of cytosolic proteins can identify domains and mechanisms that control surfactant binding", Protein Sci. vol. 21, no. 8, pp. 1197-1209, 2012. <https://doi.org/10.1002/pro.2107>
- [10] G. C. Lander, H. R. Saibil y E. Nogales. "Go hybrid: EM, crystallography, and beyond", Curr. Opin. Struct. Biol., vol. 22, no. 5, pp. 627-635, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2012.07.006>
- [11] A. P. Turnbull y P. Emsley, "Studying protein-ligand interactions using X-ray crystallography". Protein-Ligand Interactions: Methods and Applications, pp. 457-477, 2013. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-398-5_17
- [12] K. Nogami et al., "Thrombin-catalyzed activation of factor VIII with His substituted for Arg372 at the P1 site", Blood, vol. 105, no. 11, pp. 4362-4368, 2005. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-10-3939>

Evaluación de antioxidantes en el té de hojas de camote morado (*Ipomoea batatas* L.)




Antioxidant evaluation in the sweet potato purple (*Ipomoea batatas* L.) Leafs tea

Rebeca Cervantes-Sierra¹, Melquiades Barragán-Condori²,
Guadalupe Chaquilla-Quilca³

Fecha de recepción: 11 de diciembre de 2018
Fecha de aceptación: 14 de marzo de 2019

Cervantes-Sierra, R; Barragán-Condori, M; Chaquilla-Quilca,
G. Evaluación de antioxidantes en el té de hojas de camote
morado (*Ipomoea batatas* L.). *Tecnología en Marcha*. Vol. 32-
4. Octubre-Diciembre 2019. Pág 51-59.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i4.4790>

- 1 Estudiante, Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, Perú.
 <https://orcid.org/0000-0003-1770-1586>
- 2 Doctor en Ciencias. Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, Perú.
 <https://orcid.org/0000-0001-6666-1301>
- 3 Autor de correspondencia. Doctora en Ciencias. Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, Perú. Correo electrónico: gchaquilla@unamba.edu.pe.
 <https://orcid.org/0000-0002-4994-9888>



Palabras clave

Hojas de camote morado; antioxidantes; tés herbales; subproductos agroindustriales.

Resumen

Las hojas de camote morado (*Ipomoea batatas* L.) un subproducto de la agroindustria, son utilizadas principalmente en la alimentación animal, en algunos países asiáticos son consumidas como vegetales en ensaladas; una nueva alternativa de uso para estas hojas en nuestra región podría ser mediante bebidas tipo té, a fin de extraer compuestos bioactivos presentes en sus hojas. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante del té de hojas de camote morado (TCM), para ello se realizó una extracción acuosa a temperatura de ebullición de las hojas secas de camote morado proveniente del valle de Pachachaca, Abancay Apurímac-Perú, posteriormente se procedió a analizar, tomando como referencia al té verde comercial (TVC). Se determinó el contenido de Polifenoles totales por el método de Folin Ciocalteu, obteniéndose valores para TCM y TVC de 14.16 y 9.40 mg de GAE/g de hojas respectivamente. También se evaluó la actividad antioxidante por 2 métodos químicos; el primero mediante la Capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) con el ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS) obteniéndose 8.61 y 7.98 $\mu\text{mol Trolox/mL}$ en TCM y TVC respectivamente, demostrando estos resultados que el TCM presenta mayor poder bioactivo y capacidad antioxidante; así mismo se evaluó la TEAC con 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) reportando valores 25.16 y 25.63 $\mu\text{mol Trolox/g}$ para TCM y TVC, implicando estos resultados que el TCM presenta una capacidad antioxidante semejante al del TVC considerado por excelencia como bebida antioxidante. Se encontró además una correlación $r=0.9129$ entre polifenoles y antioxidantes.

Abstract

A purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves, a byproduct of agroindustry, mainly are used in animal feed, and also are consumed in salads as vegetable in Asian countries, a new use for these leaves in our region will be tea drinks, in order to extract bioactive compounds present in their leaves. The aim was to determine the phenolic compounds and antioxidant capacity the purple sweet potato leaves tea (TCM), an aqueous extraction at boiling temperature the dried leaves of purple sweet potato from Pachachaca valley Abancay-Apurímac, Perú was carried and analyzed, whit commercial green tea as a reference (TVC). The content of total polyphenols by Folin Ciocalteu was determined, obtaining 14.16 and 9.40 mg of GAE/ g leaves for TCM and TVC respectively. The antioxidant activity by two methods was evaluated, the first one through antioxidant capacity equivalent to Trolox (TEAC) with 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS), obtaining 8.61 and 7.98 $\mu\text{mol Trolox/mL}$ in TCM and TVC respectively, these result evidence that TCM exhibited better bioactive compounds and antioxidant capacity, likewise TEAC by 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) was evaluated reporting 25.16 and 25.63 $\mu\text{mol Trolox/g}$ for TCM an TVC, implying that TCM display an antioxidant capacity similar to TVC considered an antioxidant beverage by excellence. A correlation $r=0.9129$ between polyphenols and antioxidant was also found.

Keywords

Purple sweet potato leaves; antioxidant; herbal teas; agroindustrial by-products.

Introducción

Las hojas de camote (*Ipomoea batatas* L.) un subproducto de la agroindustria, ha sido utilizada como planta medicinal para enfermedades de la piel, también las hojas verdes son consumidas como vegetales en ensaladas en China [1], pero principalmente son utilizadas en la alimentación animal especialmente de cerdos ya sean frescas, secas o en ensilados debido a que presentan un considerable contenido de proteínas que van desde 25.5% BS. [2], hasta 37 mg/100 g BS, además que es una fuente de Vit C, β -carotenos, Hierro, Calcio, polifenoles y oxalatos, ya sea que se consuman frescas, secas o cocidas [3], también son ricas en carbohidratos, fibra dietaria, antioxidantes y otros micronutrientes deficientes en alimentos basados en el almidón, y que podrían balancear la dieta [4][5]. Diferentes estudios revelan que estas hojas son una fuente potencial de compuestos bioactivos [6] ya que poseen polifenoles y actividad antioxidante, como el reporte de un estudio en el que evaluaron extractos metanolicos de estas hojas, los mismos que contenían valores de fenoles totales de entre 2.78 a 5.35 g GAE/100 g BS [7], en otro estudio realizado en hojas de seis variedades de camote se obtuvieron 4.47 a 8.11 g GAE/100 g BS [8] también [1] reportaron 4.48 mg GAE/g BS en extractos con diferentes solventes; así mismo también [9] evaluó la actividad antioxidante en extractos etanolicos con DPPH reportando valores de 38.6 μ mol Trolox/gr BH.

Varias investigaciones evidencian el incremento de polifenoles y la capacidad antioxidante de plantas cuando estos son sometidos a una extracción acuosa a temperatura de ebullición en bebidas tipo té, o infusiones caso de cedrón [10] té verde [11], infusiones de hierbas de Brasil como té negro, té verde, mate, menta, manzanilla anís entre otros [12] y extractos de 34 cafés comerciales puros y mezclados en Panamá [13].

Una alternativa en nuestra región, para diversificar el uso de estas hojas, podría ser mediante bebidas tipo té, a fin de extraer los compuestos bioactivos potenciales presentes; por lo que el objetivo de éste trabajo fue determinar compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del té de hojas de camote morado en comparación con el té verde comercial.

Metodología

Muestras y reactivos

Las hojas de camote morado (*Ipomoea batatas* L.) provinieron del valle de Pachachaca Abancay Apurímac-Perú, una vez recolectadas fueron lavadas y secadas en una estufa a 65°C x 5 h y posteriormente almacenadas hasta su análisis (figuras 1 y 2),

Las hojas de té verde (*Thea sinensis* L.) de una marca comercial, fueron adquiridas en la ciudad del Cusco-Perú (figura 2).

Todos los reactivos fueron comprados de Merck (Darmstadt, Alemania) sede Perú.

Preparación del extracto

A ambas muestras se le realizó una extracción acuosa, con agua destilada a una relación 1:10, la cual se llevó a ebullición durante un minuto, se filtró, se aforó, se enfrió y se procedió a analizar a estos extractos sus componentes bioactivos.

Análisis de polifenoles totales (PFT)

La determinación de polifenoles totales en los extractos fue determinada por espectrofotometría, basado en la reacción colorimétrica de óxido-reducción del reactivo Folin-Ciocalteu, empleando ácido gálico para la preparación de la curva estándar y utilizando un espectrofotómetro UV/VIS Genesys 10S (Thermo Scientific) descrito por [14].



Figura 1. Hojas de camote morado (*Ipomea batatas* L.) frescas

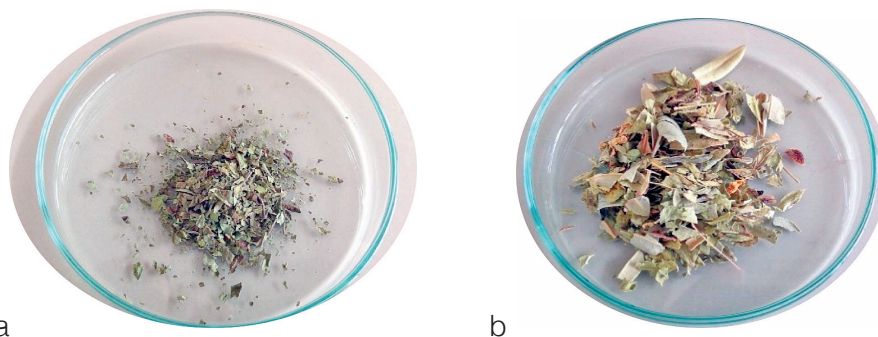


Figura 2. a) Hojas de camote morado (*Ipomea batatas* L.) secas; b) hojas de té verde (*Thea sinensis* L.) comercial secas.

Determinación de capacidad antioxidante TEAC ABTS

Esta determinación está basada en la reducción del radical ABTS* (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) por extractos que contienen compuestos antioxidantes utilizando como patrón el Trolox (ácido (±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxílico), de acuerdo a [15] con algunas modificaciones. Inicialmente, el radical ABTS es generado haciendo reaccionar una solución de ABTS 7 mM en agua con Persulfato de potasio 2.45 mM en oscuridad durante 12-16 h y cuya absorbancia de este reactante se ajustó 0.700 ± 0.02 a temperatura ambiente a una longitud de onda de 734 nm en un espectrofotómetro UV/VIS Genesys 10S (Thermo Scientific). Luego se agregan los extractos adecuadamente diluidos a la Solución ABTS* de modo que cuando se añaden 50 μL del extracto a 3 mL de solución ABTS*, daría una inhibición del 20-80% de absorbancia leída a 734 nm después de 10 minutos de agregada la muestra. La curva de calibración de Trolox se construyó midiendo la reducción en la absorbancia de la solución ABTS* a diferentes concentraciones de Trolox (0-2000 μM). La actividad antioxidante se midió comparando con la curva patrón de Trolox, cuyos resultados se expresan como equivalentes Trolox. TEAC ABTS ($\mu\text{mol Trolox/mL}$). Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado [16].

Determinación de Capacidad antioxidante TEAC DPPH

La determinación de la capacidad antioxidante, se realizó utilizando como patrón de referencia el Trolox, en donde los extractos y el estándar actuaron reduciendo el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). A 2.9 mL de solución de DPPH previamente ajustada a una absorbancia de 0.700, se le adicionó 100 μL del extracto acuoso o estándar, luego se agitó, se dejó incubar

por 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, luego se leyó en un espectrofotómetro UV/VIS Genesys 10S (Thermo Scientific) a 515 nm de longitud de onda. La calibración fue hecha con una solución de Trolox y la actividad antioxidante total fue expresada como micromoles de equivalentes Trolox por gramo de té. Utilizando etanol como blanco. Con respecto al radical DPPH se ha preparado a 50 µM en 100 mL y de esta solución se ajusta a una absorbancia de 0.9(± 0.02) con etanol [17][18].

Análisis estadístico

Los resultados se procesaron mediante un análisis de varianza y las medias fueron comparadas con la prueba de Tukey con una significancia de 0.05, utilizando el software estadístico INFOSTAT Versión 2011 [19] posteriormente se determinó el coeficiente de correlación de Pearson y el coeficiente de determinación.

Resultados y discusión

Determinación de Polifenoles totales

Los resultados de los análisis de contenido de polifenoles totales (PFT) se presentan en el cuadro 1. El contenido de polifenoles totales resultó 14.16 y 9.40 (mg de ácido gálico GAE/g) para el té de hojas de camote y el té verde respectivamente, el análisis estadístico muestra diferencias significativas entre los dos ($F=19.71$ $p=0.0113$). De acuerdo a éstos resultados el té de hojas de camote presenta mayor contenido de polifenoles totales frente al té verde comercial.

En un estudio similar se analizaron extractos acuosos a 90°C de 34 muestras de café comercial puro y mezclado en Panamá, encontrando valores para café mezclado en un rango de 11.17 a 16.10 mg GAE/g [13], también se evaluaron infusiones o tés de diferentes plantas en Brasil (té negro, té verde, infusión de mate, menta, manzanilla, anís, hinojo entre otros) resultando que el contenido de fenoles fue desde no determinado hasta 46.6 mg GAE/g de muestra [12], por otro lado se evaluó un extracto acuoso de hojas de maracuyá a temperatura de ebullición obteniéndose 8.3 mg GAE/g [20], nuestros resultados coinciden e incluso están por encima de estos resultados, lo que sería un indicador que el té de hojas de camote morado es una excelente fuente de polifenoles totales.

Cuadro 1. Contenido de polifenoles totales (mg GAE /g)

MUESTRA	PFT (mg GAE/g)*
TÉ DE CAMOTE	14.16 ± 1.63 ^a
TÉ VERDE	9.40 ± 0.67 ^b

*Los datos son el promedio de tres repeticiones. Letras iguales corresponden a grupos similares de acuerdo al análisis de medias (Tukey, $p<0.05$).

Determinacion de Capacidad Antioxidante TEAC ABTS

Los resultados de la capacidad antioxidante equivalente Trolox TEAC ABTS, se muestran en el cuadro 2. En la evaluación se obtuvo 8.61 y 7.98 ($\mu\text{mol Trolox/mL}$) para el té de hojas de camote y el té verde respectivamente, El análisis estadístico indica diferencias significativas entre las muestras ($F=50.70$ $p=0.0021$), lo cual demuestra que el té de hojas de camote es significativamente mayor frente al té verde en cuanto a su capacidad antioxidante; en un estudio similar se evaluó la capacidad antioxidante de infusiones comerciales de hierbabuena, limón, manzanilla, árnica, boldo y té verde obteniendo resultados en un rango de 0.55 - 4.90($\mu\text{mol Trolox/mL}$) [21], por otro lado también se evaluaron 13 muestras de tés herbales entre ellas boldo, rosa mosqueta y baylahuen presentando de 152 a 1056 $\mu\text{mol eq.Tx/150 mL}$ (1.01 a 7.04 $\mu\text{mol eq.Tx/mL}$) [22], de acuerdo a estos resultados el té de hojas de camote morado presentaría una buena actividad antioxidante, indicando su potencial actividad antioxidante.

Cuadro 2. Capacidad antioxidante TEAC ABTS ($\mu\text{mol Trolox/mL}$)

MUESTRA	TEAC ABTS ($\mu\text{mol Trolox/mL}$)*	% Inhibición
TÉ DE CAMOTE	8.61 \pm 0.06 ^a	75.78 \pm 0.27
TÉ VERDE	7.98 \pm 0.14 ^b	72.08 \pm 0.75

*Los datos son el promedio de tres repeticiones. Letras iguales corresponden a grupos similares de acuerdo al análisis de medias (Tukey, $p<0.05$).

Determinacion de Capacidad Antioxidante TEAC DPPH

Los resultados de la capacidad antioxidante equivalente Trolox TEAC DPPH, se presentan en el cuadro 3. Obteniendo resultados de 25.16 y 25.63 ($\mu\text{mol Trolox/g}$) en el té de camote y té verde respectivamente, El análisis estadístico muestra que no existen diferencias entre ambas muestras ($F=1.86$ $p=0.2446$), lo que indica que la capacidad antioxidante en el té de hojas de camote es muy similar al té verde, con porcentajes de inhibición de los extractos de 68 y 69 % frente al radical libre DPPH demostrando su similitud. En un estudio se ha determinado la actividad antioxidante en muestras de extractos acuosos de 34 tipos de café puros y mezclados comerciales de Panamá encontrándose para 16 tipos de café mezclados una actividad antioxidante de 0.025 a 0.060 mmol de equivalente Trolox (TE)/g (25 a 60 $\mu\text{mol Trolox/g}$) con DPPH [13] encontrándose nuestros resultados dentro de ese rango; así mismo se han analizado extractos acuosos de siete plantas medicinales de la familia de *Lamiaceae* entre ellas orégano, menta, tomillo, salvia, romero etc., obteniendo una actividad antioxidante de 6.05 a 9.92 $\mu\text{mol Trolox/g}$ con DPPH [23], estos resultados nos llevan a inferir que el té de camote morado presentaría considerable efectividad antioxidante similar al del té verde.

Existen muchos estudios que utilizan el método TEAC DPPH para determinar la capacidad antioxidante de compuestos puros y extractos de plantas, pero es difícil compararlos con nuestros resultados porque se aplican diferentes condiciones de estudio y análisis [24].

Cuadro 3. Capacidad antioxidante TEAC DPPH ($\mu\text{mol Trolox/g}$)

MUESTRA	TEAC DPPH ($\mu\text{mol Trolox/g}$)*	% Inhibición
TÉ DE CAMOTE	25.16 \pm 0.13 ^a	68.63 \pm 0.34
TÉ VERDE	25.63 \pm 0.58 ^a	69.88 \pm 1.55

*Los datos son el promedio de tres repeticiones. Letras iguales corresponden a grupos similares de acuerdo al análisis de medias (Tukey, $p<0.05$).

Correlación de Pearson entre polifenoles totales y la actividad antioxidante TEAC-ABTS.

Para probar si existe correlación entre polifenoles totales y la capacidad antioxidante TEAC ABTS, se ha determinado la correlación de Pearson, observándose una correlación significativa (figura 3) con un coeficiente de correlación $r=0.9129$ y un coeficiente de determinación $r^2=0.8334$, lo que demuestra que a mayor contenido de polifenoles presentes en los productos se tiene mayor capacidad antioxidante.

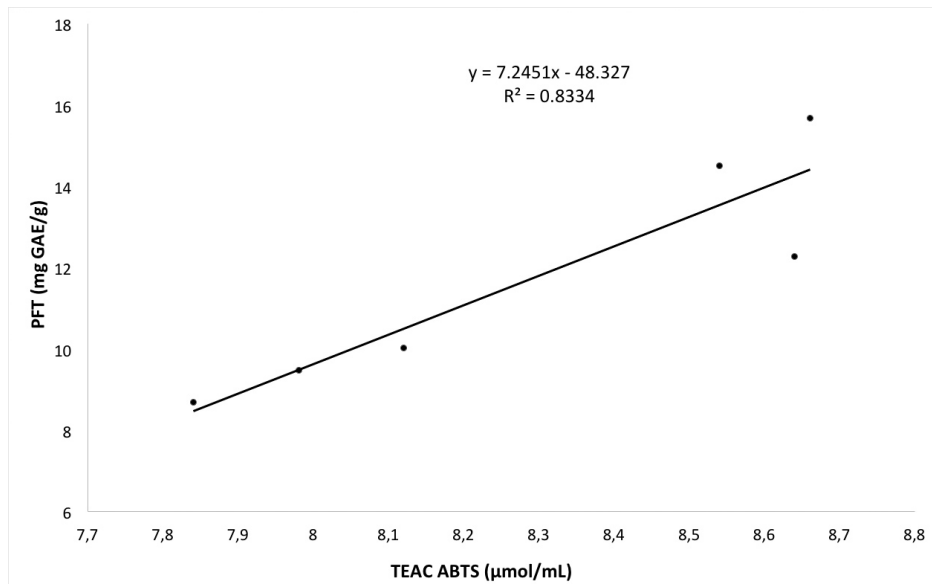


Figura 3. Correlación lineal entre polifenoles totales y actividad antioxidante TEAC-ABTS

Conclusiones

El té de hojas de camote morado frente al té verde, presentó actividad antioxidante efectiva por el contenido de polifenoles totales, así como por la prueba analítica del TEAC ABTS, en el caso de la capacidad antioxidante TEAC DPPH ambos presentaron similitudes, demostrando que es un producto con alto poder bioactivo, lo que implica su mayor poder antioxidante, cercano y/o similar al té verde, aunque esto podría potenciarse mejorando las condiciones y tiempos de extracción.

La correlación de Pearson indica una alta correlación entre valores de polifenoles y actividad antioxidante por TEAC ABTS.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac por las facilidades brindadas para la ejecución de este trabajo de investigación, y al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac por el apoyo en su difusión.

Referencias

- [1] A. Sani, W.O. Abdullah, T. Juhana, and M.A. Elkadi "Extraction, characterization and total phenolic content of local (Malaysian) green sweet potato (*Ipomoea batatas*) leaves". *International Journal of Science Commerce and Humanities*, vol. 2, n° 5, pp. 175-182, 2014.
- [2] L.V. An, "Sweet potato leaves for growing pigs: Biomass yield, digestion and nutritive value". Doctor's dissertation. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2004. ISSN 1401-6249, ISBN 91-576-6750-0.
- [3] A.W. Mwanri, "The potential of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves in contribution to vitamins and minerals in the diet of children in Tanga-Tanzania", Thesis Degree of Masters of Science in Applied Human Nutrition of the University of Nairobi, Kenya, 2003.
- [4] G. Nkongho, A. Achidi, N. Ntonifor, N. Numfor, B. Dyinga, L. Jackai and C. Bonsi, "Sweet potatoes in Cameroon: Nutritional profile of leaves and their potential new use in local foods", *African Journal of Agricultural Research*, vol. 9, n° 18, pp. 1371-1377, 2014 DOI 10.5897/AJAR2014.8611.
- [5] H. Sun, T. Mu, L. Xi, M. Zhang and J. Chen, "Sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves as nutritional and functional foods", *Food Chemistry*, vol.156, pp. 380-389, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.079>
- [6] M. Islam, M. Yoshimoto, N. Terahara and O. Yamakawa, "Anthocyanin compositions in sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaves", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol.66, n°11, pp. 2483-2486, 2002.
- [7] S.M. Hue, A.N. Boyce and Ch. Somasundram, "Antioxidant activity, phenolic and flavonoid contents in the leaves of different varieties of sweet potato (*Ipomoea batatas*)" *Australian Journal of Crop Science*, vol. 6, n° 3, pp. 375-380, 2012.
- [8] A. Ghasemzadeh, V. Omidvar and H.Z.E. Jaafar, "Polyphenolic content and their antioxidant activity in leaf extract of sweet potato (*Ipomoea batatas*)", *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 6, n° 15, pp. 2971-2976, 2012. DOI: 10.5897/JMPR011.1353
- [9] V.D. Truong, R.F. Mcfeeters, R.T. Thompson, L.L. Dean and B.Shofran, "Phenolic acid content and composition in leaves and roots of common commercial sweetpotato (*Ipomea batatas* L.) cultivars in the United States", *Journal Of Food Science*, vol. 72, n° 6, pp. 343-349, 2007. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00415.x
- [10] J. Ramírez-Godínez, J. Jaimez-Ordaz, J. Añorve-Morga, V. Salazar-Pereda, Castañeda-Ovando, G. González-Olivares y E. Contreras-López, "Determinación de actividad antioxidante en extractos acuosos de cedrón (*Aloysia triphylla*)" *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, vol. 1, pp. 824-829, 2016.
- [11] V. V. Melchor-Sandoval, "Procesamiento tecnológico para la obtención de té verde (*Camellia sinensis*): Determinación de su actividad antioxidante y cuantificación de flavanoles por HPLC". Tesis de licenciatura Facultad de Industrias Alimentarias Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María, Perú, 2002.
- [12] R.A. Moraes-de-Souza, T.L.C. Oldoni, M.A.B. Regitano-d'Arce, S.M. Alencar, "Actividad antioxidante y compuestos fenólicos en infusiones herbarias consumidas en Brasil", *Cienc. Tecnol. Aliment.* vol. 6, n° 1, pp. 41-47, 2008.
- [13] A. Vega, J.A. De León y S.M. Reyes, "Determinación del contenido de polifenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante de 34 cafés comerciales de Panamá", *Información Tecnológica*, vol. 28, n° 4, 2017. doi: 10.4067/S0718-07642017000400005
- [14] V.L. Singleton, R. Orthofer, and R.M. Lamuela-Raventos "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu reagent" *Methods in enzymology*, vol. 299, pp. 152-178, 1999.
- [15] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical action decolorization assay". *Free radical biology and medicine*, vol. 26, n° 9, pp. 1231-1237, 1999.
- [16] N. Razali, R. Razab, S.M. Junit, and A.A. Aziz, "Radical scavenging and reducing properties of extracts of cashew shoots (*Anacardium occidentale*)", *Food chemistry*, vol. 111, n° 1, pp. 38-44, 2008.
- [17] D. M. Juli-Mamani y E. Arias-Jordán, "Antocianinas polifenoles totales y capacidad antioxidante en dos clones de papa nativa del género *Solanum* de pulpa azul y roja". Tesis de licenciatura Facultad de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, Sicuani-Cusco, Perú, 2011.
- [18] M. Barragán-Condori, y Aro Aro, J. M., "Determinación del efecto de procesos de cocción en papas nativas pigmentadas (*Solanum tuberosum* spp. andígena) sobre sus compuestos bioactivos", *Revista de Investigaciones Altoandinas*, vol. 19, pp. 47-52, 2017. <http://dx.doi.org/10.18271/ria.2017.254>
- [19] J. A. Di Rienzo, F. Casanoves, M. G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada y C. W. Robledo, INFOSTAT, 2011.
- [20] J. K. da Silva, C.B. Betim-Cazarin, T. C. Colomeu, Â.G. Batista, L.M.M. Meletti, J.A. Rizzato-Paschoal, S. Bogusz-Júnior, M. Fontes-Furlan, F.G. Reyes-Reyes, F. Augusto, M. R. Maróstica-Júnior, and R. de Lima-

- Zollner "Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: In vitro and in vivo study" *Food Research International*, vol. 53, pp. 882-890, 2013.<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.043>
- [21] E. E. Muñoz-Velázquez, K. Rivas-Díaz, M. G. F. Loarca-Piña, S. Mendoza-Díaz, R. Reynoso-Camacho y M. Ramos-Gómez, "Comparación del contenido fenólico, capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria de infusiones herbales comerciales" *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, vol. 3, n° 3, pp. 481-495, 2012.
- [22] H. Speisky, C. Rocco, C. Carrasco, E. A. Lissi and C. López-Alarcón, "Antioxidant Screening of medicinal herbal teas" *Phytotherapy research*,<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16619353> vol. 20, n° 6, pp. 462-467, 2006. DOI:10.1002/ptr.1878
- [23] N. Gougoulis and N. Mashev, "Antioxidant activity and polyphenols content of some herbal teas of *Lamiaceae* family from Greece and Bulgaria" *Oxidation Communications* vol. 38, n°1, pp. 25-34, 2015.
- [24] V.G. Hartwig, L.A. Brumovsky, R.M. Fretes, L. and Sánchez-Boado, "A novel procedure to measure the antioxidant capacity of *yerba maté* extracts", *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, vol. 32, n° 1, pp. 126-133, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612012005000022>.

Simulación de gasificación de biomasa enriquecida con hidrocarburos

Simulation of gasification of hydrocarbons-enriched biomass

Andrey Caballero-Chavarría¹, Maybi Patricia Rojas-Soto²,
Melissa María Villalobos-Barquero³, Alexander Davis-Barquero⁴,
Carlos Roldan-Villalobos⁵, Róger Moya⁶, Allen Puente-Urbina⁷


Fecha de recepción: 21 de diciembre de 2018

Fecha de aceptación: 3 de abril de 2019

Caballero-Chavarría, A; Rojas-Soto M; Villalobos-Barquero, M; Davis-Barquero, A; Roldán-Villalobos, C; Moya, R; Puente-Urbina, A. Simulación de gasificación de biomasa enriquecida con hidrocarburos. *Tecnología en Marcha*. Vol. 32-4. Octubre-Diciembre 2019. Pág 60-68.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i4.4791>

1 Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos (CEQIATEC), Escuela de Química, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: acaballero@tec.ac.cr.

 <https://orcid.org/0000-0002-5584-8821>

2 Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos (CEQIATEC), Escuela de Química, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: mayros06@gmail.com.


 <https://orcid.org/0000-0001-8685-9315>

3 Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos (CEQIATEC), Escuela de Química, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: melivillabar1593@gmail.com.

4 Escuela Ingeniería Química, Universidad de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: alexdavisb@gmail.com.

5 Escuela de Química, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: croidan@tec.ac.cr.

6 Escuela de Ingeniería Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: rmoya@tec.ac.cr.

 <https://orcid.org/0000-0002-6201-8383>

7 Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos (CEQIATEC), Escuela de Química, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: apuente@tec.ac.cr.

 <https://orcid.org/0000-0001-5328-2142>



Palabras clave

Energía alternativa; gasificación; biomasa; residuos; simulación de procesos.

Resumen

La gasificación es un proceso termoquímico en el que materias primas orgánicas se convierten en gases que contienen H_2 y CO (gas de síntesis), los cuales pueden utilizarse para obtener productos como electricidad, combustibles y otras sustancias químicas. El proceso se encuentra influenciado por características propias del sistema donde se desarrolla la conversión térmica, las condiciones de operación y las materias primas empleadas. Se simuló un proceso de gasificación de biomasa enriquecida con hidrocarburos en el que los gases generados son aprovechados para generación eléctrica, con tal de evaluar el uso de dichas materias primas. Se empleó un modelo de gasificación no estequiométrico, la ecuación de estado de Peng-Robinson, así como reacciones de gasificación conocidas. Se consideró un gasificador de corriente descendente trabajando con 22 kg/h de alimentación de mezcla 3:1 biomasa:hidrocarburos, 20 kg/h de aire (agente gasificante), 1 atm de presión absoluta y temperatura de gasificación de 900-1000°C. Los gases generados se componen de 27,44 % H_2 , 39,79 % CO; 5,73 % CH_4 ; 0,1 % CO_2 y 27,01 % N_2 . La potencia neta del gasificador es 27,82 kW y el consumo de la mezcla 3:1 biomasa:hidrocarburos 0,79 kg/kWh. La adición de hidrocarburos a biomasa mejora las características del gas de síntesis obtenido y disminuye los requerimientos de materia prima para el funcionamiento del gasificador. La mezcla 3:1 biomasa:hidrocarburos es adecuada para el desempeño del proceso, permitiendo aprovechar residuos que de otra manera tendrían que ser dispuestos y tratados, generando beneficios energéticos, ambientales y económicos.

Keywords

Alternative energy; gasification; biomass; waste; process simulation.

Abstract

Gasification is a thermochemical process in which organic raw materials are converted into gases containing H_2 and CO (syngas), which can be used to obtain products such as electricity, fuels and other chemicals. It is influenced by characteristics of the system where the thermal conversion takes place, the operating conditions and the raw materials used. It was simulated a process of gasification of hydrocarbons-enriched biomass in which the gases generated are used for electricity generation, to evaluate the use of such raw materials. A non-stoichiometric gasification model, the Peng-Robinson equation of state as well as known gasification reactions were used. A downdraft gasifier was considered working with 22 kg/h of mix feed 3:1 biomass: hydrocarbons, 20 kg/h of air (gasifying agent), 1 atm of absolute pressure and gasification temperature of 900-1000 °C. The gases generated are composed of 27.44 % H_2 , 39.79 % CO, 5.73 % CH_4 , 0.1 % CO_2 and 27.01 % N_2 . The net power of the gasifier is 27.82 kW and the consumption of the mixture 3:1 biomass:hydrocarbons 0.79 kg/kWh. The addition of hydrocarbons to biomass improves the characteristics of the syngas obtained and reduces the raw material requirements for the operation of the gasifier. The mixture 3:1 biomass:hydrocarbons is adequate for the performance of the process, allowing to take advantage of wastes that otherwise would have to be disposed of and treated, generating energy, environmental and economic benefits.

Introducción

Las sociedades modernas presentan retos importantes relacionados con una demanda energética creciente y un aumento en las emisiones de gases de efecto invernadero debido al uso de combustibles fósiles [1]. Unido a esto, diversas actividades humanas generan cantidades importantes de residuos sólidos que, de no ser gestionados adecuadamente, provocan contaminación ambiental (en aire, agua y suelo), así como proliferación de vectores que producen enfermedades [2]. Tal situación ha impulsado el desarrollo de tecnologías que permitan el aprovechamiento energético de residuos, dado a que buscan utilizar eficientemente los recursos disponibles y además disminuir el impacto en el ambiente [3, 4].

Una de las maneras de aprovechamiento de residuos sólidos para fines energéticos es por medio de procesamientos térmicos, que incluyen procesos tales como combustión, gasificación, pirólisis y carbonización hidrotérmica, entre otros [5, 6]. Dentro de estos, la gasificación es un tipo de proceso termoquímico que permite obtener gases, los cuales luego de transformaciones específicas son capaces de generar productos tales como electricidad, combustibles y otras sustancias químicas [7]. Dicho proceso se encuentra influenciado por características propias del sistema donde se desarrolla la conversión térmica, las condiciones de trabajo y las materias primas empleadas [8]. Se requiere un sustrato carbonoso, en este caso los residuos, el cual debe calentarse a temperaturas típicamente mayores a 800 °C en presencia de un agente gasificante (aire, oxígeno, CO₂, entre otros), generando mezclas con diferentes composiciones que incluyen CO y H₂ (gas de síntesis o syngas), CH₄, CO₂, N₂, entre otros [7, 8].

Dentro de los materiales que se pueden emplear como material de alimentación a un sistema de gasificación se encuentran biomazas lignocelulósicas residuales y residuos de hidrocarburos. Dichas materias primas deben presentar características de humedad, tamaño y flujo que permitan una operación adecuada del reactor empleado y generen productos con composiciones y poderes caloríficos adecuados [9]. Otras características de los materiales de partida incluidos en un análisis proximal, así como la composición elemental y las condiciones de operación del sistema (presión, temperatura, flujos del material de entrada y agente gasificante, entre otras) definen en gran medida los productos obtenidos [10-12].

Una de las maneras de conocer la influencia de las diferentes variables en la gasificación es mediante su simulación. Diferentes tipos de modelos pueden ser empleados, cuya aplicabilidad dependerá en gran medida de la información disponible. Dentro de estos, destaca un modelo no estequiométrico que busca la minimización de la energía libre de Gibbs (estado de equilibrio), con lo cual es posible obtener la composición de los gases de salida [10, 11, 13]. Tal información puede ser integrada con el resto de operaciones unitarias, permitiendo una descripción del proceso completo y sus limitaciones, lo cual resulta valioso para diseño, mejoramiento y optimización de procesos de gasificación [14].

En este estudio, se presenta la simulación de un proceso de gasificación en el cual los gases generados son aprovechados para generación eléctrica. El objetivo del trabajo es evaluar el uso de biomazas enriquecidas con hidrocarburos mediante el desempeño del proceso.

Materiales y Métodos

Materia prima y sistema de gasificación

La materia prima seleccionada es una mezcla de biomasa con hidrocarburos (3:1 biomasa:hidrocarburos), cuya composición se calculó a partir de sus constituyentes individuales. Se tomó como referencia el sistema de gasificación comercial Power Pallet PP20 de All Power Labs (gasificador de corriente descendente) [15].

Simulación del proceso de gasificación

Las simulaciones relacionadas con el proceso de gasificación seleccionado se basan en los reportes de Caballero-Chavarría [10] y Rojas-Soto [11]. Se utilizó el programa computacional Aspen Hysys V8 (Aspen Tech), considerando balances de masa y energía, así como equilibrio químico.

El proceso simulado se basa en la gasificación de la biomasa enriquecida con hidrocarburos en presencia de aire como agente gasificante (aire normalizado, libre de humedad) seguida del acondicionamiento de los gases producidos y su combustión para generación eléctrica. Se empleó un modelo de gasificación no estequiométrico y la ecuación de estado de Peng-Robinson, así como las reacciones de gasificación y combustión reportadas por Basu [8]. Se usaron las siguientes condiciones de operación: 22 kg/h de alimentación, 20 kg/h de aire (agente gasificante), 1 atm de presión absoluta y temperatura de gasificación de 900-1000 °C.

Resultados y discusión

Con tal de establecer los lineamientos legales para la gestión integral de residuos y el uso eficiente de los recursos, Costa Rica aprobó en 2010 la Ley para la Gestión Integral de Residuos (Ley N° 8839) [16]. Esta contempla el aprovechamiento energético como una alternativa cuando evitar, reducir, reutilizar o recuperar materiales no es factible, por encima además de tratar y disponer dichos residuos [16]. Dentro de los residuos aprovechables energéticamente destacan las biomásas residuales y los residuos de hidrocarburos [10-12]. Cantidades importantes de biomásas residuales son producidas en Costa Rica debido a actividades agrícolas y agroindustriales, donde ca. 40,3 % no son aprovechadas [4]. Por su parte, residuos de hidrocarburos son residuos peligrosos generados en organizaciones con actividades relacionadas con la manipulación de combustibles, los cuales cuentan con altos contenidos energéticos [12]. Esto hace que resulte atractivo el aprovechamiento energético de biomásas residuales enriquecidas con hidrocarburos.

La materia prima considerada para este estudio es biomasa enriquecida con hidrocarburos. En este tipo de mezclas, el potencial energético aumenta con respecto a las biomásas individuales. Caballero-Chavarría [10] reporta un incremento de 42 % en el poder calorífico de mezclas de pasto con residuos de hidrocarburos. Por otro lado, la composición del material de partida resulta importante ya que afecta la composición de los gases producidos en procesos de gasificación. Dentro de las reacciones involucradas, el principal componente que se emplea como reactivo es el carbono. Al incorporar hidrocarburos a la biomasa, se incrementa la cantidad de carbono y compuesto volátiles, con lo que se favorece la formación de productos deseados (CO , CH_4 , H_2) [8]. El cuadro 1 presenta la composición de la materia prima de trabajo calculada a partir de sus constituyentes individuales. Esta se empleó para establecer la línea de alimentación en la simulación y así obtener un flujo adecuado de gas de síntesis capaz de generar una cantidad suficiente de energía [10].

Las simulaciones se basan en el uso de un gasificador comercial de corriente descendente [15]. Este cuenta con alimentación superior para el combustible (biomasa enriquecida con hidrocarburos), alimentación lateral para el agente gasificante (aire) y salida de los productos en su parte inferior. Diferentes procesos son llevados en diferentes alturas del reactor, incluyendo secado y pirólisis por encima de la alimentación de aire, oxidación alrededor de la entrada de aire y reducción por debajo de esta [8]. El flujo de alimentación de biomasa con hidrocarburos (22 kg/h), la presión de trabajo (presión absoluta de 1 atm) y la temperatura de gasificación (900-1000 °C) se seleccionaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La cantidad de agente gasificante se calculó para tener un proceso de gasificación adecuado. Esta se encuentra definida por la razón de equivalencia definida como:

Cuadro 1. Composición calculada para una mezcla de biomasa con hidrocarburos (3:1 biomasa:hidrocarburos) [17-19]

Componente	Porcentaje (% m/m)
C	56,25
H	6,86
O	36,0
S	0,2
N	0,3
Cenizas	1,3
Agua	10

$$RE = \frac{(A/C)_e}{(A/C)_e} \quad (1)$$

donde RE es la razón de equivalencia, $(A/C)_e$ la relación real aire-combustible y $(A/C)_e$ la relación estequiometría aire-combustible (para producir combustión completa). RE debe estar entre 0,2 y 0,4 para lograr un proceso de gasificación eficiente [10]. Basu [8] recomienda un valor de RE de 0,25 para gasificaciones en reactores de corriente descendente, con el cual favorece la generación de H_2 y CO (gas de síntesis), y evita la formación de carbonilla, CO_2 y H_2O . $(A/C)_e$ se puede estimar como:

$$(A/C)_e = 8,89 * (C + 0,375 * S) + 26,5 * H - 3,3 * O \quad (2)$$

donde C, S, H y O se relacionan con la composición elemental de carbono, azufre, hidrógeno y oxígeno en la materia prima de alimentación. Considerando las ecuaciones (1)-(2), la composición elemental (cuadro 1) de la mezcla de biomasa con hidrocarburos y su flujo másico de alimentación (22 kg/h), el flujo de aire calculado y empleado en la simulación fue 20 kg/h.

El gasificador considerado (de corriente descendente) permite un flujo continuo de producción de gas de síntesis, es capaz de procesar materias primas con altos contenidos de humedad, generalmente tiene diseño simple y es de bajo costo. Por otro lado, la calidad energética del gas que se obtiene con este tipo de reactores es baja, su eficiencia se ve limitada al trabajar a presión atmosférica y genera grandes cantidades de cenizas [8, 9, 20]. Sin embargo, temperaturas de 900-1000 °C favorecen la conversión sin fundir cenizas (evitando problemas operativos) y se generan gases con bajos contenidos de alquitranes que pueden ser utilizados en motores de combustión interna y turbinas de gas [10]. Además, el uso de aire como agente gasificante y presión atmosférica permiten mantener bajos costos de operación, lo cual es recomendable para sistemas de baja potencia como el gasificador propuesto [21].

El proceso simulado y los elementos usados se describen en la figura 1 y el cuadro 2. La utilización de un modelo de gasificación termodinámico no estequiométrico resulta ventajoso ya que puede llevarse a cabo su simulación conociendo la composición elemental de la alimentación y las condiciones de operación. A pesar de considerarse como un sistema en equilibrio (que genera el máximo rendimiento) en el que no se toman en cuenta aspectos como la fórmula química del material de alimentación, los mecanismos de reacción o las rapidezces de reacción, se ha demostrado que este tipo de modelos permiten predecir de manera razonable

el rendimiento y la composición de los gases producidos, dando la posibilidad de estimar otras propiedades de interés como su poder calorífico [22-24]. Adicionalmente, usando la ecuación de estado de Peng-Robinson, se determinaron otras características físicas del proceso tales como presión y temperatura en diferentes etapas.

Los principales datos obtenidos de la simulación se muestran en el cuadro 3. Couto y colaboradores [21] reportan gas de síntesis obtenido experimentalmente alimentando biomasa en un gasificador de corriente descendente con 15-21 % de H₂, 10-22 % de CO, 1-5 % de CH₄, 11-13 % de CO₂ y el resto N₂ y pequeñas cantidades de otros hidrocarburos. Comparativamente, la simulación muestra mayores porcentajes de CO, H₂ y CH₄, así como menor porcentaje de CO₂. Sin embargo, debe considerarse que las condiciones experimentales son distintas (incluyendo la composición de la materia prima, presión, temperatura, la relación de equivalencia aire-combustible) además que la simulación asume sistemas en equilibrio cuando en realidad podrían presentarse procesos incompletos si los tiempos de residencia son cortos.

Las cantidades de materias primas necesarias por unidad de energía, calculadas a partir de la potencia neta del gasificador obtenida de la simulación y las características de la alimentación (flujo y composición), se presentan en el cuadro 3. Los consumos de la mezcla biomasa:hidrocarburos y biomasa son inferiores al consumo de biomasa reportado por el fabricante del gasificador considerado (1,2 kg/kWh) [15]. Esto puede atribuirse tanto al efecto del enriquecimiento de la biomasa de partida al adicionar hidrocarburos, como al hecho de considerar un proceso idealizado durante la simulación [10, 11].

A pesar de las diferencias que puedan presentarse entre simulaciones y resultados experimentales, procesos de simulación como el presentado en este estudio permiten obtener información valiosa sobre el desempeño de procesos de gasificación llevados a cabo en diferentes condiciones. Esto hace que las simulaciones sean herramientas importantes para diseño, predicción y mejoramiento de dichos procesos, así como un excelente complemento para información experimental e insumo para estimaciones económicas para implementación de proyectos [10, 11].

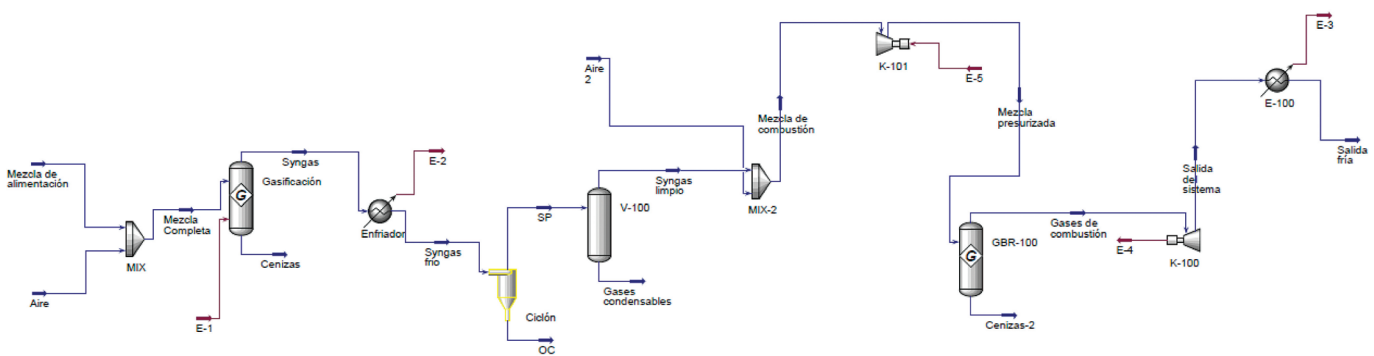


Figura 1. Esquema de simulación del proceso de gasificación empleando como materia prima la mezcla de hidrocarburos con biomasa. Basado en esquemas presentados por Caballero-Chavarría [10] y Rojas-Soto [11].

Cuadro 2. Descripción de elementos usados en simulación con Aspen Hysys [10, 11]

Elementos	Ejemplo de elemento en esquema	Funciones generales	Funciones específicas
Mezcladores (MIX y MIX-2)		Mezclar dos líneas de entrada.	MIX: mezclar la alimentación de materia prima (biomasa enriquecida con hidrocarburos) y el agente gasificante (aire). MIX-2: mezclar gas de síntesis (luego de proceso de limpieza) y aire, generando la mezcla de combustión.
Reactor Gibbs (G y GBR-100)		Llevar a cabo un sistema de reacciones buscando el estado de menor energía libre de Gibbs y garantizando las condiciones de operación necesarias.	G: llevar a cabo el proceso de gasificación con todas sus etapas involucradas. GBR-100: llevar a cabo la combustión de mezcla presurizada (mezcla de gas de síntesis luego de proceso limpieza y aire sometida a proceso de compresión).
Intercambiadores (Enfriador y E-100)		Intercambiar energía en porciones específicas del proceso.	Enfriador: disminuir la temperatura de los gases producidos en el gasificador (gas de síntesis) para evitar problemas de operación en los equipos complementarios (ciclón y columnas de limpieza). E-100: disminuir la temperatura de los gases de salida de combustión luego de expansión.
Ciclón		Separar las partículas que se presentan en los gases producidos en el gasificador (gas de síntesis).	Ciclón: limpiar gases producidos en el gasificador (gas de síntesis).
Columna separadora (V-100)		Reducir la presencia de gases condensables que pueden interferir en la combustión del gas de síntesis.	V-100: limpiar el gas de síntesis previamente tratado en el ciclón.
Compresor (K-101)		Comprimir mezcla de gas de síntesis luego de proceso limpieza y aire.	K-101: presurizar la línea de entrada al reactor de combustión.
Expansor (K-100)		Permite simular la función de una turbina y así obtener la potencia del sistema.	K-100: expandir los gases de combustión.

Cuadro 3. Resultados de simulación de un proceso de gasificación*

Variable evaluada	Resultado
Flujo de salida de gas de síntesis	41,76 kg/h
Composición de gas de síntesis	H ₂ : 27,44 % CO: 39,79 % CH ₄ : 5,73 % CO ₂ : 0,1 % N ₂ : 27,01 %
Potencia producida del generador	56,32 kW
Potencia consumida por el compresor	28,50 kW
Potencia aprovechable intercambiador	81,67 kW
Potencia neta del gasificador	27,82 kW
Consumos en alimentación	3:1 biomasa:hidrocarburos: 0,79 kg/kWh Biomasa: 0,59 kg/kWh Hidrocarburos: 0,20 kg/kWh

* Condiciones: gasificador de corriente descendente, 22 kg/h de alimentación de biomasa enriquecida con hidrocarburos (3:1 biomasa:hidrocarburos), 20 kg/h de aire (agente gasificante), 1 atm de presión absoluta y temperatura de gasificación de 900-1000 °C

Conclusiones

- La simulación propuesta permite obtener información relevante para la evaluación del desempeño del proceso de gasificación con las condiciones de trabajo y materias primas utilizadas.
- El gas de síntesis obtenido cuenta con una composición adecuada y un bajo contenido de alquitranes que permiten su uso en dispositivos para transformar su energía química en energía mecánica y posteriormente energía eléctrica.
- La adición de hidrocarburos a biomasa permite mejorar las características del gas de síntesis obtenido y con esto disminuir los requerimientos de materia prima para el funcionamiento del gasificador.
- La mezcla de hidrocarburos y biomasa es adecuada para el desempeño del sistema de gasificación, lo cual permite aprovechar energéticamente residuos que de otra manera tendrían que ser dispuestos y tratados, generando beneficios energéticos, ambientales y económicos.
- El uso de simulaciones permite obtener información sobre el desempeño de procesos de gasificación llevados a cabo en diferentes condiciones, que puede servir de guía para el diseño, predicción y mejoramiento de dichos procesos.

Agradecimientos

A. Caballero-Chavarría, M. M. Villalobos-Barquero y A. Puente-Urbina agradecen a Paola Orozco Ballester, Rodrigo González Rojas y Daniel Carmona Arias de RECOPE S.A., Jaime Quesada Kimzey del Instituto Tecnológico de Costa Rica y Emanuel Montero Gómez del CICAPE por valiosas discusiones.

Referencias

- [1] World Energy Outlook 2018. International Energy Agency, 2018.
- [2] M. D. L. Pérez, Manual. Identificación de Residuos Industriales (UF0287). Certificados de Profesionalidad. Gestión de Residuos Urbanos e Industriales (SEAG0108). Editorial CEP, S.L., 2017.
- [3] J. G. Speight, *The Chemistry and Technology of Petroleum*. Boca Raton: CRC press, 2014.
- [4] F. Ramírez, E. Carazo, C. Roldán, and G. Villegas, "Encuesta de oferta y consumo energético nacional a partir de la biomasa en Costa Rica," Dirección Sectorial de Energía, San José, 2007.
- [5] E. C. Rada, *Thermochemical Waste Treatment: Combustion, Gasification, and Other Methodologies*. CRC Press, 2017.
- [6] M. Verma, S. Godbout, S. K. Brar, O. Solomatnikova, S. P. Lemay, and J. P. Larouche, "Biofuels production from biomass by thermochemical conversion technologies," *International Journal of Chemical Engineering*, vol. 2012, no. ID 542426, pp. 1-18, 2012.
- [7] P. McKendry, "Energy production from biomass (part 3): gasification technologies," *Bioresource Technology*, vol. 83, no. 1, pp. 55-63, 2002.
- [8] P. Basu, *Biomass Gasification and Pyrolysis: Practical Design and Theory*. Academic press, 2010.
- [9] A. Heraz Segura, "Estudio de gasificación mediante un prototipo experimental para el tratamiento termoquímico de residuos orgánicos," Universidad Iberoamericana, 2012.
- [10] A. Caballero-Chavarría, "Propuesta de un sistema de gasificación de residuos de hidrocarburos para aprovechamiento energético en el Plantel El Alto de RECOPE SA," Escuela de Química, Instituto Tecnológico de Costa Rica, 2017.
- [11] M. P. Rojas-Soto, "Estudio de pre-factibilidad de la transformación de residuos orgánicos municipales en energía," Escuela de Química, Instituto Tecnológico de Costa Rica, 2017.
- [12] M. M. Villalobos-Barquero, "Análisis de potencial de aprovechamiento energético de residuos de hidrocarburos por medio de gasificación en el Plantel El Alto de RECOPE SA," Escuela de Química, Escuela de Química Instituto Tecnológico de Costa Rica, 2017.
- [13] M. Puig-Arnau, J. C. Bruno, and A. Coronas, "Review and analysis of biomass gasification models," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 14, no. 9, pp. 2841-2851, 2010.
- [14] B. Buragohain, P. Mahanta, and V. S. Moholkar, "Thermodynamic optimization of biomass gasification for decentralized power generation and Fischer-Tropsch synthesis," *Energy*, vol. 35, no. 6, pp. 2557-2579, 2010.
- [15] ALL Power Labs. (2015). Power Pallet - PP20. Available: http://www.allpowerlabs.com/wp-content/uploads/2015/10/PP20GeneratorOneSheet10_25_15Small.pdf
- [16] Ley para la Gestión Integral de Residuos de la República de Costa Rica, Ley N° 8839, 2010.
- [17] M. J. Caselles Pomares, M. R. Gómez Antón, M. Molero Meneses, and J. Sardá Hoyo, *Química Aplicada a la Ingeniería*. Madrid: Universidad Nacional de Educación a Distancia, 2015.
- [18] T. Pröll and H. Hofbauer, "H₂ rich syngas by selective CO₂ removal from biomass gasification in a dual fluidized bed system — Process modelling approach," *Fuel Processing Technology*, vol. 89, no. 11, pp. 1207-1217, 2008.
- [19] W. Doherty, A. Reynolds, and D. Kennedy, "Aspen plus simulation of biomass gasification in a steam blown dual fluidised bed," in *Materials and processes for energy: communicating current research and technological developments*, A. Méndez-Vilas, Ed.: Formatex Research Centre, 2013.
- [20] J. U. Castellanos, F. E. Sierra Vargas, C. A. Guerrero Fajardo, and L. F. Sosa Quintero, "Modelado del proceso de gasificación de biomasa para aprovechamiento energético: una revisión al estado del arte," *ITECKNE*, vol. 9, no. 2, pp. 95-105, 2012.
- [21] N. Couto, A. Rouboa, V. Silva, E. Monteiro, and K. Bouziane, "Influence of the biomass gasification processes on the final composition of syngas," *Energy Procedia*, vol. 36, pp. 596-606, 2013.
- [22] A. Z. Mendiburu, J. A. Carvalho, R. Zanzi, C. R. Coronado, and J. L. Silveira, "Thermochemical equilibrium modeling of a biomass downdraft gasifier: Constrained and unconstrained non-stoichiometric models," *Energy*, vol. 71, pp. 624-637, 2014.
- [23] B. Buragohain, P. Mahanta, and V. S. Moholkar, "Performance correlations for biomass gasifiers using semi-equilibrium non-stoichiometric thermodynamic models," *International Journal of Energy Research*, vol. 36, pp. 590-618, 2012.
- [24] T. K. Patra and P. N. Sheth, "Biomass gasification models for downdraft gasifier: A state-of-the-art review," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 50, pp. 583-593, 2015.

Mesenchymal Stem Cell Isolation from Mice Inguinal Fat Tissue: a protocol to get the best from small samples

Aislamiento de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo del pliegue inguinal murino: un protocolo para obtener lo mejor de pequeñas muestras

Silvia Castro-Piedra¹, Johan Morales-Sánchez²,

Fecha de recepción: 28 de enero de 2019
Fecha de aceptación: 19 de abril de 2019

Castro-Piedra, S; Morales-Sánchez, J. Mesenchymal Stem Cell Isolation from Mice Inguinal Fat Tissue: a protocol to get the best from small samples. *Tecnología en Marcha*. Vol. 32-4. Octubre-Diciembre 2019. Pág 69-80.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i4.4793>



- 1 Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: scastro@tec.ac.cr.
 <https://orcid.org/0000-0003-0689-8336>
- 2 Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: jmorales@tec.ac.cr.
 <https://orcid.org/0000-0002-2383-5516>

Keywords

Mesenchymal stem cell; adipose-derived stem cells; regeneration; scaffold; differentiation.

Abstract

Adipose-derived stem cells are being investigated for tissue repair because of their multidifferentiation potential and secreted growth factors as well as cytokines. Currently, there is a lot of preclinical and clinical studies that use these cells to determine the clinical effect in skin wounds, spinal cord injuries, myocardial infarction among others with promising results. In this study, a small sample of adipose tissue was extracted from mice inguinal pad and the stromal vascular fraction was obtained. Then, it was cultivated in vitro in order to promote ASC adhesion and expansion. Growth kinetics, stem cell markers expression and differentiation potential were analyzed. The isolated stem cells showed similar growth kinetics as reported in literature. Thirty percent of analyzed cells were positive for the stem cell markers and they were able to differentiate in adipogenic, chondrogenic and osteogenic lineages. The protocol proven in this work allowed to isolate adipose-derived stem cells from a very small sample that met almost all the criteria established by the International Society for Cell and Gene Therapy, giving rise to future research for establish this tissue as an excellent source of stem cells and the development of alternative therapies to the treatment of skin wounds.

Palabras clave

Célula madre; ASC; regeneración; andamio; diferenciación.

Resumen

Las células madre derivadas de tejido adiposo están siendo investigadas para la reparación de tejidos debido a su potencial de diferenciación y la secreción de factores de crecimiento así como de las citocinas. Actualmente, hay muchos estudios preclínicos y clínicos que usan estas células para determinar el efecto clínico en heridas de la piel, lesiones de la médula espinal, infarto de miocardio, entre otros, con resultados prometedores. En este estudio, se extrajo una pequeña muestra de tejido adiposo del pliegue inguinal de ratones y se obtuvo la fracción vascular estromal. Luego, esta se cultivó in vitro para promover la adhesión y expansión de ASC. Se analizó la cinética de crecimiento, la expresión de marcadores de células madre y el potencial de diferenciación. Las células madre aisladas mostraron una cinética de crecimiento similar a la reportada en la literatura. El treinta por ciento de las células analizadas fueron positivas para los marcadores de células madre y pudieron diferenciarse en linajes adipogénicos, condrogénicos y osteogénicos. El protocolo probado en este trabajo permitió aislar células madre derivadas de tejido adiposo de una muestra muy pequeña que cumplía con casi todos los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular y Genética, dando lugar a investigaciones futuras para establecer este tejido como una excelente fuente de células madre y el desarrollo de terapias alternativas para el tratamiento de heridas en la piel.

Introduction

Stem cells (SC) are the main focus in a lot of research for the development of novel treatments for tissue regeneration. These cells are able to: migrate to damaged tissue and participate in wound healing process; produce many growth factors (GF) that induce and modulate regeneration mechanisms; differentiate into various cell types and immunomodulate. Altogether, playing a fundamental role for generation of *de novo* tissue and avoid scars [1] [2] [3].

Given the significance of stem cells, it is required manipulate them for expansion, cryopreservation and also to analyze biochemical, genetic, molecular, safety and efficacy properties to determine potential therapeutic applications [1]. Promising results have been obtained through research in regeneration and autoimmune diseases [4], further characterization, analysis of their behavior and ability to differentiate *in vitro* are mandatory prior to move forward with preclinical and clinical research [5].

Adipose tissue is composed mainly of mature adipocytes (90%), but it is possible to identify a heterogeneous population of cells, called Vascular Stromal Fraction (SVF) which includes: preadipocytes, progenitor endothelial cells, pericytes, mast cells, macrophages, fibroblasts and around 2% are adipose tissue stem cells (ASC) that can differentiate into several lineages [6] [7] [8] [9]. ASC are similar to mesenchymal stem cells from bone marrow, which act as precursor cells and help to maintain the tissue around them [10]. Many reports support the ability of ASC to differentiate into cells of the mesodermic lineage (bone, fat, cartilage and muscle) at *in vitro* level controlled by hormonal, neuronal and paracrine factors [11]. However, transdifferentiation of ASC to ectodermal or endodermal lineages has also been demonstrated through several markers [12] [13] [14] [15].

ASCs can be isolated by minimally invasive procedures and the yield of ASCs obtained from adipose tissue is 10% from a pool of 1 million of nucleated cells isolated (whereas 1% is recovered from a sample of 1 million nucleated cells from bone marrow or less if isolated from peripheral blood) [16] [17]. Additionally, they can be prepared under Good Manufacturing Practices (GMPs) standards, and can be used for cellular therapies even without being cultured and expanded (applying the SVF) which reduces the risk of excessive handling or potential contamination and costs [13] [18] [19]. These cells do not express HLA-DR [16], so they can be used in allogenic manner, they inhibit the proliferation of peripheral blood nucleated cells and decreases the immunological response [11] [20]. On the other hand, *in vivo* studies have shown that ASC or SVF applications in skin lesions promote and increases the regeneration rate, decrease pain, inflammation, and the obtained tissue is more comparable to normal skin than scar formation [21] [22] [23] [24]. Currently, there are a considerable number of clinical studies in different stages applying these cells [25] [3] [26].

Before considering them as candidates for therapies, the International Society for Cellular and Gene Therapy (ISCT) proposed the following criteria: adherence to plastic, more than 95% of the population must be CD73, CD90 and CD105 positive, and negative for CD34, CD45, CD11b or CD14, CD79 or CD19 and HLA class II. Additionally, they must be able differentiate in chondrocytes, osteoblasts and adipocytes [5]. The aim of this study was to isolate and expand ASC from adipose tissue that meet the ISCT stem cells criteria for cell therapy.

Material and methods

Assessment of ASC derived from murine adipose tissue in in vitro culture

Culture conditions

All animals were handled under current legislation and permits established by the Institutional Committee for the Care and Use of Animals (CICUA) of the UCR (CICUA-047-16). Balb-C mice were supplied by the Biological Testing Laboratory of the University of Costa Rica (UCR) at 4 weeks old. Adipose tissue from inguinal area was isolated from each mouse after euthanasia was performed using cervical dislocation during anesthesia. The *in vitro* culture experiments were carried out at Center for Biotechnology Research at Costa Rica Institute of Technology (TEC), Cartago. The samples were collected in PBS and washed with PBS + 5% Penicillin and Streptomycin (GIBCO). Mechanical and enzymatic disaggregation were performed with 0.1% type I collagenase (GIBCO) solution incubating the samples at 35 °C for 60 minutes. The suspension was inactivated with Fetal Bovine Serum (GIBCO) and centrifuged for 6 minutes at 1200 rpm. The pellet was resuspended in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) high in glucose (4g/L) (GIBCO) with Ham's F12 (SIGMA) 1:1 supplemented with + 10% Fetal Bovine Serum (GIBCO), 1% L -glutamine (GIBCO) and 1% antibiotics (GIBCO). The cells were incubated at 37 °C with 5% CO₂ and medium was renewed every 3-4 days. Subcultures were performed when the confluence reached 80%.

Cryopreservation

Two different cryopreservation methods were evaluated a mix of 10% dimethylsulfoxide (DMSO) + 30% SFB + 60% culture medium and a mix of 5% DMSO + 30% SFB + 65% culture medium. The thawing process was also evaluated by two different methods: in the first one, the vial was heated in a water bath at 37° C, placed directly in the culture flask with fresh medium and incubated under normal conditions. The second method consisted of slightly thawing the vial in a water bath at 37°C and diluted in 9mL of fresh media, then centrifuged for 6 min at 1200 rpm and the resulting cell pellet was resuspended in fresh medium and placed in a culture flask under normal incubation conditions.

Cell kinetics

Three different cell growth curves were made using passages 1, 2 and 3. Initially 4x10³ cells were seeded per well on a 12-well plate and total cells were counted every two days for 12 days. Each assay was performed in triplicate. Additionally, the population doubling time (PDT) was calculated. For this, 1x10⁵ cells were seeded in a T25 flask and allowed to 90% confluence and the next formula was applied.

$$\text{Growth rate} = \frac{\ln\left(\frac{N(t)}{N(0)}\right)}{t}$$

$$\text{Doubling time} = \frac{\ln(2)}{\text{Growth rate}}$$

Where:

N(t) = cell number when reached to confluency,

N (0) = number of seeded cells.

t = time (hours)

Identification of ASC markers

Four markers were selected to identify the ASC population from passage 1 by flow cytometry: anti-CD45 PE, anti-CD73 PerCP, anti-CD90 FITC, anti-CD105 Alexa 647 (BD Biosciences). A cell suspension was made, and the cells were incubated with the antibodies at an established concentration for 20 minutes in darkness. Afterwards, the sample was washed with FACS buffer and analyzed with the BD Accuri C6 flow cytometer.

Differentiation potential of the ASC

P3 cells were cultured in a 24 multiwell plate using the Mouse Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit (R&D Systems, #SC010), according to manufacturer's instructions. These cells were maintained in culture for 21 days with the three-different induction's media, renewing them every 3-4 days.

Immunofluorescence was performed on the differentiated cells as follows: cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min, washed with a blocking solution and subsequently incubated with anti-FABP4, anti-Collagen type II or anti-Osteopontin overnight at 2-3°C, to demonstrate the differentiation to the adipogenic, chondrogenic or osteogenic lineage respectively. Then, they were incubated with secondary antibody in the dark. Finally, Prolong Antifade mounting medium with Dapi (Thermofisher) was added and they were analyzed on the Olympus CKX41 fluorescence microscope.

Results

Assessment of ASC in vitro culture from murine adipose tissue

A total of 11 effective isolations were carried out, obtaining 0.8 ± 0.2 g of adipose tissue per sample. After several modifications and adjustments to the protocol, $1.7 \times 10^5 \pm 4 \times 10^4$ nucleated cells were counted from each processed tissue. When seeded, they first formed microcolonie, with a spindle-shaped morphology, and reached confluence after 10-14 days in culture (Figure 1A). When the cells reached 70% -80% confluence, they were subcultured on a 1:2 - 1:3 ratio (Figure 1). The maximum passage reached was P5, then they began to show signs of stress: they changed from a fibroblast-like morphology to a starry morphology, vacuoles could be observed inside the cytoplasm and their confluence couldn't surpass 40% (Figure 1E).

Regarding the freezing/thawing evaluated methods, the most efficient medium for cryopreservation was 5% DMSO, 30% FBS and 70% DMEM/F12 culture medium. On the other hand, cells cryopreserved with 10% DMSO were not able to adhere to the culture plate afterwards.

The most successful defrosting method was the one that eliminated the DMSO by centrifugation after thawing. Cells thawed under these conditions, regrow *in vitro* with the same efficiency and kinetics (Figure 2) as no cryopreserved cells, while those that were thawed by direct seeding did not proliferate when seeded (images not shown).

To analyze the behavior of these cells *in vitro*, cell kinetics tests were performed. A growth curve was made in passages 1, 2 and 3 as the PDT analyzed (Figure 3).

Very similar lag phases were obtained among all the passages. As the number of passages gets higher, there is a slight increase in the exponential phase. Finally, the stationary phase was reached near $2.4 \times 10^5 \pm 1 \times 10^4$ cells/well or 6×10^4 cells/cm² in all cases. The population doubling time range was maintained between 35.68 - 39.82 hours with the established incubation conditions (Figure 6). The ANOVA test showed significant differences between P1 and P2 ($p = 0.02$), as well as P1 and P3 ($p = 0.04$).

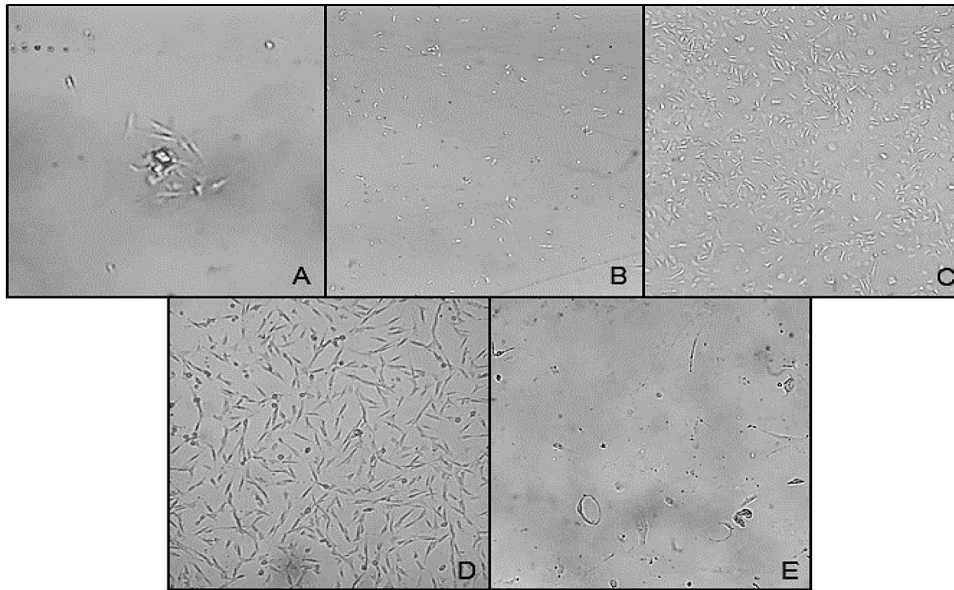


Figure 1. Stromal cells derived from adipose tissue in culture at different timepoints. A. Day 1 (100X), B. Day 5 (40X), C. Day 10 (40X), D. P2 cells (40x), E P5 cells (100X). Abbreviation: P, passage.

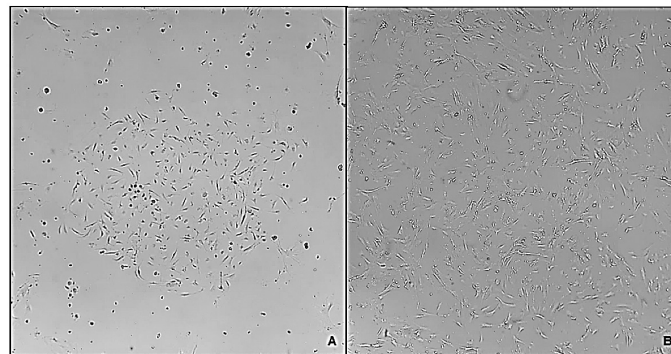


Figure 2. Morphology of P3 stromal cells derived from adipose tissue after cryopreservation and thawing process. A. Day 1 after thawing, B. Day 4 after thawing. (40x).

Identification of ASC markers. A passage 1 population was analyzed for stem cell markers expressions. As shown in figure 4, it can be seeing that, close to 30% of the cells, express CD73 and CD90 (Figure 4.a and 4.b), and approximately 40% of analyzed population was CD105 positive (Figure 4.c). Whereas, the 3,5% of the population express the CD45, which means that only these cells come from hematopoietic lineage (Figure 4.d).

Differentiation potential of the ASC. Figure 5 shows the immunofluorescence of the cells after 21 days of culture in the respective differentiation media. For adipogenic, differentiation the fatty acid binding protein-4 (FABP4), commonly used for adipose marker is shown; for the chondrogenic differentiation type II Collagen (Col II) was used and finally for osteogenic induction, the Osteopontin (OPN), a bone specific protein synthesized by osteoblast was detected [27]. Besides the immunostaining of different markers, a morphological change could be noted. The cells committed to adipogenic lineage, increase their size up to 3 times, showing vacuoles within the cytoplasm. On the other hand, the cells that were subjected to chondrogenic

differentiation, showed a starry morphology, did not increase their size as much as the cells in adipogenic induction, and type II collagen was synthesized and accumulated perinuclearly. In parallel, the cells that were directed to osteogenic differentiation retained a more fibroblastoid morphology, smaller size compared to the last two and osteopontin could be located at the nuclear perimeter.

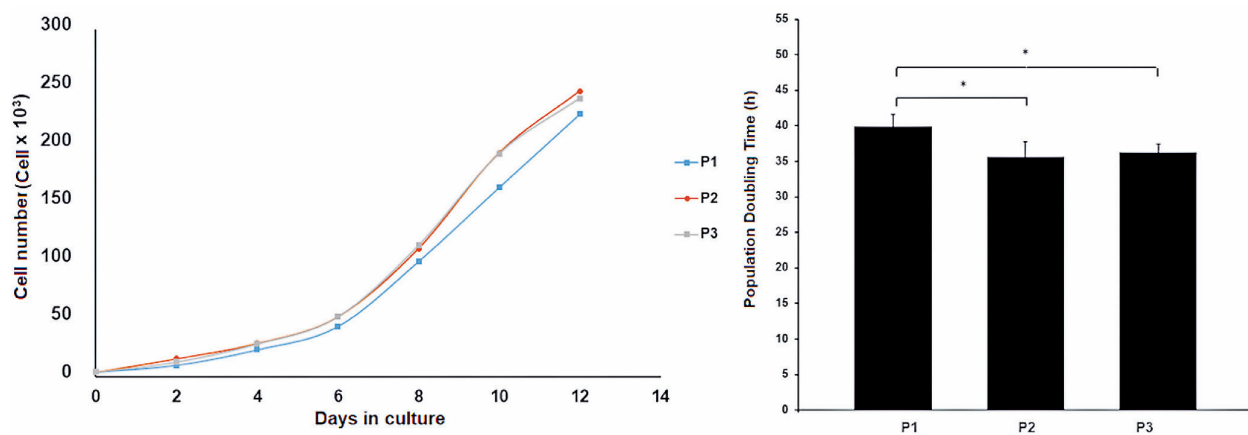


Figure 3. A. Growth curves of the ASCs cultured *in vitro* at different passages, B. Population doubling time of ASCs at different passages

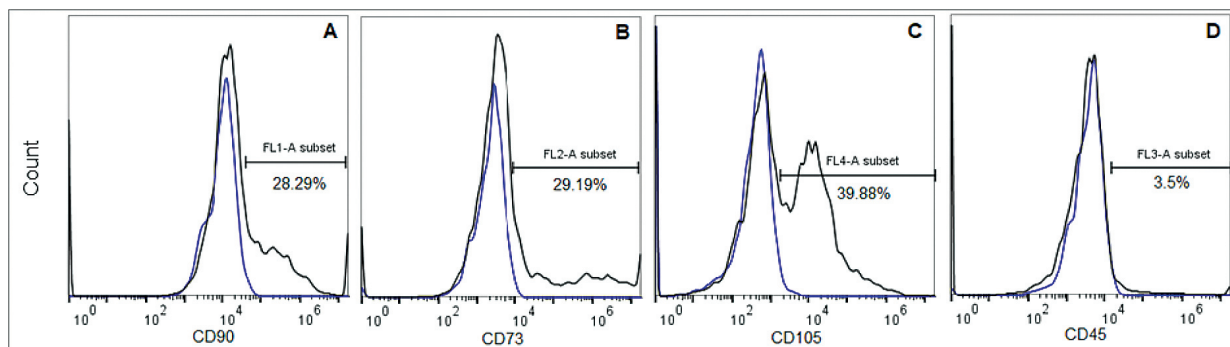


Figure 4. Analysis of surface markers of cells cultured *in vitro*.

Discussion

Due to the great regenerative potential of the ASC for wound healing, a protocol for their isolation from a minimal sample of adipose tissue was proposed. In this paper, we present a feasible protocol that allows a good isolation yield of ASC from a small sample, thus demonstrating that adipose tissue is an excellent source of mesenchymal stem cells. To the date, there is no gold standard method for the isolation of these cells. In addition to the protocol variations and the reagents used, there are many variables that can affect the amount and composition of isolated cells from fat deposits such as the method of obtaining adipose tissue, age and sex of the donor, body mass index, anatomical area from which the sample is extracted, physiological status of the donor among others [28].

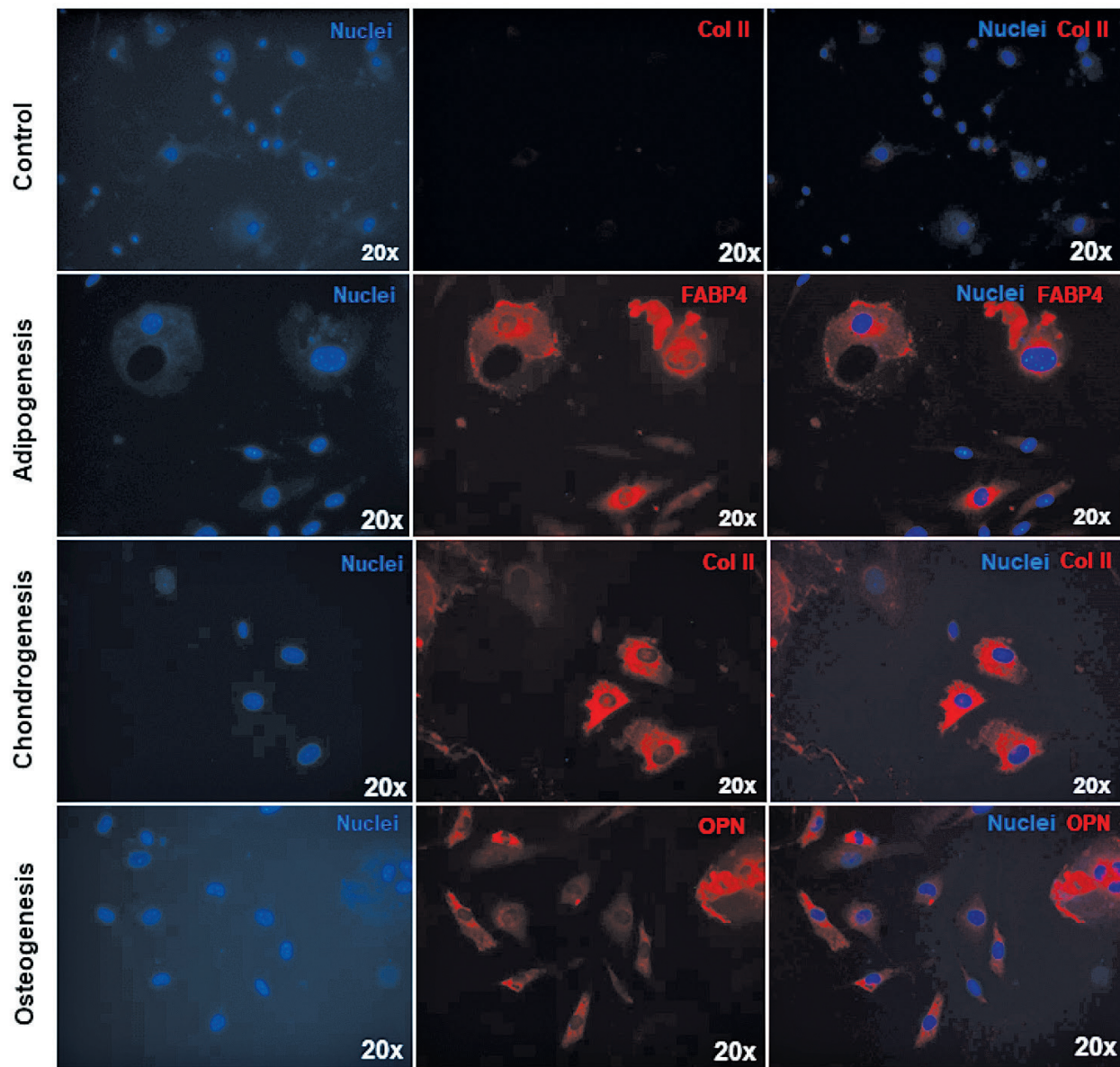


Figure 5. Analysis the multipotential of the ASCs. Differentiation in adipogenic lineage (FABP4 in red), chondrogenic (type II collagen in red) and osteogenic (osteopontin in red). Nucleus of cells in blue. The control was performed for each case, however only the respective chondrogenic differentiation is shown here.

The number of isolated cells varied according to the volume of the obtained sample. In this case, it was obtained $1.7 \times 10^5 \pm 4 \times 10^4$ nucleated cells per each 0.8 g of fat tissue. Bear and colleagues [15], have reported higher amounts of isolated cells using human adipose tissue, $0.5-2.0 \times 10^6$ cells per gram. However, in a study conducted by Bobis and colleagues, they demonstrated similar amounts to those reported in this study when using collagenase, but when using another enzyme, Liberase™ (Roche), the performance was higher [29]. Thus, the used disaggregation enzyme could improve or diminish the yield per volume from the same sample. The number of isolated cells varies also regarding the anatomical zone from which the subcutaneous adipose tissue was taken, the type of adipose tissue (subcutaneous, visceral or brown), and the physiological condition of the donor. This was slightly observed in preliminary

tests with older mice, where even though they had more adipose tissue, the number of isolated cells did not reach 100 000 cells (data not shown).

Once the cells were isolated and cultured *in vitro*, they were able to maintain up to 5 passages, which results consistent with a study carried out by Fajka-Boja and colleagues in 2018 [30]. A study made with samples obtained from rabbit reached a maximum of 7 passages [31] however, there are multiple studies in which the culture medium was supplement with growth factors reaching up to 14 passages and more. It is necessary to consider that due to the limited size of the initial sample the cells seeded for this study were less, which means that they performed more doublings than in other studies where the seeding density was higher. Therefore, although there are few passages in this case, using the PDT as an indicator to compare to experimental results is more appropriate [32]. The PDT reported in literature for ASC varies from 20 to 120 hours and is influenced by many variables [33] [34]. Hwa and colleagues found that at low passages, they ranged between 1.6 and 1.7 days and as the passages increase, this value does the same [35]. On the other hand, Blázquez and colleagues reported a range between 6.4 - 14.7 days using a commercial medium specific for ASC [36] and when using mesenchymal stem cells from umbilical cord, they presented the shortest PDT, indicating that beside all the mentioned factors, the kind of tissue from which the mesenchymal stem cells are obtained affects the kinetics. Beane and collaborators also studied the age of the donors and found that the PDT of the ASC was affected by it, finding samples of different ages with values of 20 hours [34].

During this test, cells that underwent a cryopreservation process using 10% DMSO did not survive. However, by reducing it to 5% in the cryopreservation media and eliminating it when the cells were re-cultivated (second thawing method), the mortality was reduced considerably. That confirms the toxicity of this cryoprotective agent to ASCs, being a toxic substance at room temperature that damages cells when used at high concentrations or inadequately. Other researchers have reported that cryopreserving cells using DMSO at 10 % concentration within the medium has caused adverse effects in patients that receive stem cells as therapy, such as: respiratory reactions and neurotoxicity in pediatric patients, which clearly indicates the need to reduce its use or look for other cryoprotective agents when aiming to scale up to clinical therapies [37] [38].

The ISCT defined that cells *in vitro* must be positive for CD73, CD90 and CD105, but negative for CD45 and HLA-DR markers as identifiers for mesenchymal stem cells isolated from various tissues (fat, bone marrow, umbilical cord, blood and other). Several authors, however indicate that it is not necessarily a manifestation of them *in vivo* [32]. In this study, only around 25% of the analyzed cells showed to be positive for the CD73, CD90 and CD105 markers, while 96% were negative for the CD45, consistent with the criteria from ISCT. This analysis was assessed with low passage cells, therefore it can be noticed that in this stage, the cell culture is not homogeneous yet, but it contains the population of interest, and probably, as the passages and doublings increase, the percentage of this population will too, and also the homogeneity of the cells. The reason to analyze a low passage cell sample was that after multiple subcultures the manipulation increases, which increase the risk of contamination, change their phenotype and the cells can accumulate cariotypic abnormalities after the constant cell divisions [39]. Despite this, it is desirable to analyze each of the passages to determine at what specific stage it is possible to obtain at least one population greater than 90% that presents the conditions indicated by the ISCT. Other studies performed with rat cells at passage 4, showed that 96% were positive for CD90 and negative for CD45 [40]. In addition, a study comparing different methods of ASC isolation showed that the expression profile varies according to each protocol. In some cases, they only showed expression of CD90 and CD105, while in other cases only the expression of CD90 and CD73 was found, but always were negative (<5%) for CD45 [41].

This could be caused by using different tissue sources, which favors the isolation of different subpopulations of mesenchymal stem cells, or that the process of isolation and cultivation affects the expression of them. Although there are multiple investigations that found the expression of all the markers contemplated by the ISCT [13] [42], it is possible to find different reports [39] [43].

A fundamental characteristic of the stem cell is its capacity to divide asymmetrically, where one descendant cell will be identical to the cell of origin and the other will acquire characteristics of a specialized cell [39]. This differentiation will occur when the adequate stimuli trigger the process. In this study, differentiation of isolated cells could be accomplished into adipogenic, chondrogenic and osteogenic lineages. These results were consistent with other studies developed that assure their differentiation potential [44] [45] [46]. Meeting the stem-cell definition criteria established by ISCT [33].

Conclusions

The established protocol was effective for isolation of ASCs, and culture could be maintained *in vitro* until 5 passages, afterwards the cells entered in a senescence state. Cellular kinetics matched the results obtained in literature. The best cryopreserving method was the one with the lowest concentration of DMSO, and the best thawing method was eliminating the DMSO before seeding. A third of the P1 population cells analyzed by flow cytometry showed stem cell markers. However, it is necessary to subculture the cells repeatedly in order to obtain more cells with these characteristics and a more homogeneous culture.

P3 cells were able to differentiate into three lineages: adipogenic, chondrogenic and osteogenic, as shown by the presence of tissue-specific proteins and morphological changes, which meet the ISCT criteria to determine the identity of an adipose-derived mesenchymal stem cells culture.

References

- [1] S. Dinescu, A. Hermenean y M. Costache, «Human Adipose-Derived Stem Cells for Tissue Engineering Approaches: Current Challenges and Perspectives,» de *Stem Cells in Clinical Practice and Tissue Engineering*, Londres, Reino Unido, IntechOpen, 2018, pp. 293-314.
- [2] M. E. Bateman, A. L. Strong, J. M. Gimble y B. A. Bunnell, «Using Fat to Fight Disease: A Systematic Review of Non-Homologous Adipose-Derived Stromal/Stem Cell Therapies,» *Stem Cells*, pp. 1-24, 2018.
- [3] S. J. Holm, N. M. Toyserkani y J. A. Sorensen, «Adipose-derived stem cells for treatment of treatment of chronic ulcers: current status,» *Stem Cell Research & Therapy*, vol. 9, n° 142, pp. 1-11, 2018.
- [4] V. Volarevic, B. S. Markovic, M. Gazdic, A. Volarevic, N. Jovicic, N. Arsenijevic, L. Armstrong, V. Djonov, M. Lako y M. Stojkovic, «Ethical and Safety Issues of Stem Cell-Based Therapy,» *International Journal of Medical Sciences*, vol. 15, n° 1, pp. 36-45, 2018.
- [5] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop y E. Horwitz, «Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.,» *Cytotherapy*, vol. 8, n° 4, pp. 315-317, 2006.
- [6] S. Müller, E. Kulenkampff y C. Wolfrum, «Adipose Stem Cell,» de *Handbook of Experimental Pharmacology. Metabolic Control*, Suiza, Springer Nature, 2016, pp. 251-260.
- [7] P. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, W. Futrell, A. Katz, P. Benhaim, H. Lorenz y M. Hedrick, «Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies,» *Tissue Engineering*, vol. 7, n° 2, pp. 211-226, 2001.
- [8] P. Zuk, M. Zhu, P. Ashjian, D. De Ugarte, J. Huang, H. Mizuno, Z. Alfonso, J. Fraser, P. Benhaim y M. Hedrick, «Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells,» *Molecular Biology of the Cell*, vol. 13, n° 12, pp. 4279-4295, 2002.
- [9] B. Bellei, E. Migliano, M. Tedesco, S. Caputo, F. Papaccio y L. Gianluca, «Adipose tissue-derived extracellular fraction characterization: biological and clinical considerations in regenerative medicine,» *Stem Cell Research & Therapy*, vol. 9, n° 207, p. 18, 2018.

- [10] M. Cherubino, P. Rubin, N. Miljkovic, A. Kelmendi-Doko y K. Marra, «Adipose-Derived Stem Cells for Wound Healing Applications,» *Annal of Plastic Surgery*, vol. 66, n° 2, pp. 210-215, 2011.
- [11] D. Minter, K. Marra y P. Rubin, «Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: Biology and Potential Applications,» *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, n° 129, pp. 59-71, 2012.
- [12] P. Baer, «Adipose-derived stem cell and their potential to differentiate into epithelial lineage,» *Stem cell and development*, vol. 20, n° 10, pp. 1805-1816, 2011.
- [13] L. Kokai, K. Marra y P. Rubin, «Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration,» *Translation Research*, vol. 163, n° 4, pp. 399-408, 2014.
- [14] D. Lo Furno, G. Mannino, V. Cardile, R. Parenti y R. Giuffrida, «Potential Therapeutic Applications of Adipose Derived Stem Cells,» *Stem Cells and Development*, vol. 25, n° 21, pp. 1615-1628, 2016.
- [15] P. Baer y H. Geiger, «Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Tissue Localization, Characterization, and Heterogeneity,» *Stem Cell International*, vol. 2012, pp. 1-11, 2012.
- [16] D. Mushahary, A. Spittler, C. Kasper, V. Weber y V. Charwat, «Isolation, Cultivation, and Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells,» *Cytometry*, vol. 93, n° 1, pp. 19-31, 2018.
- [17] L. Meilleres, P. Chagastelles y N. Nardi, «Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues,» *Journal of Cell Science*, vol. 119, n° 11, pp. 2204-2213, 2006.
- [18] G. Rigotti, A. Marchi y A. Sbarbati, «Adipose derived mesenchymal stem cell: past, present and future,» *Aesth. Plast. Surg.*, vol. 33, n° 3, pp. 271-273, 2009.
- [19] S. Devitt, C. Carter, R. Dierov, S. Weiss, R. Gersh y I. Percec, «Successful isolation of viable adipose-derived stem cells from human adipose tissue subject to long-term cryopreservation: positive implications for adult stem cell-based therapeutics in patients of advanced age,» *Stem Cells International*, vol. 2015, 2015.
- [20] A. Leto, S. Khalifian, W. Lee y G. Brandacher, «Immunomodulatory Effects of Adipose-Derived Stem Cells: Fact or Fiction?,» *Biomed Research International*, vol. 2013, pp. 2-8, 2013.
- [21] P. Liu, Z. Deng, S. Han, T. Liu, N. Wen, W. Lu, X. Geng, S. Huang y Y. Jin, «Tissue-engineered skin containing mesenchymal stem cells improves burn wounds,» *Artificial Organs*, vol. 32, n° 12, pp. 925-931, 2008.
- [22] C. García, L. García, J. Henriques y P. García, «Adipose tissue-derived stem cell autologous grafts: a new approach to application in the treatment of burn victims and reconstructive plastic surgery,» *Rev. Bras. Cir. Plást.*, vol. 31, n° 3, pp. 417-423, 2016.
- [23] F. Zeledón, E. Mendez, J. Arroyo, S. Castro-Piedra, A. Suarez, M. Alvarado y O. Morales, «Valoración de la tasa de cicatrización de una úlcera aguda en ratas Sprague Dawley, mediante la aplicación de células madre mesenquimatosas, obtenidas del tejido adiposo,» *Acta Médica Costarricense*, vol. 60, n° 1, pp. 27-34, 2018.
- [24] J. Morales, L. Calvo, C. Centeno, S. E. Castro Piedra, F. Zeledón, M. Guerrero y M. Rojas, «Preliminary Tests with Stem Cell Therapies for the Treatment of Skin Lesions in an Animal Model,» de *TISSUE ENGINEERING PART A*, 40 HUGUENOT STREET, 3RD FL, NEW ROCHELLE, NY 10801 USA: MARY ANN LIEBERT, INC., 2015.
- [25] clinicaltrials.gov, «clinicaltrials.gov,» [En línea]. Available: clinicaltrials.gov. [Último acceso: jueves 21 junio 2018].
- [26] A. Strong, M. Neumeister y B. Levi, «Stem cells and tissue engineering: regeneration of the skin and its contents,» *Clin Plast Surg.*, vol. 44, n° 3, pp. 635-650, 2017.
- [27] S. Almalki y D. Agrawal, «key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells,» *Differentiation*, vol. 92, pp. 41-51, 2016.
- [28] P. Stanko, K. Kaiserova, V. Altanerova y C. Altaner, «Comparison of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp, bone marrow, adipose tissue and umbilical cord tissue by gene expression,» *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, vol. 158, n° 3, pp. 373-377, 2014.
- [29] S. Bobis, S. Millington, A. Zawisz, T. Adamus, P. Konieczny y M. Majka, «An improved protocol for adipose tissue-derived stem cell isolation: implications for treatments of bone disorders,» *European Journal of Medical Technologies*, vol. 1, n° 2, pp. 6-21, 2014.
- [30] R. Fajka-Boja, A. Marton, A. Tóth, P. Blazsó, V. Tubak, B. Bálint, I. Nagy, Z. Hegedus, C. Vizler y Katona R, «Increased insulin-like growth factor 1 production by polyploid adipose stem cells promotes growth of breast cancer cells,» *BMC Cancer*, vol. 18, n° 1, pp. 1-12, 2018.
- [31] O. Bukovska, *Tesis: Células mesenquimales derivadas de tejido adiposo y médula ósea: comparación de protocolos de aislamiento y cultivo in vitro*, Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid, 2012.

- [32] S. Viswanathan y A. Keating, «Mesenchymal Stromal Cells: Latest Advances,» de *Tissue Engineering in Regenerative Medicine, Stem Cell Biology*, New York, Humana Press, 2011, pp. 53-73.
- [33] A. Lofty, M. Salama, F. Zahran, A. Badaway y M. Sobh, «Characterization of mesenchymal stem cells derived from rat bone marrow and adipose tissue: a comparative study.,» *Int. J Stem Cells*, vol. 7, n° 2, pp. 135-142, 2014.
- [34] O. Beane, V. Fonseca, L. Cooper, G. Koren y E. Darling, «Impact of Aging on the Regenerative Properties of Bone Marrow-, Muscle-, and Adipose-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells,» *PLoS ONE*, vol. 9, n° 12, pp. 1-22, 2014.
- [35] R. Hwa, B. Kin, I. Choi, H. Klm, H. Choi, K. Suh, Y. Chan y J. Sup, «Characterization and Expression Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Human Bone Marrow and Adipose Tissue,» *Cell Physiol Biochem*, vol. 14, pp. 311-324, 2004.
- [36] A. Blázquez, J. Diéz, R. Gajardo y S. Grancha, «Human mesenchymal stem cells maintain their phenotype, multipotentiality, and genetic stability when cultured using a defined xeno-free human plasma fraction,» *Stem Cell Research & Therapy*, vol. 8, n° 1, pp. 1-11, 2017.
- [37] P. Windrum y T. Morris, «Severe neurotoxicity because of dimethyl sulphoxide following peripheral blood stem cell transplantation.,» *Bone Marrow Transplant.*, vol. 31, n° 4, p. 315, 2003.
- [38] E. Ataseven, O. Tüfekçi, S. Yılmaz, H. Gülerüyüz y H. Ören, «Neurotoxicity Associated With Dimethyl Sulfoxide Used in Allogeneic Stem Cell Transplantation.,» *J Pediatr Hematol Oncol.*, vol. 39, n° 5, pp. 297-299, 2017.
- [39] P. Palumbo, F. Lombardi, G. Siragusa, M. Cifone, B. Cinque y M. Giuliani, «Methods of Isolation, Characterization and Expansion of Human Adipose-Derived Stem Cells (ASCs): An Overview.,» *Int J Mol Sci.*, vol. 19, n° 7, pp. 1-13, 2018.
- [40] M. Gautam, D. Fujita, K. Kimura, H. Ichikawa, H. Izawa, M. Hirose, T. Kashihara, M. Yamada, M. Takahashi, U. Ikeda y ShibaY, «Transplantation of adipose tissue derived stem cells improves cardiac contractile function and electrical stability in a rat myocardial infarction model,» *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 81, pp. 139-149-, 2015.
- [41] B. Sousa, R. Parreira, E. Fonseca, M. Amaya, F. Tonelli, S. Lacerda, P. Lalwani, A. Santos, K. Gomes, H. Ulrich, A. Kihara y R. Resende, «Human adult stem cells from diverse origins: an overview from multiparametric immunophenotyping to clinical applications,» *Cytometry*, vol. 85, n° 1, pp. 43-77, 2014.
- [42] P. Amable, M. Teixeira, R. Carias, J. Granjeiro y R. Borojevic, «Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's Jelly,» *Stem Cell Research & Therapy*, vol. 5, n° 2, pp. 1-13, 2014.
- [43] N. Gnanasegaran, V. Govindasamy, S. Musa y N. Kasim, «Different Isolation Methods Alter the Gene Expression Profiling of Adipose Derived Stem Cells,» *Int J Med Sci*, vol. 11, n° 4, pp. 391-403, 2014.
- [44] D. Panayiotis, P. Megaloikononimos, G. Panagopoulos, M. Bami, V. Igoumenou, L. Dimopoulos, A. Milonaki, M. Kyriakidou, E. Mitsiokapa, J. Anastassopoulou y A. Mavrogenis, «Harvesting, Isolation and Differentiation of Rat Adipose-Derived Stem Cells.,» *Curr Pharm Biotechnol.*, vol. 19, n° 1, pp. 19-29, 2018.
- [45] S. Huang, c. Huang, J. Shyu, H. Lee, S. Chen, J. Chan y S. Huang, «Promotion of wound healing using adipose-derived stem cells in radiation ulcer of a rat model,» *Journal of Biomedical Science*, vol. 20, n° 51, pp. 1-10, 2013.
- [46] J. Rodriguez, F. Boucher, C. Lequeux, A. Josset-Lamaugarny, O. Rouyer, O. Ardisson, H. Rutschi, D. Sigaudou-Roussel, O. Damour y A. Mojallal, «Intradermal injection of human adipose derived stem cells accelerates skin wound healing in nude mice,» *2015*, vol. 6, pp. 1-11, *Stem Cell Research & Therapy*.
- [47] R. Katari, A. Peloso y G. Orlando, «Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Semantic Considerations for an Evolving Paradigm,» *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 2, n° 52, pp. 1-6, 2015.
- [48] B. Bunell, M. Flaatt, C. Gagliardi, B. Patel y C. Ripoll, «Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation,» *Methods*, vol. 45, n° 2, pp. 115-120, 2008.
- [49] I. Nogueira Stocchero y G. Flosi Stocchero, «Isolation of Stem Cells from Human Adipose Tissue: Technique, Problems and Pearls,» de *Adipose Stem Cells and Regenerative Medicine*, Berlin, Springer, 2011, pp. 13-18.
- [50] S. Tajbakhsh, P. Rocheteau y I. Le Roux, «Asymmetric cell divisions and asymmetric cell fates,» *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 25, pp. 671-699, 2009.

Control de calidad de fitofármacos con la utilización de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la aplicación del análisis de componentes principales (PCA)

Quality control of phytopharmaceuticals with the use of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and the application of principal component analysis (PCA)



Javier Quesada-Espinoza¹, Renato Murillo-Masís²

Fecha de recepción: 27 de enero de 2019
Fecha de aceptación: 26 de abril de 2019

Quesada-Espinoza, J; Murillo-Masís, R. Control de calidad de fitofármacos con la utilización de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la aplicación del análisis de componentes principales (PCA). *Tecnología en Marcha*. Vol. 32-4. Octubre-Diciembre 2019. Pág 81-94.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i4.4794>



- 1 Escuela de Química y CIPRONA, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.  <https://orcid.org/0000-0003-2358-5809>
- 2 Autor de correspondencia. Escuela de Química y CIPRONA, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. Correo electrónico: renato.murillo@ucr.ac.cr.  <https://orcid.org/0000-0001-6437-6849>

Palabras clave

Fitofármacos; *Gingko biloba*; *Hypericum perforatum*; *Silybum marianum*; *Equinacea*; Resonancia Magnética Nuclear; Componentes Principales; Control de calidad.

Resumen

Los fitofármacos, aunque generalmente están compuestos de productos naturales, deben ser estrictamente controlados en cuando a su contenido de principios activos. Existen varios métodos de control de calidad entre los que se destacan la cromatografía líquida y la espectrometría de masas; en nuestra investigación llevamos a cabo un control de calidad con la utilización de Resonancia Magnética Nuclear, método el cual es de fácil utilización e interpretación, y altamente versátil, además de ser una técnica no destructiva, y consecuentemente un estudio de componentes principales para obtener una mejor visualización de los resultados. Lo que se logró demostrar es que en Costa Rica existe una gran cantidad de productos comercializados que aparentemente no contienen los principios activos que deberían tener de acuerdo al etiquetado, como pudo demostrarse en el caso de los productos de *Gingko biloba*, *Hypericum perforatum* y *Silybum marianum*. Para el caso de *Equinacea* spp, el problema de la comparación es que los diferentes productos contienen varias especies del mismo género y esto dificulta un análisis detallado. Además, el análisis de los componentes principales hizo posible demostrar que es difícil utilizar esta técnica sin un conocimiento previo de las técnicas de análisis utilizadas y qué debe interpretarse. Los resultados también indican que las regulaciones en Costa Rica no son lo suficientemente rigurosas para este tipo de productos, y estas deben ser revisadas por la Agencia Nacional Reguladora.

Keywords

Phytopharmaceuticals; *Gingko biloba*; *Hypericum perforatum*; *Silybum marianum*; *Echinacea*; Nuclear Magnetic Resonance; Principal Components; Quality control.

Abstract

The phytopharmaceuticals, although they are generally composed of natural products, must be strictly controlled regarding their content of active ingredients. There are several methods of quality control among which stand out liquid chromatography and mass spectrometry; in our research, we carried out a quality control with the use of Nuclear Magnetic Resonance, which is easy to use and interpret, and highly versatile, as well as non-destructive technique, and with this information a study of principal components was carried out in order to obtain a better visualization of the results. In this work we demonstrated that in Costa Rica there is a large number of products marketed that apparently do not contain the active ingredients that should have according to the labeling, as could be demonstrated in the case of the products of *Gingko biloba*, *Hypericum perforatum* and *Silybum marianum*. In the case of *Equinacea* spp, the problem of the comparison was that the different products contain several species of the same genus and this makes a detailed analysis difficult. In addition, the analysis of main components made it possible to demonstrate that it is difficult to use this technique without prior knowledge of the analysis techniques used, and what must to be interpreted. The results also indicate that regulations in Costa Rica are not rigorous enough for this type of products, and these should be reviewed by the National Regulatory Agency.

Introducción

Regulación

Existe una gran cantidad de plantas medicinales que tienen un uso muy sólido en las sociedades, tanto que actualmente se comercializan en forma de cápsulas, pastillas, jarabes, gránulos y otras formas. Estos productos han tenido en el público en general una gran aceptación por el sentimiento, erróneo en muchos casos, que al ser productos naturales tienen menos efectos secundarios y son mejores que los medicamentos sintéticos.

El mercado de este tipo de productos, llamados en muchos casos nutracéuticos o fitofármacos, ha tenido un crecimiento anual desde el 2000 de 5% y se estimó que globalmente era de \$30 billones para ese año [1] y para el año 2018 fue de \$126.3 billones [2]. De acuerdo a Health Canada [3] [4] se define un nutracéutico como “un producto que es aislado de un alimento y tiene un beneficio en la salud o prevención de enfermedades crónicas”. Mientras que un fitofármaco se define como “un fármaco de origen vegetal” [5].

Todos estos productos, al tener sustancias activas que pueden afectar el estado de salud de un organismo deben regularse de forma adecuada, de manera que, al igual que los medicamentos, se logre demostrar que el producto que está en el mercado es de calidad, seguro y tiene la eficacia para cual se pretende su uso.

En lo que respecta a regulación de estos productos, la FDA (Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos) aclara que “Estos productos no están destinados a diagnosticar, tratar, curar o prevenir ninguna enfermedad”. Sin embargo, en Canadá, nutracéuticos y suplementos dietéticos se consideran entre los “productos de salud naturales” regulados y autorizados por la Dirección de Productos de Salud Natural y sin Prescripción desde el 2004 [6]. En el caso de la Unión Europea no existía una regulación precisa hasta 1997, donde se inició la creación de una regulación que entró en vigor en el 2002 [7]. En esta regulación el punto principal es la seguridad, además de que estos productos deben demostrar que contienen los principios activos que indican, en las cantidades adecuadas.

En lo que respecta a Costa Rica los productos naturales están regulados por el RTCA 11.03.64:11 [8] “*Productos Farmacéuticos Productos Naturales Medicinales para Uso Humano, Requisitos de Registro Sanitario*”. En este caso, en lo referente a la identidad del producto se debe presentar una fórmula cualitativa y cuantitativa del producto, pero no se especifican claramente aspectos de los principios activos que deben contener los productos naturales.

Control de calidad

Para controlar la calidad de estos productos generalmente se requieren métodos de cromatografía líquida (HPLC) acoplado a espectrometría de masas para poder identificar los diferentes componentes que le proporcionan la actividad al producto, y, además, estos deben cuantificarse. [9] [10] [11].

A pesar de esto, existen métodos más sencillos y que requieren menos tiempo, con los que se puede hacer un control de calidad de estos productos de manera rutinaria, y que, además, sean de más sencilla visualización [12]. En este estudio, se lleva a cabo una medición de espectros de $^1\text{H-NMR}$ de muestras de varios productos naturales (*Echinacea purpurea*, *Silybum marianum*, *Gingko biloba*, e *Hypericum perforatum*) tomando como referencia productos obtenidos de mercados altamente regulados. Con los espectros obtenidos se llevó a cabo un estudio de componentes principales, para, de una manera gráfica, poder demostrar la calidad de los productos basados en estándares de referencia.

Aunque la resonancia magnética nuclear no es un método muy sensible, como la cromatografía líquida y la espectrometría de masas, es una técnica muy reproducible, no destructiva, es de preparación sencilla y de fácil aplicación.

Fitofármacos y nutracéuticos en Costa Rica

Dentro de los fitofármacos más vendidos en Costa Rica están la Echinacea (*Echinacea purpurea*), el Milk thistle -cardo mariano- (*Silybum marianum*); la hierba de San Juan (*Hypericum perforatum*) y el *Gingko biloba*.

El *G. biloba* (Ginkgoaceae) es un árbol pequeño nativo de China, pero extensamente plantado como ornamental. Los extractos estandarizados de las hojas se comercializan contra enfermedad vascular y demencia del adulto mayor. Se ha demostrado que los extractos mejoran la circulación cerebrovascular ayudando a evitar la disminución de la función cognitiva y los procesos de memoria. En la edad avanzada el ginkgo puede ejercer efectos benéficos mejorando esta circulación y ayudando con otros síntomas como el vértigo, el tinitus y pérdida de audición. [13].

Los constituyentes activos se han caracterizado como mezclas de terpenos y flavonoides. Las hojas secas contienen 0,1 - 0,25% de lactonas terpénicas, que comprenden cinco ginkgólidos (A, B, C, J, y M) y un bilobárido. El bilobárido comprende aproximadamente 30-40% de la mezcla, mientras que la ginkgólido A es el ginkgólido predominante (aproximadamente 30%). Los ginkgólidos son diterpenoides en naturaleza, mientras que el bilobárido se describe como sesquiterpenoide. El contenido de flavonoides de las hojas secas es de 0,5-1,0%, y consiste en una mezcla de mono-, di- y triglicósidos de los flavonoles kaempferol y quercetina, y algunos biflavonoides. Los extractos de ginkgo para el consumo suelen estandarizarse para contener glucósidos de flavonoides y lactonas terpénicas en una proporción de 24% a 6%, o 27% a 7%. [14] [15].

La *Silybum marianum* (Asteraceae) (cardo de leche) es una planta que se encuentra comúnmente en el área mediterránea de Europa. Las semillas producen 1,5-3% de flavonolignanos. Colectivamente denominado silimarina. Esta mezcla contiene principalmente silibina, junto con siliristina, silidianina y pequeñas cantidades de isosilibina. Tanto la silibina como la isosilina son mezclas equimolares de dos diastereoisómeros trans. La *S. marianum* es ampliamente utilizada en la medicina tradicional europea; las frutas se utilizan para tratar una variedad de trastornos hepáticos. Se ha demostrado que la silimarina protege el hígado de animales contra los efectos dañinos del tetracloruro de carbono, la tioacetamida, fármacos tales como paracetamol y algunas las toxinas como la α -amanitina. La silimarina se puede utilizar en muchos casos de enfermedad hepática y lesión, aunque sigue siendo de uso secundario en la medicina convencional. Estos compuestos parecen tener dos modos principales de acción. Actúan sobre la membrana celular de los hepatocitos inhibiendo la absorción de toxinas y en segundo lugar, debido a su naturaleza fenólica, pueden actuar como antioxidantes y eliminadores de radicales libres que causan daño hepático. [16], [17]

La *Echinacea purpurea* (Asteraceae) es una planta medicinal utilizada como inmunoestimulante y particularmente como profiláctico y tratamiento del resfriado común. Su actividad proviene de una serie de alquilamidas, amidas de ácidos poliinsaturados con isobutilamina. Estas son predominantemente dieno-diinos de 11 y 12 carbonos. También se encuentran presentes derivados del ácido cafeico, como el ácido chicórico. La actividad en realidad no puede ser adjudicada a ninguna sustancia específica, [18]. Otras plantas del mismo género como la *E. angustifolia* poseen propiedades similares, y también se encuentra presente en los preparados de Equinaceae.

Las flores secas de la hierba de San Juan (*Hypericum perforatum*, Guttiferae / Hypericaceae) se han utilizado como una planta medicinal y se ha empleado por sus propiedades antisépticas y cicatrizantes. El principal cultivo es comercializado como un antidepresivo, que se dice que es tan eficaz en su acción como los antidepresivos ampliamente prescritos.

Existe evidencia clínica considerable de que los extractos de hierba de San Juan son eficaces en el tratamiento de la depresión leve a moderada y el estado anímico.

La hierba seca contiene cantidades significativas de derivados fenólicos, incluyendo 4-5% de flavonoides, aunque se considera que la actividad antidepresiva se deriva principalmente de las estructuras de naftodiantronas tales como hipericina (aproximadamente 0.1%) y pseudohipericina (aproximadamente 0.2%), y la hiperforina. La planta fresca también contiene niveles significativos de protohipericina y protopseudohipericina, que se convierten en hipericina y pseudohipericina durante el secado y el procesamiento, como resultado de la irradiación con luz visible. [19]

En este estudio se lleva a cabo un control de calidad de los fitofármacos previamente mencionados con la utilización de ¹H-RMN los cuales se comercializan en Costa Rica. Conociendo los principios activos de cada uno de ellos, se realizó una comparación de un producto de un mercado altamente regulado con productos locales, y se efectuó un estudio de componentes principales (PCA) para poder presentar los datos de la comparación de una manera comprensible.

Procedimiento

Reactivos

Se empleó éter metil ter-butílico, metanol y cloroformo marca Sigma-Aldrich o Fluka. Cloroformo deuterado (CDCl₃), dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆) y metanol deuterado (CD₃OD) marca Sigma-Aldrich.

Adquisición de muestras

Se adquirieron cápsulas elaboradas con base en *Hypericum perforatum*, *Silybum marianum*, *Equinacea spp* y *Ginkgo biloba*. Se compraron muestras de una marca comercial aprobada en un mercado altamente regulado que certifica el contenido de compuestos a los cuales se atribuye propiedades medicamentosas. Esta se empleó como material de referencia. Por cada planta se adquirieron, además, cinco muestras de diferentes marcas locales en América Latina (M1, M2, M3, M4 y M5). Ninguna de ellas certificaba el contenido de compuestos activos. Algunas especificaban el contenido de planta por cápsula.

Preparación de las muestras para NMR

De cada producto se tomaron tres cápsulas o el equivalente correspondiente al contenido reportado por la casa comercial reconocida. Se abrieron y al contenido finamente molido se extrajo con 20 mL del metanol los productos de *H. perforatum*, *S. marianum* y *G. biloba* y con éter metil ter-butílico los productos de *Equinacea spp*. (en algunos casos no se aclaraba la especie en cuestión). Se extrajo durante 20 min en un baño ultrasónico. Se filtró y se secó al vacío a una temperatura de 40 °C. El extracto seco de *S. marianum* se disolvió en 5 mL de una mezcla de cloroformo-metanol (1:1), los de *Equinacea sp.* se disolvieron en cloroformo y en metanol el extracto de *G. biloba* y *H. perforatum*. La mitad del volumen anterior fue colocada en un balón y secada. Los extractos de *S. marianum* y el de *G. biloba* fueron redisoluertos en una mezcla CDCl₃/CD₃OD (9:1). Los extractos secos de *Echinacea spp.* fueron redisoluertos en CDCl₃ y el extracto de *H. perforatum* se redisolvió en DMSO-d₆. Un volumen de 0,5 mL de cada uno fue transferido a un tubo para muestras de NMR de 5 mm ID.

Mediciones de NMR

Todos los espectros fueron medidos en un equipo de NMR marca Bruker Ascend de 600 MHz, operando en modo protónico a una frecuencia de 600,13 MHz. Para cada espectro se adquirieron 128 escaneos, con datos colectados dentro de 64 K puntos de datos, con un ancho espectral de 20,55 ppm, un ángulo de pulso de 30 °, un retraso de relajamiento de 1 s y un tiempo de adquisición de 2,66 s. A los FIDs se les aplicó un LB = 0,3 antes de la transformación de Fourier.

Reducción y pretratamiento de datos de NMR

Todos los espectros de ¹H-NMR fueron apodizados, corregida la fase y la línea base, referenciados con respecto a la señal a 7,26 ppm del CDCl₃ o 2,49 ppm del DMSO_d₆ y se alinearon las regiones de los diferentes espectros. Se eliminaron regiones del espectro dependiendo del producto estudiado y las señales características que presenta: *S. marianum*: se trabajó la región de 5,70 ppm a 7,20 ppm; *Equinacea sp.*: se trabajó la región de 5,50 ppm a 7,20 ppm; *G. biloba*: se trabajó la región de 5,50 ppm a 8,20 ppm. Se sustrajo la región del disolvente (7,20 ppm a 7,30 ppm); *H. perforatum*: se trabajó la región de 5,80 ppm a 7,10 ppm.

Las regiones seleccionadas fueron reducidas a “buckets” espectrales de 0,02 ppm para el análisis de componentes principales. Todo lo anterior se realizó empleando el software MestReNova versión 10.0.2 (Mestrelab Research S.L.)

Análisis multivariado de los datos

Se realizó un autoescalado, normalización por área total a 1,0 y centrado de datos utilizando la media y el escalamiento se realizó utilizando Pareto el cual fue efectuado antes de realizar un análisis de componentes principales (PCA). Se aplicó un método de reconocimiento de patrones no supervisado para examinar la variación intrínseca de los datos empleando el programa Solo versión 8.0.1 (Eigenvector Research, Inc).

Resultados y discusión

Las plantas medicinales estudiadas, como se ha mencionado, presentan compuestos con estructuras químicas muy particulares de cada especie. Estas estructuras tienen espectros de ¹H-RMN que las hacen fácilmente distinguibles. Con el propósito de poder hacer un estudio comparativo de las muestras en el mercado en cuanto a su contenido de principios activos, se llevaron a cabo extracciones de cantidades iguales -según la dosis recomendada en la etiqueta de los productos- de los diferentes productos que contienen las plantas medicinales que se lograron obtener en el mercado local, y se midieron espectros ¹H-RMN de cada uno de ellos -todos en las mismas condiciones-. Además, se tomó un producto de una marca de venta en USA, considerada un mercado altamente regulado. Se analizaron 6 marcas incluyendo la marca vendida en USA. Luego de haber hecho varios extractos con el fin de optimizar los disolventes se pudo verificar que los principios activos se han extraído eficientemente.

La *Echinacea angustifolia* contiene una serie de alquilamidas diénicas-diínicas y ácido chicórico como marcadores y posibles compuestos activos. Las señales de los dobles enlaces conjugados son claramente distinguibles entre 5.70 y 7.30 ppm en el espectro ¹H-RMN [20], la figura 1a presenta el espectro ¹H-RMN (fragmento) del producto de referencia donde estos componentes son claramente distinguibles.

En la figura 1b se compara el producto de referencia con los diferentes productos locales. Como puede observarse, existe una gran diferencia en los espectros de los productos estudiados. Una posible explicación de la diferencia encontrada entre los diferentes productos puede ser que

cuando se habla de *Echinacae* existen varias especies, dentro de las que se pueden mencionar la *E. purpurea*, la *E. pallida* y la *E. angustifolia* [21], y posiblemente las especies utilizadas son diferentes en los productos. En el caso del producto de USA se trata de 80% de *E. purpurea* y 20% de *E. angustifolia*. Sin embargo, un común denominador que es necesario, es la presencia de los principios activos a los que se les adjudica la actividad inmunoestimulante.

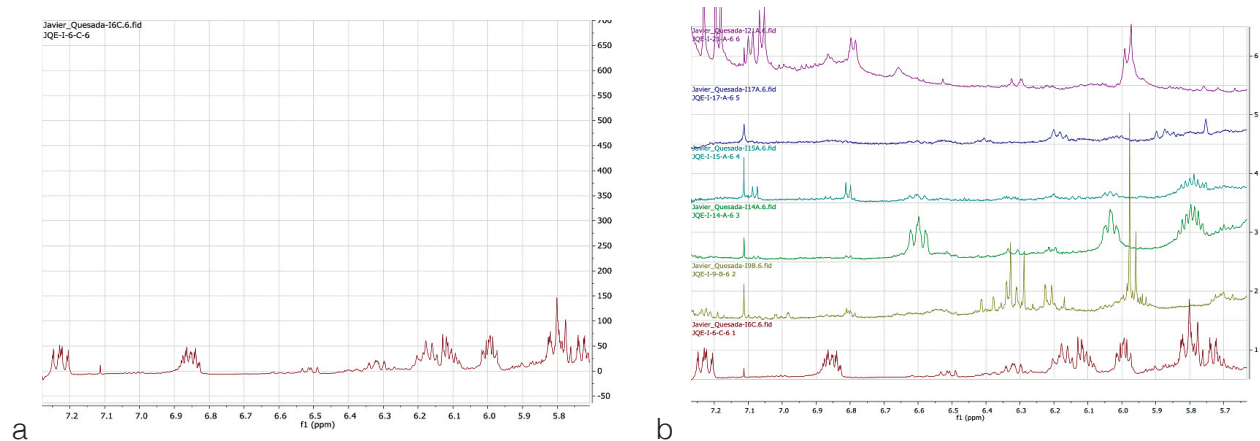
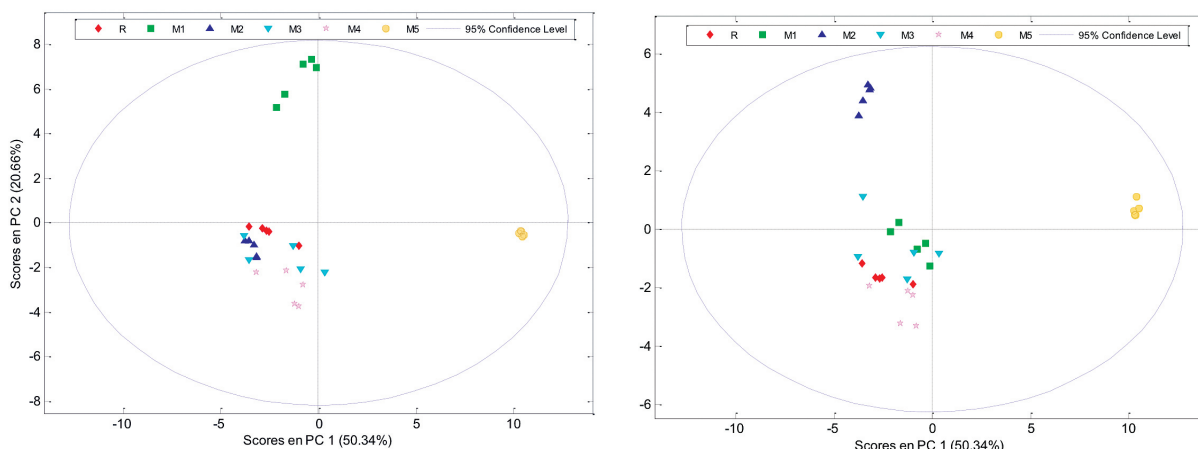


Figura 1. a) Espectro ¹H-RMN del extracto de *Echinacae purpurea* (muestra de USA) 5.70 a 7.30 ppm. (CDCl₃, 600 MHz). b) Espectros representativos de las muestras de *Echinacae* de los productos locales, (CDCl₃, 600 MHz), el espectro del producto de USA corresponde al espectro 1 (parte de abajo).

El estudio de componentes principales (PC) sugiere que no todas las muestras son diferentes como se aparenta al observar los espectros de ¹H-RMN. Existen tres marcas comerciales que se asemejan a la empleada como referencia y que otras dos no, pero estas no se parecen entre sí. Este comportamiento se observa al considerar la región del espectro ¹H-RMN entre 5.50 y 7.20 ppm.

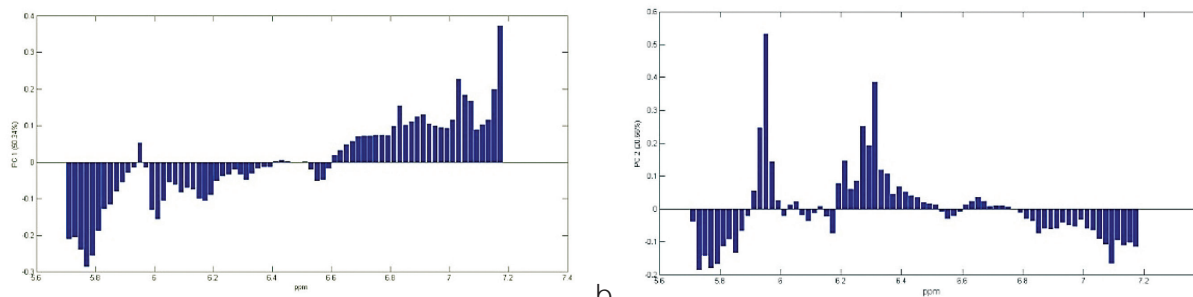
En la figura 2a se representan los dos primeros componentes (PC1 vs PC2) -que cubren alrededor del 70% de los datos del espectro-, se puede observar que PC1 separa la muestra M5 de las demás muestras y la referencia, mientras PC2 lo hace para la muestra M1. El gráfico de loading correspondiente -figura 3- (que considera el peso o efecto de las señales sobre el estudio de componentes principales) permite identificar la correlación existente entre las variables originales y los factores o componentes obtenidos en el análisis. En este caso, para la componente 1 explica que las regiones de 5.80 ppm y 7.20 son importantes en la diferenciación de M5 del resto de las preparaciones comerciales de *Echinacea*. La figura 2b. muestra que las regiones alrededor de 5.90 y 6.30 ppm diferencia a la preparación M1 de las demás. Si la representación se realiza con PC1 vs PC3 (62% de los datos), la separación de las muestras es diferente. En este caso la muestra 2 se separa del resto y la muestra 1 no lo hace, como se muestra en la figura 2b. El gráfico de loading (figura 3b.) muestra como las señales en la región de 6.00 ppm y 6.57 ppm son las que provocan la separación de la muestra 2 de las demás en una especie de intercambio con la muestra M1. Las señales de los dobles enlaces conjugados son las que producen el cambio indicado anteriormente.



a.

b.

Figura 2. a) Gráfico de score PC1 vs PC2 derivado de los espectros de $^1\text{H-RMN}$ 600 MHz de los extractos de Echinacea. b) Gráfico de score PC1 vs PC3 derivado de los espectros de $^1\text{H-RMN}$ 600 MHz de los extractos de Echinacea. En ambos gráficos se observan 5 puntos de cada color, lo que significa que de cada marca se realizaron 5 réplicas.



a.

b.

Figura 3. a) Gráfico de loading para la PC1 derivada de los espectros de $^1\text{H-RMN}$ 600 MHz de los extractos de Echinacea. b) Gráfico de loading para la PC2 derivada de los espectros de $^1\text{H-RMN}$ 600 MHz de los extractos de Echinacea.

Silybum marianum

Para el caso de *S. marianum* es bien conocido que los flavonolignanos son los componentes activos de la planta y las señales de estos compuestos son claramente distinguibles en el espectro de $^1\text{H-RMN}$. La figura 4a presenta el espectro $^1\text{H-RMN}$ del producto tomado como referencia -se muestra el ámbito de 4.3 a 7.2 ppm, donde presentan señales los componentes activos-, a saber, la silimarina.

Observando los espectros de los productos locales -presentados de manera comparativa con el producto de referencia en la figura 4, se puede observar una señal pronunciada a 5.30 ppm, típica de ácidos grasos insaturados presentes en plantas. Esta señal no se encuentra presente en el producto de referencia. Esto puede significar que las muestras locales contienen en sus extractos una alta cantidad de ácidos grasos. Esto por supuesto, va en detrimento de la cantidad de principio activo que se requiere en la cápsula para producir el efecto hepatoprotector del que se caracteriza la *S. marianum*. Esta observación podría llevar a la suposición que las muestras locales se encuentran adulteradas con otra planta con un alto contenido de ácidos grasos.

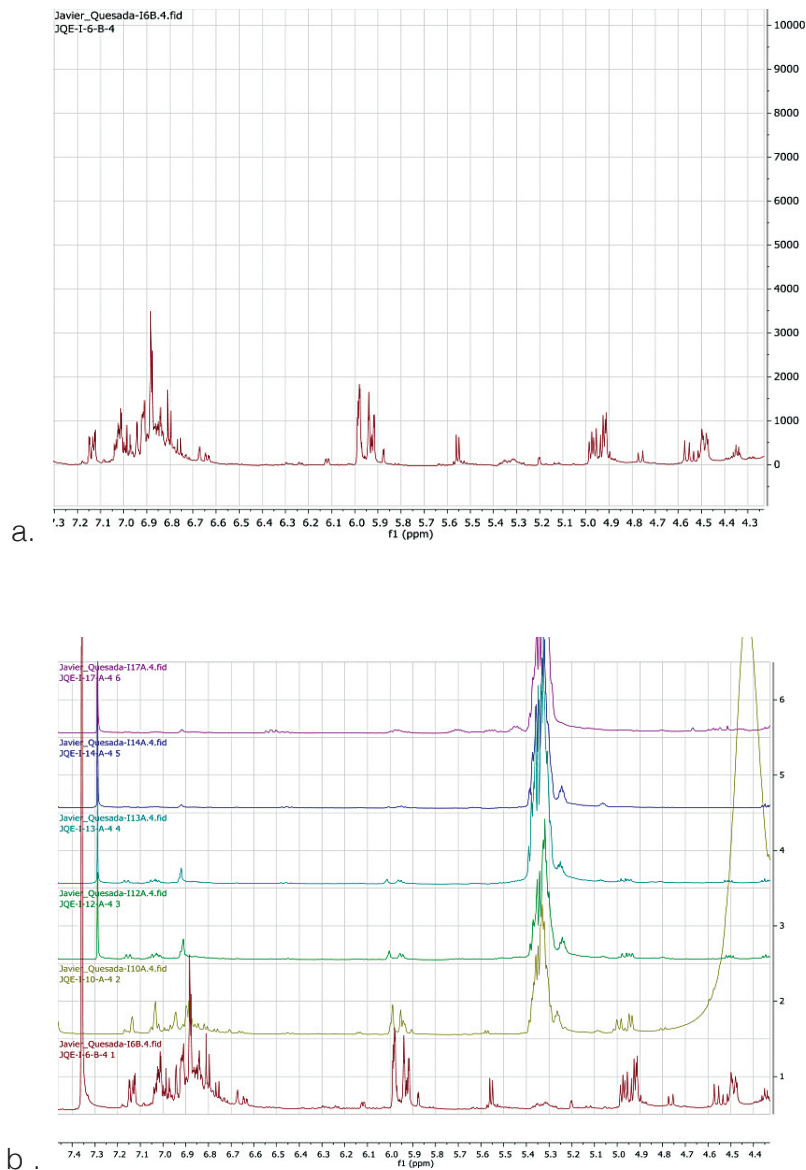


Figura 4. a) Espectro ¹H-RMN del extracto de *S. marianum* (muestra de USA) 4.20 a 7.30 ppm. (CDCl₃-CD₃OD, 600 MHz). b) Espectros ¹H-RMN de muestras de diferentes productos de *S. marianum* comparadas con el espectro del producto de referencia.

Los productos indicados como 1-10-A, 1-12-A y 1-13-A (espectros 2, 3 y 4 de la figura 4b) presentan también señales de los compuestos activos, sin embargo, tanto en esos productos, como los otros dos contienen una cantidad considerable de ácidos grasos.

La figura 5 muestra el gráfico de *scores* del análisis de componentes principales empleando las regiones del espectro entre 5.70 y 7.20 (para minimizar el efecto de las señales de los ácidos grasos se excluye la región de los ácidos grasos de 5.30 ppm). Aquí se observa como la muestra referencia se encuentra separada espacialmente de las otras muestras de productos de marcas comercializadas en Costa Rica. Esto es consistente con las observaciones efectuadas a partir de los espectros de ¹H-RMN. Significa que si existen diferencias importantes en los productos debidas a los compuestos característicos de *S. marianum* que le brindan sus propiedades hepatoprotectoras. El componente 1 es el que muestra la separación y, además, acumula casi el 74% de la varianza, por esto el componente 3 no se considera.

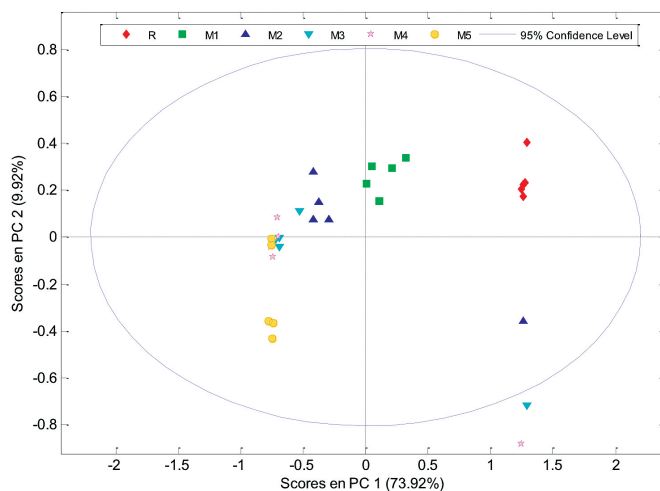


Figura 5. Gráfico de score PC1 vs PC2 derivado de los espectros de $^1\text{H-RMN}$ 600 MHz de los extractos de *Silybum marianum*.

En el gráfico de loading (no se muestra) para PC1 presenta la importancia de las señales entre 6.85 ppm y 6.91 ppm para diferenciar la muestra de referencia del resto de muestras de productos comerciales, las cuales se observan en la figura 5.

Hipericum perforatum

Los principios activos de la hierba de San Juan, son, como se discutió previamente, la hipericina y la hiperforina, sin embargo, derivados del ácido clorogénico y otros componentes, como varios flavonoides glicosilados, sirven como marcadores para la calidad de estos productos. Las señales de estos compuestos son claramente distinguibles en el espectro $^1\text{H-RMN}$.

Es importante, por el tipo de compuestos presentes, comparar las regiones entre 6.00 ppm y 8.50 ppm del espectro $^1\text{H-RMN}$. En la figura 6a se puede observar el espectro del extracto considerado como estándar, donde se observan las señales de los marcadores, de acuerdo a la literatura [22].

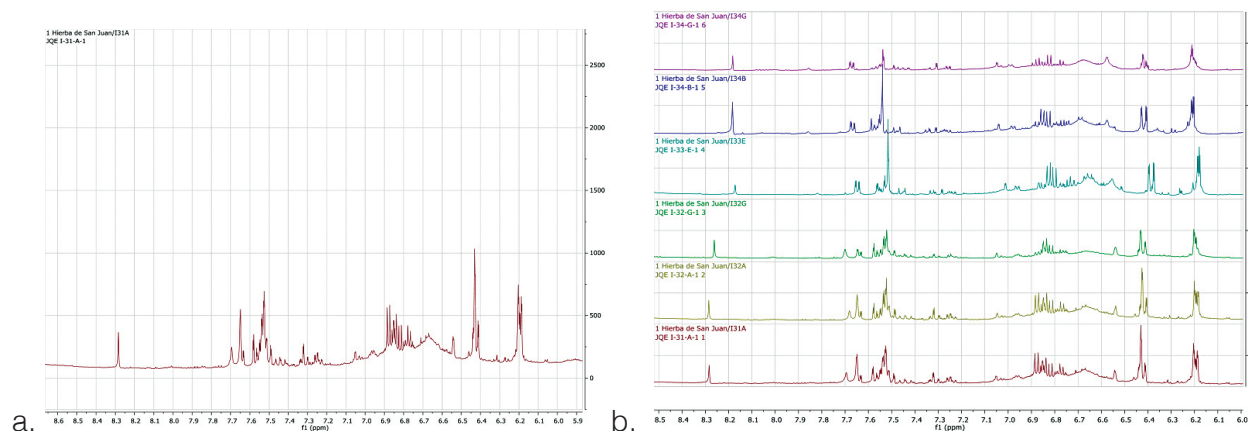


Figura 6. a) Espectros $^1\text{H-RMN}$ de *H. perforatum*. ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz), b) Espectros $^1\text{H-RMN}$ de las muestras de *H. perforatum* (DMSO deuterado, 600 MHz).

La figura 6b muestra espectros de todas las muestras estudiadas, y lo que puede observarse claramente es los mismos grupos de señales en los mismos cambios químicos que el estándar, sin embargo, un análisis más cuidadoso de las señales demuestra diferencias apreciables en los tipos de compuestos y cantidades relativas. Por ejemplo, las señales entre 6.70 ppm y 6.80 ppm de las 4 muestras superiores presentan diferencias apreciables con respecto al patrón de comparación. La misma situación se observa con las señales entre 7.60 ppm y 7.70 ppm. En vista de que son tantos los marcadores que pueden dar señales en estas regiones del espectro, se puede plantear la hipótesis que las diferencias se deben a cantidades relativas diferentes en los componentes, lo cual lleva a la duda de que los diferentes productos tengan extractos estandarizados de hierba de San Juan.

Estas diferencias se constatan en el estudio de componentes principales (figura 7) en una clara separación entre la referencia, muestras 1 y 2 y las muestras 3, 4 y 5. La componente 1 hace que se separen completamente. Según el gráfico de *loading* (no presentado) las señales a 6.05 ppm, 6.35 ppm, 6.60 ppm, 6.95 ppm y 7.08 ppm son las que producen la separación mencionada anteriormente.

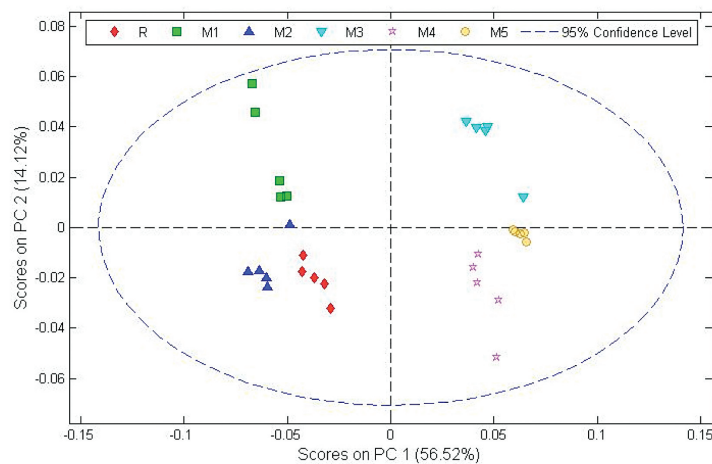


Figura 7. Gráfico de scores PC1 vs PC2 derivado de los espectros de $^1\text{H-RMN}$ 600 MHz de los extractos de *H. perforatum*.

Ginkgo biloba

Finalmente, para el caso de *G. biloba*, tanto los ginkgólidos como los bilobálidos presentan señales en $^1\text{H-RMN}$ características. [23]. Se obtuvo de la muestra de USA el espectro $^1\text{H-RMN}$ de la figura 8. En este espectro se pueden observar las señales que indican la presencia de los principios activos de la planta medicinal.

Utilizando la misma metodología y estandarizando las alturas de los espectros, se presentan los datos para las muestras del producto de USA y los 5 productos regionales. Se observa claramente la presencia escasa o casi nula de los ginkgólidos y los bilobálidos en los productos locales (figura 8b). Además, la presencia del kaemferol y la quercetina no pudo ser corroborada en los productos locales.

Al hacer el estudio de componentes principales para los diferentes productos que indican que contienen *G. biloba*, se hicieron varias modificaciones de las regiones del espectro seleccionadas

que contienen las señales de los principios activos, sin embargo, no se logró una separación visual evidente con PC1 y PC2, lo que demuestra que el estudio de componentes principales no proporciona la información que fue evidente del espectro $^1\text{H-RMN}$. En la figura 9 se presenta de manera ilustrativa los componentes PC1 y PC2 que juntos suman aproximadamente el 52% de la varianza de los datos.

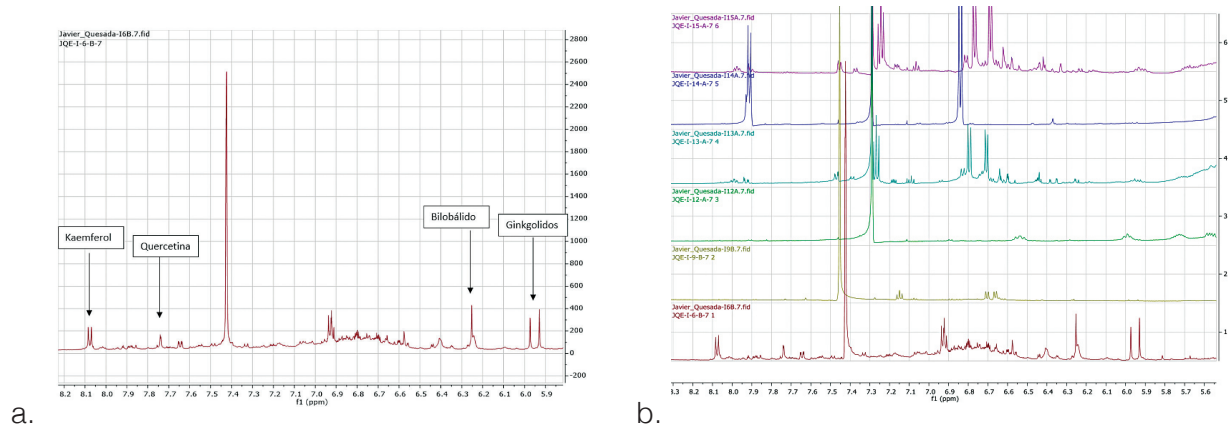


Figura 8. a) Espectro $^1\text{H-RMN}$ del extracto de *G. biloba* marca de USA -una muestra-($\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$, 600 MHz).
b) Espectros representativos de las muestras de ginkgo biloba de los productos locales, ($\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$, 600 MHz), el espectro del producto de USA corresponde al espectro 1 (parte de abajo).

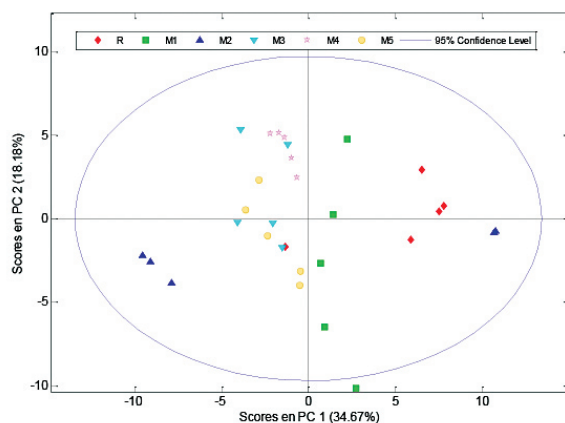


Figura 9. Gráfico de score PC1 vs PC3 derivado de los espectros de $^1\text{H-RMN}$ 600 MHz de los extractos de *Ginkgo biloba*.

El gráfico de “loading” producto del modelo generado a partir del empleo de los datos en la región de 5.50-8.20 ppm no presenta señal alguna que impacte la distribución observada en la figura 9, aspecto esperado porque no se aprecia separación.

Conclusiones

El control de calidad en los productos naturales medicinales que se encuentran en el mercado en los países en desarrollo es un tema de gran importancia, en especial, por el alto consumo que se da en estos países de este tipo de productos. La resonancia magnética nuclear,

al ser uno de los métodos más veraces en la identificación de moléculas, resulta ser una herramienta de gran utilidad para dicho control. Este método resulta de fácil visualización, no destructivo y altamente versátil, aunque poco sensible. Para poder visualizar de manera relativamente cuantitativa los resultados de este análisis metabólico, se realizó un estudio de componentes principales, donde, de una manera gráfica se puede apreciar que tan similares son unas muestras a otras con la utilización de ciertos parámetros. Esta metodología presenta, sin embargo, sus limitaciones, como pudo observarse en el caso de *G. biloba*, pero con una utilización correcta y sin perder la perspectiva de los resultados de la Resonancia Magnética Nuclear, ambas metodologías combinadas resultan de gran utilidad, para asegurar la calidad de los productos que se encuentran en el mercado, todo para el beneficio de los usuarios. De los detalles que se lograron observar es que muchos de los productos fabricados localmente no contienen los principios activos que se supone que tienen, y esto puede deberse al control deficiente por parte de las autoridades regulatorias.

Referencias

- [1] W. Andlauer and P. Fürst, "Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook," *Food Res. Int.* 35, pp. 171-176, 2002.
- [2] M. Intelligence, "NUTRACEUTICALS MARKET - GROWTH, TRENDS, AND FORECAST (2019 - 2024)," [Online]. Available: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-nutraceuticals-market-industry>. [Accessed 13 8 2019].
- [3] K. S. Bishop, C. Kao, J. Xu, M. Glucina, R. Paterson and L. Ferguson, "From 2,000 years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in," *Phytochemistry* 114, pp. 56-65, 2015.
- [4] F. Shahidi, "Nutraceuticals and functional foods: whole versus processed foods," *Trends Food Sci. Technol.* 20, pp. 376-387, 2009.
- [5] H. Schilcher, S. Kammerer and T. Wegener, „Grundlegendes zur rationalen Phytotherapie,“ in *Leitfaden Phytotherapie*, Jena, Elsevier, Urban & Fischer, 2007, pp. 1-30.
- [6] A. Smith, S. Jogalekar and A. Gibson, "Regulation of natural health products in Canada," *Regulation of natural health products in*, p. 507-510, 2014.
- [7] P. Coppens, M. da Silva and S. Pettman, "European regulations on nutraceuticals, dietary supplements, and functional foods: a framework based on safety," *Toxicology* 221, p. 59-74, 2006.
- [8] S. C. d. I. Jurídica, "http://www.pgrweb.go.cr," [Online]. Available: http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=75604&nValor3=97190¶m2=1&strTipM=TC&IResultado=1&strSim=simp. [Accessed 20 8 2019].
- [9] K. Wang, H. Zhang, L. Shen, Q. Du and J. Li, "Rapid separation and characterization of active flavonolignans of *Silybum marianum* by ultra-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 53, p. 1053-1057, 2010.
- [10] A. P. Minoja and C. Napoli, "NMR screening in the quality control of food and nutraceuticals," *Food Research International*, vol. 63, no. Part B, pp. 126-131, 2014.
- [11] N. López-Gutiérrez, R. Romero-González, J. Martínez Vidal and A. Garrido Frenich, "Quality control evaluation of nutraceutical products from *Ginkgo biloba* sing liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 121, pp. 151-160, 2016.
- [12] P. Mai Le, C. Milande, E. Martineau, P. Giraudeau and J. Farjon, "Quantification of natural products in herbal supplements: A combined NMR approach applied on goldenseal," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 165, pp. 155-161, 2019.
- [13] H.-Y. Wang and Y.-Q. Zhang, "The main active constituents and detoxification process of *Ginkgo biloba* seeds and their potential use in functional health foods," *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 83, p. Article 103247, 2019.
- [14] P. Braquet and D. Hosford, "Ethnopharmacology and the development of natural PAF antagonists as therapeutic agents," *J Ethnopharmacol* 32, pp. 122-123, 1994.

- [15] L. Xiaoyan, L. Chen, T. Liu, H. Ke, X. Gong, Q. Wang, J. Zhang and X. Fan, "Chemical analysis, pharmacological activity and process optimization of the proportion of bilobalide and ginkgolides in Ginkgo biloba extract," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 160, pp. 46-54, 2018.
- [16] B. A. Pendry, V. Kemp, M. Hughes, J. Freeman, H. Nuhu, A. Sanchez-Medina, O. Corcoran and E. Galante, "Silymarin content in Silybum marianum extracts as a biomarker for the quality of commercial tinctures," *Journal of Herbal Medicine*, vol. 10, pp. 31-36, 2017.
- [17] R. Gazák, D. Walterová and V. Kren, "Silybin and silymarin-new and emerging applications in medicine.," *Curr Med Chem*. 14(3), pp. 315-38., 2007.
- [18] R. Bruni, V. Brighenti, L. K. Caesar, D. Bertelli, N. B. Cech and F. Pellati, "Analytical methods for the study of bioactive compounds from medicinally used Echinacea species," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 160, pp. 443-477, 2018.
- [19] J. Barnes, L. Anderson and J. Phillipson, "St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties," *J Pharm Pharmac*, pp. 53, 583-600, 2001.
- [20] D. Todd, T. Gullede, E. Britton, M. Oberhofer, M. Leyte-Lugo, A. Moody, T. Shymanovich, L. Grubbs, M. Juzumaite, T. Graf, N. Oberlies, S. Faeth, S. Laster and N. Cech, "Ethanollic Echinacea purpurea Extracts Contain a Mixture of Cytokine-Suppressive and Cytokine-Inducing Compounds, Including Some That Originate from Endophytic Bacteria," *PLoS ONE* 10(5), p. e0124276, 2015.
- [21] K. A. McKeown, "A review of the taxonomy of the genus Echinacea," in *Perspectives on new crops and new uses*, Alexandria, VA, ASHS Press, 1999, p. 482-489.
- [22] E. Tatsis, V. Exarchou, A. Troganis and I. Gerothanassis, "1H NMR determination of hypericin and pseudohypericin in complex natural mixtures by the use of strongly deshielded OH groups," *analytica chimica acta* 607, p. 219-226, 2008.
- [23] J. Napolitano, T. Gödecke, M. Rodríguez-Brasco, B. Jaki, S. Chen, D. Lankin and G. Pauli, "The Tandem of Full Spin Analysis and qHNMR for the Quality Control of Botanicals Exemplified with Ginkgo biloba," *J. Nat. Prod.* 75, p. 238-248, 2012.

Whole-Body SAR Simulations on a Prolate Spheroid Using Different Plane Wave Polarizations up to 100 GHz

Simulaciones de tasa de absorción específica
(SAR) de cuerpo completo sobre un esferoide
prolato utilizando diferentes polarizaciones
de onda plana hasta 100 GHz

José Enrique Hernández-Bonilla¹, Heinz-Dietrich Brüns²,
Renato Rimolo-Donadio³, Christian Schuster⁴

Fecha de recepción: 23 de enero de 2019
Fecha de aceptación: 6 de mayo de 2019

Hernández-Bonilla, J; Dietrich Brüns, H, Rimolo-Donadio, R; Schuster, C. Whole-Body SAR Simulations on a Prolate Spheroid Using Different Plane Wave Polarizations up to 100 GHz. *Tecnología en Marcha*. Vol. 32-4. Octubre-Diciembre 2019. Pág 95-103.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i4.4795>



- 1 Escuela de Ingeniería Electrónica, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: enrique.hernandez.bonilla@gmail.com.
 <https://orcid.org/0000-0003-4712-7490>
- 2 Institute of Electromagnetic Theory, Hamburg University of Technology (TUHH). Germany.
- 3 Escuela de Ingeniería Electrónica, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: rrimolo@tec.ac.cr.
 <https://orcid.org/0000-0002-3087-9162>
- 4 Institute of Electromagnetic Theory, Hamburg University of Technology (TUHH). Germany.

Keywords

Bio-Electromagnetism; Computational Electromagnetics; High-Frequency Fields; Physical Optics; Specific Absorption Rate.

Abstract

This exploratory paper discusses the simulation of the whole-body specific absorption rate (SAR) on electrically large bodies. By irradiating a spheroid by means of a plane wave, the relationship between the radiated electromagnetic fields and the internal fields generated in the object can be studied. The SAR could be calculated with conventional numerical methods up to 9 GHz with the computational power available. To overcome this limit, an approach using physical optics is proposed to extend the simulation range up to 100 GHz. Preliminary results obtained indicate that this could be a good alternative for high frequency simulations; however, the generalization of the method and further validation would be required as future work.

Palabras clave

Alta Frecuencia; Bioelectromagnetismo; Electromagnetismo Computacional; Óptica Física; Tasa de Absorción Específica.

Resumen

Este trabajo exploratorio discute la simulación de la tasa de absorción específica (SAR) de cuerpo completo sobre objetos eléctricamente grandes. Al irradiar un esferoide por medio de una onda plana se puede estudiar la relación entre los campos electromagnéticos irradiados y los campos internos generados en el objeto. Fue posible calcular el SAR de cuerpo completo a través de métodos numéricos convencionales hasta 9 GHz con la capacidad de procesamiento computacional disponible. Para superar ese límite, se propone un acercamiento por medio de óptica física con el cual se pudo extender el rango de las simulaciones hasta 100 GHz. Los resultados obtenidos indican que este puede ser un acercamiento adecuado para simulaciones en alta frecuencia, sin embargo, se requiere generalizar el método y validarlo de forma estricta como trabajo a futuro.

Introduction

In recent years, with the advent of new technologies that work and communicate at higher frequencies, there is a need to understand more deeply the associated radiation effects on humans and living beings. Exhaustive research has been made for different applications and with different objectives, from complex 3D human models in e.g. [1]-[10], to simpler geometrical models in e.g. [11]-[16]. Most of them address the frequency range from 1 up to 6 GHz, with some studies below the GHz range [12]-[16]. However, a few works explore frequencies higher than 6 GHz [10]-[11], a range that is being used in diverse products and applications.

Computational tools to tackle electromagnetic problems are now more powerful thanks to code optimization and the availability of more processing power. This opens the possibility to study this frequency range with more detail than before; however, as the computational requirements increase with the maximum frequency of interest, the simulation of electrically large bodies remains challenging.

In this paper, results reported in [11] regarding plane-wave incidence with different polarizations on a spheroid are replicated with state-of-the-art numerical methods. The goal is to analyze the state of current tools and their ability to solve SAR computations at high frequencies when working with large bodies of a size representative of human beings. Since the available computational resources limited the analysis to a maximum frequency of 10 GHz, a method exploiting physical optics was also explored to extend the frequency range. Consistent results could be computed up to 100 GHz, although restricted for some specific configurations.

Whole-Body SAR on a prolate spheroid

For dynamic electromagnetic (EM) field simulations, various methods and tools can be used to obtain results of interest. Different numerical methods are available, which are suited to tackle different types of problems. In the scope of this paper, two methods were used to calculate the EM fields: The Finite Integration Technique (FIT), which discretizes Maxwell's Equations in their integral form, and the Method of Moments (MoM), which transforms the integral form into a linear system that can be numerically solved.

The problem of interest is a classic scenario used in bioelectromagnetics, where a prolate spheroid is irradiated by a plane wave and the goal is to calculate the total power absorbed by this body. Three different wave polarizations are used to determine the differences in power absorption, as depicted in figure 1. The utilization of a prolate spheroid is representative of the behavior expected on a human body.

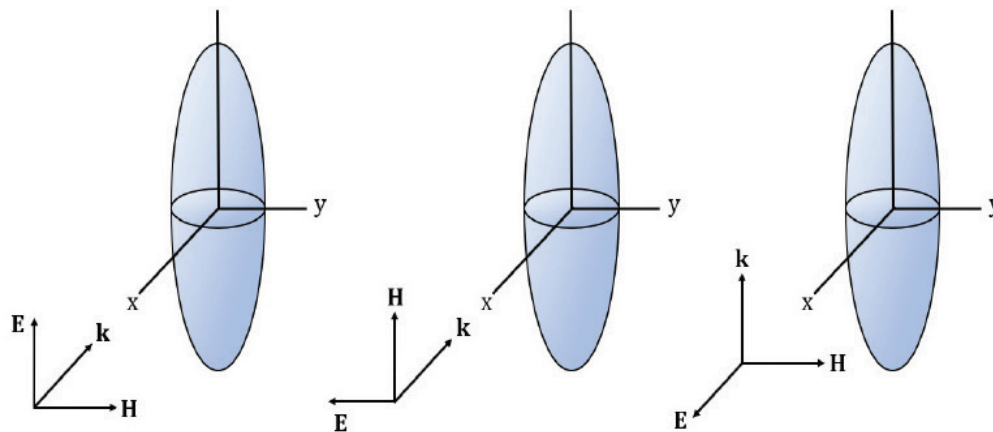


Figure 1. The problem of interest: Prolate spheroid irradiated by 3 different wave polarizations. Angle α is defined as the angle of the incident wave.

Each polarization will dictate a different behavior on the power absorption across the frequency spectrum. Four regions can be found based on the behavior of the power absorbed by the E polarization [14]. A sub-resonance region that goes up to 30 MHz exhibits an increase of the power by a factor of f^2 for all three polarizations. Next, the resonance region is identified, which spans from 30 to 300 MHz. Even though, H and K polarizations also reach a peak resonance value, they are not as high as the one obtained by E polarization. This resonance can be compared to that of a wire antenna with the difference that resonance for a biological tissue reaches its peak when the object size (major axis) is about four-tenths of the external wavelength, whereas the antenna has it when its size is half the wavelength. These differences are due to the lossy dielectric material of biological tissues and the shape of the body. The

resonance frequency depends on the size of the object. In the case of prolate spheroids, it is closely related to the ratio between the major and minor axis. If the dimensions are small, like the ones of a small child, the peak of the resonance is located at a higher frequency; if dimensions are larger, the peak shifts to a lower frequency [1]. After reaching this peak, the whole-body SAR decreases with a factor of, approximately, $1/f$. The following region is called the “Hot-Spots” region; this is due to the absorption being localized in some areas. It spans from 300 MHz to 3 GHz. As seen in figure 2, the whole-body absorption decreases. The last region goes from 3 GHz onwards and it is called the surface absorption region because all the energy absorbed is mostly localized at the surface of the body [14].

At frequencies below resonance, the SAR for E polarization is the highest, for H polarization is the lowest, and for K polarization is located between the other two. This behavior is related to the average strengths of the internal fields; for example, the internal E field is stronger when the incident E field is mostly parallel to the major axis than when it is normal to the minor axis. Also, the internal E field generated from the incident H field is greater when the cross-sectional area intercepted is large [17].

To estimate the power absorbed from the body, the use of the specific absorption rate (SAR) is a good metric for obtaining the value of interest. Thanks to the nonmagnetic characteristics of biological tissues, power absorption depends greatly on the E field strength.

SAR is defined as transferred power divided by the mass of the object [18] and it can be represented in different ways. For a time-average, the formula is given by:

$$SAR = \frac{\sigma_{eff} E^2}{2\rho} \quad [W/Kg] \quad (1)$$

Previous research [11] has shown that whole-body SAR behaves differently when plane waves are polarized in the three ways shown in figure 1. These different behaviors depend on EM field strengths, the body symmetry, and material selection.

Whole-Body SAR on a prolate spheroid using full-wave simulators

To replicate the behavior described in [11], two full-wave solvers were used; CST Microwave Studio which is a commercial tool that works in the time domain using the Finite Integration Technique (FIT) [19] and the Method of Moments (MoM)-based solver CONCEPT-II, which is an academic tool developed by the Institute of Electromagnetic Theory (TeT) of the Hamburg University of Technology (TUHH) [20]. The simulated body is a prolate spheroid with a major axis of 1.8 m and a minor axis of 0.3 m which resembles the dimensions of an adult human. The material chosen for the body is water modeled as a lossy dielectric. In order to work with a simpler geometric model, different dimensions and materials were used in comparison to [1]. Table 1 shows the differences between the two models, including the excitation sources used.

Both simulators used the same geometrical model with the same sources and material definitions. The goal was to reach the limits of the computational capabilities of the used tools up to a point where they would be unable to simulate the whole structure and obtain valid EM field values for post-processing analysis.

For the CST Microwave Studio simulations two computers were used: a local computer with 4 cores and 16 GB of RAM and a remote computer with 6 cores and 32 GB of RAM. For the CONCEPT-II simulations, a local computer with 4 cores and 16 GB was used initially but then for later simulations a server cluster was used which had 10 nodes available each one containing 6 CPUs and 32 GB of RAM.

Table 1. Model parameters for prolate spheroid.

	Durney [11]	This Paper
a (m)	0.875	0.9
b (m)	0.138	0.15
ϵ_r	42.81	78
σ_{eff} (S/m)	0.6463	1.59
Power Density (mW/cm ²)	1	1

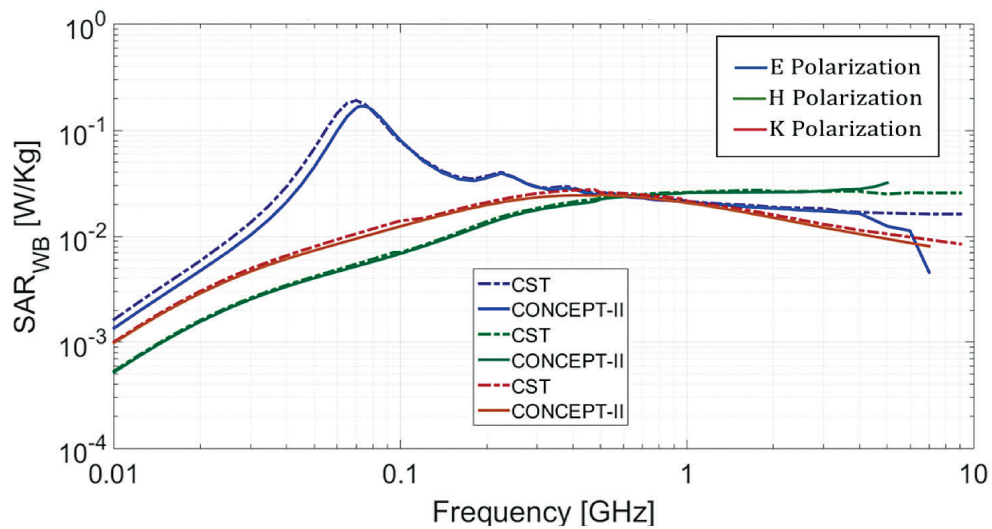


Figure 2. Whole-Body SAR for 3 polarizations using CST and CONCEPT-II.

Figure 2 shows a similarity between the whole-body SAR of the previous research and this paper; differences may be due to slightly different body dimensions and material properties. There is also a good degree of correspondence between the results provided by both solvers. Considering that the two applied numerical methods are based on very different approaches to compute the fields, this indicates that the estimated values and observed trends are consistent.

Computational capabilities differ for both tools but are close to each other. None of them reached the 10 GHz mark and results from CONCEPT-II (MoM) start to behave differently from 5 GHz for E and H polarization; this is attribute to limitations of the numerical method when calculating the field values. The use of electric and magnetic symmetry allowed the simulations to go further in frequency. Table 2 shows the computational resources used by both methods at various frequencies to calculate the whole-body SAR in E polarization.

Limitations were due to the available RAM for both tools. The higher the frequency, the bigger the amount of RAM needed to compute the fields. In table 3, the memory needed for both tools to run a simulation at 10 GHz is shown; each tool was run in a different computer and even though the MoM tool had more memory available, both reached an almost equal limit.

Table 2. Computational resources used by CST and CONCEPT-II to calculate the whole-body SAR at different frequencies in E polarization.

Solver	#CPUs	Mesh Cells / Unknowns	Frequency	Time	Memory
CST	4	16848	10-100 (MHz)	00:00:08	120.95 MB
CST	4	44331140	2-3 (GHz)	01:39:35	14368.13 MB
CST	4	75721500	5 GHz	02:45:41	14877.16 MB
CST	6	131483476	7 GHz	07:21:21	30639.31 MB
CONCEPT-II	4	1748	10-100 (MHz)	00:05:00	0.046 GB
CONCEPT-II	24	6018	100-500 (MHz)	00:05:49	0.54 GB
CONCEPT-II	60	136022	1-7 (GHz)	34:48:31	275.70 GB

Table 3. RAM needed to run simulations at 10 GHz for CST and CONCEPT-II in E polarization.

Frequency (GHz)	Unknowns (CONCEPT-II)	RAM (GB)	Mesh Cells (CST)	RAM (GB)
10	241,590	869.72	1,168,676,136	88

Whole-Body SAR on a prolate spheroid using physical optics

Due to the computational limitations of full wave simulations, alternative methods need to be used to calculate the absorption of energy by biological tissues. One of these methods is to use physical optics to calculate the absorbed power. The basic assumption is that all the energy transmitted into the body (prolate spheroid) is absorbed. This is a valid assumption as it has been found that for certain geometries the internally reflected rays may be neglected and from 6 GHz onwards, biological tissue has a depth penetration of 2.6 mm, which makes the assumption valid, that all transmitted energy is absorbed [21].

To implement this method the propagation vector of the incident wave is defined to lie in the XY plane, the formula is given by equation (2) and α is the angle of general incidence of the wave, which is defined in figure 1. The polarizations of the incident wave are represented by unit vector e_1 and e_2 , where e_1 is parallel to the plane defined by the major axis of the prolate spheroid and e_2 is perpendicular to that plane.

$$\mathbf{a}_k = \sin \alpha \mathbf{a}_x + \cos \alpha \mathbf{a}_z \quad (2)$$

$$\mathbf{e}_1 = -\cos \alpha \mathbf{a}_x + \sin \alpha \mathbf{a}_z \quad (3)$$

$$\mathbf{e}_2 = \mathbf{a}_y \quad (4)$$

The angle of incidence for every patch is obtained from equation (5) and once obtained the transmission angle can be found through equation (6).

$$\cos \theta_i = -\mathbf{a}_n \cdot \mathbf{a}_k \quad (5)$$

$$\sin \theta_t = \sin \theta_i / (\varepsilon' - j\varepsilon'')^{1/2} \quad (6)$$

Due to the prolate spheroid geometry, every patch has two reflection coefficients depending on the polarization of the incident wave. Equations (7) and (8) are used to calculate the values of the coefficients for each patch.

$$\Gamma_{\parallel} = \frac{\frac{\cos \theta_t}{(\varepsilon' - j\varepsilon'')^{1/2}} - \cos \theta_i}{\frac{\cos \theta_t}{(\varepsilon' - j\varepsilon'')^{1/2}} + \cos \theta_i} \quad (7)$$

$$\Gamma_{\perp} = \frac{\frac{\sec \theta_t}{(\varepsilon' - j\varepsilon'')^{1/2}} - \sec \theta_i}{\frac{\sec \theta_t}{(\varepsilon' - j\varepsilon'')^{1/2}} + \sec \theta_i} \quad (8)$$

Once the reflection coefficients are obtained, the transmission coefficients for each patch are calculated using equations (9) and (10).

$$\langle S_{t\parallel} \rangle = (1 - |\Gamma_{\parallel}|^2) \quad (9)$$

$$\langle S_{t\perp} \rangle = (1 - |\Gamma_{\perp}|^2) \quad (10)$$

These coefficients must be implemented in a proper manner, the incident electric field must be broken up into two components for each subarea: one parallel to the plane of incidence and one perpendicular to this plane. A method used to find these components of the incident electric field is to define a unit vector perpendicular to the plane of incidence on each patch and then find components of the incident wave polarization vector, which is parallel and perpendicular to this vector. A unit vector perpendicular to the plane of incidence is found in equation (11) [22].

$$\mathbf{a}_m = -[(\mathbf{a}_n \times \mathbf{a}_k) / \sin \theta_i] \quad (11)$$

Once this vector is obtained for each patch, equation (12) can be used to obtain the power absorbed from each patch for the parallel incident wave, where S_i is the incident power density and A_p are the projected area of each patch. For \mathbf{e}_2 is used, equation (13), with A_p defined according to equation (14) for both cases.

$$P_1 = S_i A_p \left\{ (\mathbf{e}_1 \cdot \mathbf{a}_m)^2 (1 - |\Gamma_{\perp}|^2) + [1 - (\mathbf{e}_1 \cdot \mathbf{a}_m)^2] (1 - |\Gamma_{\parallel}|^2) \right\} \quad (12)$$

$$P_2 = S_i A_p \left\{ (\mathbf{e}_2 \cdot \mathbf{a}_m)^2 (1 - |\Gamma_{\perp}|^2) + [1 - (\mathbf{e}_2 \cdot \mathbf{a}_m)^2] (1 - |\Gamma_{\parallel}|^2) \right\} \quad (13)$$

$$A_p = A_{Patch} * \cos \theta_i \quad (14)$$

Based on this methodology, an in-house implementation was used to compute the whole-body SAR was obtained for 3 different wave polarizations on the prolate spheroid up to 100 GHz.

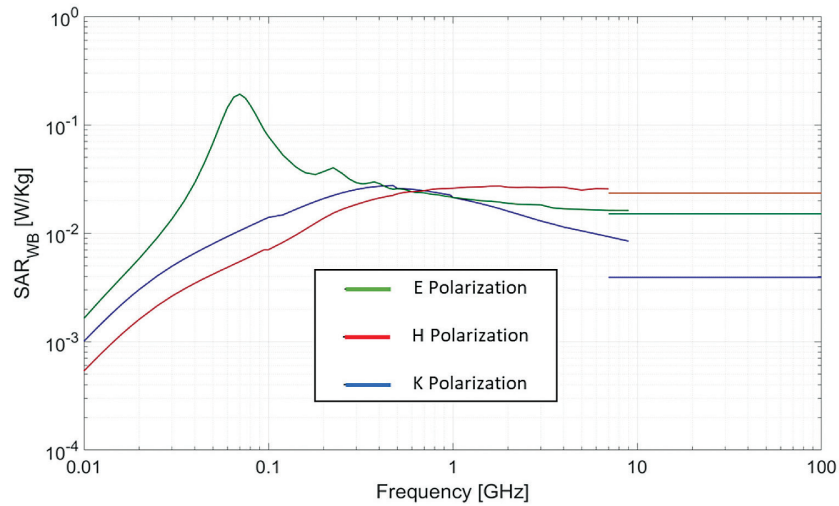


Figure 3. Whole-Body SAR for 3 polarizations up to a 100 GHz.

In Figure 3 the full frequency spectrum of interest is visualized. The whole-body SAR obtained for the high-end range (10 GHz - 100 GHz) behaves similarly to [11] for at least two of the three polarizations, which means that a good degree of correspondence was obtained with the method applied even with the small variations made between models.

For K polarization there is an obvious difference between the values from the full wave simulation and the optical approach that is not present on the other two. One possible reason for this variation is the limitations of the method used, which needs a nearly perfect “wall” of incidence or the least amount of curvature where the fields are radiating. This limitation is heavily compromised on K polarization due to the fields radiating to the curved part of the spheroid. There is also an important difference in the distance that EM fields must travel between the three polarizations. While E and H polarization traverses the narrowest part of the spheroid, K polarization must travel across the widest part of it.

Conclusions

Even though contemporary general-purpose tools for EM computation are better optimized and there is more access to powerful computational resources, high-frequency simulations for electrically large lossy dielectric bodies are still challenging. Due to the wavelength size in comparison to the size of the model of interest and the related discretization requirements, material properties, and other factors, it is difficult to study the higher parts of the frequency spectrum with traditional full-wave numerical methods.

In this work, an alternative to overcome part of these computational limitations was discussed and it was shown how physical optics could be used to obtain the power absorbed by an electrically large body in the multi GHz range. However, in its current form, the approach has limitations and works well in some scenarios only. Future work will have to address these limitations as well as a more detailed validation of the method against other alternatives.

References

- [1] A. Hirata, O. Fujiwara, T. Nagaoka y S. Watanabe, “Estimation of Whole-Body Average SAR in Human Models Due to Plane-Wave Exposure at Resonance Frequency,” *IEEE Transactions on Electromagnetic Compatibility*, vol. 52, n° 1, pp. 41-48, 2010.

- [2] E. Conil, A. Hadjem, A. Gati, M.-F. Wong y J. Wiart, "Influence of Plane-Wave Incidence Angle on Whole Body and Local Exposure at 2100 MHz," *IEEE Transactions on Electromagnetic Compatibility*, vol. 53, n° 1, pp. 48-52, 2011.
- [3] C. Lazarescu, I. Nica and V. David, "SAR in human head due to mobile phone exposure," *2011 E-Health and Bioengineering Conference (EHB)*, Iasi, 2011, pp. 1-4.
- [4] Mai Lu and Xiao-Yan Wu, "Study of specific absorption rate (SAR) induced in human endocrine glands for using mobile phones," *2016 Asia-Pacific International Symposium on Electromagnetic Compatibility (APEMC)*, Shenzhen, 2016, pp. 1084-1086.
- [5] P. Dimbylow y W. Bolch, "Whole-body-averaged SAR from 50 MHz to 4 GHz in the University of Florida child voxel phantoms," *Physics in Medicine and Biology*, vol. 52, pp. 6639-6649, 2007.
- [6] M. M. Búrdalo, A. Martín, M. Anguiano y R. Villar, "Comparison of FDTD-calculated specific absorption rate in adults and children when using a mobile phone at 900 and 1800 MHz," *Physics in Medicine and Biology*, vol. 49, pp. 345-354, 2004.
- [7] T. Nagaoka, E. Kunieda y S. Watanabe, "Proportion-corrected scaled voxel models for Japanese children and their application to the numerical dosimetry of specific absorption rate for frequencies from 30 MHz to 3 GHz," *Physics in Medicine and Biology*, vol. 53, pp. 6695-6711, 2008.
- [8] P. J. Dimbylow y O. P. Gandhi, "Finite-difference time-domain calculations of SAR in a realistic heterogeneous model of the head for plane-wave exposure from 600 MHz to 3 GHz," *Physics in Medicine and Biology*, vol. 36, n° 8, pp. 1075-1089, 1991.
- [9] M. Popović, Q. Han, and H. Kanj, "A Parallel Study of SAR Levels in Head Tissues for Three Antennas Used in Cellular Telephones: Monopole, Helix and Patch," *The Environmentalist*, vol. 25, no. 2-4, pp. 233-240, 2005.
- [10] N. Chahat, M. Zhadobov, L. Le Coq, S. I. Alekseev y R. Sauleau, "Characterization of the Interactions Between a 60-GHz Antenna and the Human Body in an Off-Body Scenario," *IEEE Transactions on Antennas and Propagation*, vol. 60, n° 12, pp. 5958-5965, 2012.
- [11] C. H. Durney, *Radiofrequency Radiation Dosimetry Handbook*. Springfield, VA: National Technical Information Service, 1978.
- [12] E. Cocherova, J. Surda, O. Ondracek and V. Stofanik, "RF Field Orientation Influence on the Specific Absorption Rate in a Biological Object," *2008 14th Conference on Microwave Techniques*, Prague, 2008, pp. 1-3.
- [13] Z. Pšenáková y M. Beňová, "Evaluation of SAR (Specific Absorption Rate) in multilayer structure of biological tissues near ear with cochlear implant," *2017 18th International Conference on Computational Problems of Electrical Engineering (CPEE)*, Kutna Hora, 2017, pp. 1-3.
- [14] E. Cocherova, J. Surda, J. Pucik, and V. Stofanik, "Dependence of the RF field absorption on the human body dimensions," *2009 19th International Conference Radioelektronika*, 2009.
- [15] J. A. Carballo-Madrugal, H.-D. Brüns, R. Rímolo-Donadio y C. Schuster, "Full-Wave Simulation of Body Absorption due to Radiated Fields at GHz Frequencies," *Tecnología en Marcha*, 2018.
- [16] A. G. Canseven and N. Seyhan, "Ellipsoid models for human and guinea pigs exposed to magnetic fields," *2003 IEEE International Symposium on Electromagnetic Compatibility, 2003. EMC '03.*, Istanbul, 2003, pp. 1227-1231 Vol.2.
- [17] C. Furse, D. Christensen, and C. Durney. "Basic introduction to bioelectromagnetics," 1st Ed. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, 2009.
- [18] D. M. Pozar, *Microwave engineering*. New York, NY: Wiley, 1998.
- [19] Computer Simulation Technology (CST). *Microwave Studio (MWS)*. [Available Online]: <http://www.cst.com>.
- [20] Electromagnetic Theory Institute, Technische Universität Hamburg (TET-TUHH). *CONCEPT-II*. [Available Online]: <http://www.tet.tu-harburg.de/concept/>.
- [21] H. J. Liebe, G. A. Hufford, and T. Manabe, "A model for the complex permittivity of ice at frequencies below 1 THz," *International Journal of Infrared and Millimeter Waves*, vol. 12, no. 7, pp. 677-682, 1991.
- [22] G. I. Rowlandson and P. W. Barber, "Absorption of higher-frequency RF energy by biological models: Calculations based on geometrical optics," in *Radio Science*, vol. 14, no. 6S, pp. 43-50, Nov.-Dec. 1979.

Nuevo índice para valorar la calidad de aguas superficiales en Costa Rica


New index for evaluating the surface waters quality in Costa Rica

Guillermo Calvo-Brenes¹

Fecha de recepción: 25 de enero de 2019
Fecha de aceptación: 11 de mayo de 2019

Calvo-Brenes, G. Nuevo índice para valorar la calidad de aguas superficiales en Costa Rica. *Tecnología en Marcha*. Vol. 32-4. Octubre-Diciembre 2019. Pág 104-115.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i4.4796>

1 Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: gcalvo@tec.ac.cr.
 <https://orcid.org/0000-0002-7021-3509>



Palabras clave

Calidad del agua; índices de calidad del agua; recurso hídrico.

Resumen

El agua es esencial para el mantenimiento de la vida humana, animal y vegetal. En muchos países en desarrollo, existe una permanente degradación de los recursos de agua dulce – en términos de cantidad y calidad – y de los ecosistemas acuáticos. El incremento de agentes contaminantes en las aguas es cada vez mayor debido a actividades antropogénicas. La evaluación de la calidad de un río se puede llevar a cabo por medio del uso de índices, los cuales se caracterizan por sintetizar una gran cantidad de información y que es fácil de entender e interpretar. El objetivo de esta investigación fue establecer el procedimiento para el cálculo de los SI para varios indicadores teniendo en consideración la normativa nacional y las condiciones ambientales del país. Se incluyen fórmulas matemáticas para transformar la concentración de 20 indicadores de calidad a sus respectivos subíndices y poder utilizar el nuevo índice de calidad propuesto. La importancia de esta nueva metodología es que permitirá la creación de nuevos ICAs aplicables a las condiciones ambientales de cada país y adaptada a su propia legislación.

Keywords

Water quality; water quality index; hydric resource.

Abstract

Water is essential for the maintenance of human, animal and plant life. In many developing countries, there is a permanent degradation of freshwater resources - in terms of quantity and quality - and the aquatic ecosystems as well. The increase of pollutants in the water is increasing due to anthropogenic activities. The evaluation of the quality of a river can be carried out using indexes, which are characterized by synthesizing a large amount of information that is easy to understand and interpret. The objective of this investigation was to establish the procedure for the calculation of the SI for several indicators taking into consideration the national regulations and the environmental conditions of the country. Mathematical formulas are included to transform the concentration of 20 quality indicators to their respective sub-indices and to use the new proposed quality index. The importance of this new methodology is that it will allow the creation of new ICAs applicable to the environmental conditions of each country and adapted to its own legislation.

Introducción

El agua es esencial para el mantenimiento de la vida humana, animal y vegetal. Además, forma parte de diversas actividades productivas como la agrícola, la generación de energía hidroeléctrica, la industrial, la pesca, el turismo y el transporte. La insuficiencia de agua o la sequía prolongada puede provocar la muerte generalizada y el deterioro económico. En muchos países en desarrollo, existe una permanente degradación de los recursos de agua dulce – en términos de cantidad y calidad – y de los ecosistemas acuáticos. Esto implica menores beneficios, menor apoyo a la vida y mayores riesgos y peligros relacionados con el agua [1]. La Organización Mundial de la Salud ha dicho que el 80% de las enfermedades del mundo se debe a problemas con el agua [2] [3] [4].

Las causas principales de contaminación del recurso hídrico son tanto naturales como antropogénicas y usualmente estas últimas son las de mayor impacto [5]. La fuente de la contaminación puede ser la local o puntual y la difusa. La local ocurre alrededor de la fuente contaminante, tales como la minería, las instalaciones industriales, aguas residuales domésticas u otras instalaciones. Por otra parte, la contaminación difusa está asociada al transporte de contaminantes a lo largo de amplias zonas frecuentemente alejadas de la fuente de origen, tal como ocurre con la agricultura, la densidad vehicular y la deposición de material particulado transportado a causa de erosión eólica o hídrica [6]. Costa Rica es un país privilegiado con respecto a la cantidad de ríos y mantos acuíferos que posee; desafortunadamente, los niveles de contaminación de los ríos que atraviesan zonas de alta densidad poblacional son altos [7]. El incremento de agentes contaminantes en las aguas es cada vez mayor debido a actividades antropogénicas. Cada año se registran más de 1000 nuevos contaminantes en las aguas producto de la actividad industrial [8] [9].

La determinación de la calidad de un cuerpo de agua usualmente conlleva el análisis de una cantidad grande de indicadores [10]. Si varios indicadores se integran de forma que generan un solo valor, se les denomina índices [11] [12]. Por tanto, un índice es usado para sintetizar una gran cantidad de información de muchas variables o indicadores, que se transforman en una sola variable y que es fácil de entender e interpretar [13] [14]. Para que un índice sea práctico, debe de reducir una cantidad grande de indicadores a una forma más simple, proceso en el cual algo de la información se sacrifica. Sin embargo, un buen diseño del índice conlleva a que el valor suministrado por el índice sea representativo de la calidad del agua y de su tendencia [14] [15].

Un índice puede ser representado por un número, un rango, una descripción verbal, un símbolo o un color [12]. Estos pueden ser elaborados sobre la base de un uso general del agua o sobre usos específicos [16]. Existen varias expresiones matemáticas para el cálculo del ICA. Durante las últimas tres décadas, se han desarrollado una serie de funciones matemáticas de agregación; sin embargo, varias de ellas producen resultados engañosos bajo ciertas circunstancias [17] [18]. El desarrollo de un nuevo índice involucra usualmente 5 etapas [12] [17] [19]:

- a) selección de los indicadores de calidad
- b) elección de una fórmula de agregación para el cálculo del índice
- c) determinación de un factor de ponderación (W_i) para cada indicador, en el caso que la expresión matemática lo contemple
- d) transformación de cada indicador de calidad a su respectivo subíndice (SI)
- e) agregación de los SI para el cálculo del ICA usando la fórmula de agregación seleccionada en el punto b.

El cálculo de los SI es una de las etapas importantes de todo este proceso. Consiste en la normalización de los distintos indicadores de calidad seleccionados para el cálculo del ICA, por medio de funciones matemáticas [20]. Si bien existen varias fórmulas para el cálculo de los SI, estas fueron desarrolladas en otros países donde la normativa y las condiciones ambientales son diferentes, por lo que su uso genera distorsiones significativas en el cálculo del ICA [16] [18].

La mayoría de los ICAs fueron elaborados empleando una escala de 0-100% pero para efectos de simplificación, la interpretación de la calidad del agua se da en rangos de calidad o clases y sus respectivos colores [21] [16].

La legislación costarricense recomienda el uso de dos índices para evaluar la calidad del agua en ríos: el sistema Holandés para valorar la calidad fisicoquímica y el BMWP-CR (Biological

Monitoring Working Party, modificado para Costa Rica) que evalúa la calidad por medio de fauna bentónica [22]. Estudios comparativos entre ICAs propuestos con respecto al Holandés han demostrado que este último sobrevalora la calidad de las aguas, principalmente por tratarse este de un índice compuesto de tres indicadores de calidad, lo cual no permite una adecuada valoración de la calidad de los ríos [9] [23] [24].

El objetivo de esta investigación fue establecer el procedimiento para el cálculo de los SI para varios indicadores teniendo en consideración la normativa nacional y las condiciones ambientales del país. Además, se incluye un nuevo ICA para valorar la calidad de los ríos en Costa Rica el cual fue elaborado y evaluado anteriormente usando la normativa nacional. La importancia de esta nueva metodología es que permitirá la creación de nuevos ICAs aplicables a las condiciones ambientales de cada país y adaptada a su propia legislación.

Materiales y métodos

Selección de los indicadores

Los distintos indicadores de calidad pueden ser clasificados globalmente en tres categorías [21]: físico, químico y biológico. En general, los indicadores seleccionados deben tener relación con aspectos de la salud (presencia de microorganismos o metales pesados), así como aspectos físicos y químicos, que afecten la calidad del agua [25]. Diferentes indicadores de la calidad del agua tienen diferentes niveles de importancia en distintos tiempos, así como lugares [21] [26].

Se seleccionaron los siguientes indicadores para el estudio por ser de los más importantes [9] [16]: alcalinidad, amoníaco, cloruros, coliformes fecales, conductividad, demanda bioquímica de oxígeno, dureza, fenoles, fosfatos, fósforo de fosfatos, nitratos, nitrógeno amoniacal, oxígeno disuelto, pH, porcentaje de saturación de oxígeno, sólidos suspendidos totales, sólidos totales, sulfatos y turbiedad.

Selección de la fórmula de agregación

Singh y sus colaboradores [17] hicieron un resumen de las distintas ventajas y desventajas que presentan algunas fórmulas de agregación, basado en los trabajos de Ott [15], Smith [27], Cude [26] y Swamee y Tyagi [13]. Calvo-Brenes [16] llevó a cabo una recopilación de esta información.

Se seleccionó la fórmula (1) de Dojlido, Raniszewki and Woyciechowska [28] ya que en estudios anteriores mostró una mayor sensibilidad a los cambios generados por varios indicadores. Además, los resultados de calidad del agua obtenidos con la aplicación de dicha fórmula corresponden a las condiciones de calidad observadas en los ríos durante los muestreos [9] [16].

$$ICA = \sqrt{\frac{n}{\sum_{i=1}^n \frac{1}{SI^2}}} \quad (1)$$

donde:

ICA es Índice de Calidad del Agua

SI es el subíndice de cada indicador

n es el número total de indicadores utilizados en el cálculo.

Escalas de calidad del agua

Las categorías, esquemas o escalas de clasificación son un punto de igual o mayor interés que los anteriores, pues es aquí donde finalmente el valor obtenido del índice totalizado por la fórmula de agregación es transformado en un dato cualitativo que define la calidad final del agua [29].

Se utilizó la escala de clasificación propuesta por Landwehr [30] la cual se muestra en el cuadro 1. Se han presentado otras escalas para valorar la calidad del agua por otros autores, similares a la de Landwehr o diferentes a esta; sin embargo, no se reporta que hayan sido tan adecuadamente elaboradas por medio de un panel de expertos de tal magnitud como lo reporta Landwehr [16].






Cuadro 1. Clasificación de la calidad del agua por rangos y calidades

Rango	Cualidad
90-100	Excelente-Muy Buena
75-90	Buena
45-75	Media
20-45	Mala
0-20	Muy Mala

Fuente: Landwehr, 1974.

Conviene ajustar esta escala a la reglamentación nacional [22] por lo que quedaría de la forma en que se expresa en el cuadro 2. Además, se ajustan los límites para evitar ambigüedades en la interpretación. De esta forma, la escala de Landwehr quedó ajustada a la escala por clases que usa nuestra legislación.

Cuadro 2. Clasificación de la calidad del agua por rangos y calidades

Rango	Clase	Nivel de Contaminación	Color
90,0 - 100	1	Ninguno	
75,0 - < 90,0	2	Incipiente	
45,0 - < 75,0	3	Moderado	
20,0 - < 45,0	4	Severa	
0 - < 20,0	5	Muy severa	

Cálculo de subíndices

Una alternativa adecuada y relativamente fácil para desarrollar fórmulas de cálculo para SI ajustados a la normativa nacional, es correlacionando concentraciones de cada indicador con valores específicos prefijados de SI (%), que estén asociados a los ámbitos de permisibilidad

indicados en el reglamento de una región o país. Una vez efectuada la etapa anterior, se procede a definir las funciones matemáticas que integren los puntos seleccionados [16].

Se procedió a asociar cada valor limítrofe, por clase de esta figura con el respectivo valor del SI del cuadro 3 y asociándolo con la información del cuadro 2.

Cuadro 3. Rangos de concentración de algunos indicadores para clasificar las clases y calidades del agua, según la normativa costarricense

Parámetros Complementarios (Unidades)	Clase 1	Clase 2	Clase 3	Clase 4	Clase 5
Turbiedad (UNT)	<25	25 a <100	100 a 300	(1)	(1)
Temperatura (°C)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)
Potencial de hidrógeno (pH)	6,5 a 8,5	6,5 a 8,5	6,0 a 9,0	5,5 a 9,5	5,5 a 9,5
Nitratos, NO ₃ ⁻ (mg N /L)	<5	5 a <10	10 a <15	15 a <20	>20
Demanda Química de Oxígeno (mg/L)	<20	20 a <25	25 a <50	50 a <100	100 a 300
Cloruros (como Cl) (mg/L)	<100	100 a 200	NA	NA	NA
Fluoruros (como F) (mg/L)	<1,0	1 a 1,5	NA	NA	NA
Color (Pt-Co)	2,5 a 10	10 a 100	(1)	(1)	(1)
Sólidos Suspendidos Totales (mg/L)	<10	10 a 25	25 a 100	100 a 300	>300
Sólidos Disueltos (mg/L)	<250	250 a <500	500 a 1000	>1 000	> 1 000

Fuente: MINAE, 2007

Luego se procede de la siguiente forma: el límite inferior de permisibilidad de la Clase 1 se asocia con un valor de SI=100%, al valor inferior de la Clase 2 se le asigna un SI=90, al límite inferior de la Clase 3 le corresponde un SI=75%, al límite inferior de la Clase 4 se relaciona con un SI=45%, y finalmente, al límite inferior de la Clase 5 se asocia con un valor de SI=20. Entonces, en el caso de los sólidos suspendidos totales (cuadro 4), el límite inferior para la Clase 1 corresponde a 0 mg/L en concentración de sólidos suspendidos totales, el límite inferior de la Clase 2 es 10 mg/L, para la Clase 3 el inferior es 25 mg/L, el de la Clase 4 es 100 mg/L y el de la Clase 5 es 300 mg/L.

Cuadro 4. Relación de los valores del ICA en cada límite de permisibilidad de las distintas clases

Parámetros complementarios (Unidades)	Clase 1	Clase 2	Clase 3	Clase 4	Clase 5
Sólidos Suspendidos Totales (mg/L)	< 10	10 a 25	25 a 100	100 a 300	> 300
	↑	↑	↑	↑	↑
	SI = 100 %	90 %	75 %	45 %	20 %

Posteriormente, las curvas de mejor ajuste se generaron con el programa de cómputo CurveExpert Professional 2.2.0.

Cálculo de ICA

El cálculo del ICA se llevó a cabo utilizando la fórmula de agregación 1 en el cual se ingresan cada uno de los SI calculados. Se utilizaron datos de análisis fisicoquímicos y microbiológicos obtenidos en varios ríos distribuidos en el Gran Área Metropolitana y la Península de Osa. El muestreo se efectuó por un período de 12 meses evaluados mensualmente desde Noviembre del 2010 a Octubre 2011 [9].

Se utilizaron solamente datos promedio de períodos trimestrales de análisis efectuados en la desembocadura de los ríos Torres, María Aguilar, Rincón, Tigre y Agres.

Resultados y discusión

Cálculo de los SI

La figura 1 representa el cálculo en los sólidos suspendidos totales, cuyos valores de SI se asocian a los límites de permisibilidad inferior y superior en cada clase para generar la curva de mejor ajuste, de acuerdo a la metodología anteriormente descrita.

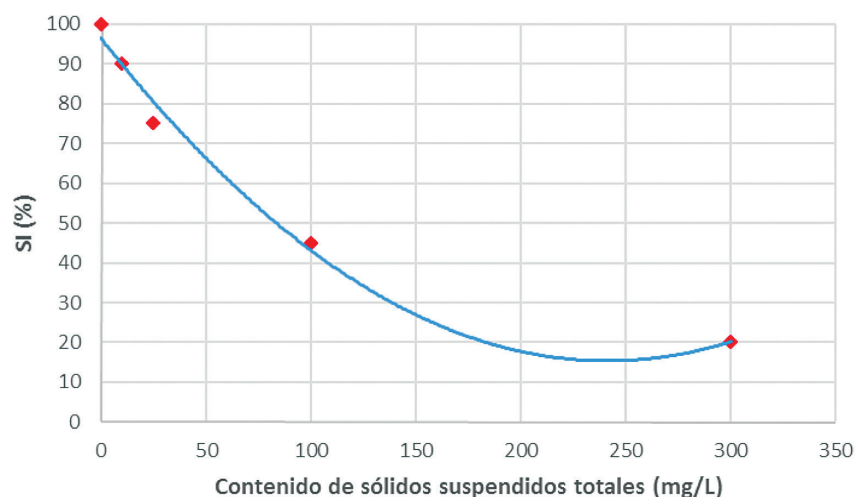


Figura 1. Elaboración de una fórmula para transformar el contenido de SST a SI

El cuadro 5 presenta las transformaciones para el cálculo de los SIs para cada indicador. La mayoría se logró determinar basado en la normativa nacional; en otros casos donde no existe información en nuestra legislación, se utilizaron transformaciones recomendadas por otros investigadores, como fue el caso de Cude [26], Dinius [31] y Stoner [32].

Un indicador importante de mencionar (en el cuadro 5) es la fórmula de cálculo del SI para el contenido de oxígeno disuelto (OD) que presenta Cude [26]. Un contenido de oxígeno disuelto (OD) que represente un SI=100% empleando su fórmula de cálculo corresponde a un OD=11,0 mg de oxígeno/L, pero como el contenido de oxígeno disuelto en el agua depende de la temperatura, este valor se obtendría si la temperatura del agua fuera de 11°C, en un nivel de saturación y una presión atmosférica de 101.3 KPa. La temperatura de las aguas de nuestros ríos usualmente es de (20-25)°C, lo que corresponde a valores de OD=(7,0-7,7) mg/L a nivel de saturación y a 1400 metros de altitud. Nuevamente, se tiene una situación en la que la fórmula de cálculo propuesta por Cude no se aplica a las condiciones ambientales de nuestro país. Otro aspecto importante para considerar es que el valor de 5,0 mg de oxígeno disuelto/L es

crítico, ya que valores por debajo de este dato dificultan la vida de los peces en los ríos. Esta consideración se contempló para la propuesta de una nueva fórmula de cálculo del OD (ver cuadro 5).

Cuadro 5. Fórmulas para el cálculo del subíndice (SI) para varios indicadores de la calidad del agua a través de una estandarización de la concentración de cada indicador

INDICADOR	AUTOR	FORMULA
Alcalinidad	Propuesta nueva	$SI = a + bx + cx^2 + dx^3 + ex^4$ donde $a= 100,125$, $b= -0,7097$, $c=0,012191$, $d = -1,4834 \cdot 10^{-4}$, $e = 4,6307 \cdot 10^{-7}$ $SI = 10$ para $X > 140$
Amoniaco	Propuesta nueva	$SI = ae^{bx}$ donde $a= 102,7848$, $b= -0,2910088$ $SI = 10$ para $x > 8$
Cloruros	Propuesta nueva	$SI = \frac{(a+bx)}{(1+cx+dx^2)}$ donde $a= 100,00$, $b= -0,1000$, $c= -3,333 \cdot 10^{-4}$, $d = 3,333 \cdot 10^{-6}$ $SI = 10$ para $X > 750$
Coliformes fecales	Propuesta nueva	$SI = 100$ para $X \leq 1$ $SI = -3,6298 \ln(x) + 100,32$ para $1 < X \leq 1000$ $SI = 9,3566(\ln(x))^2 - 178,55 \ln(x) + 861,82$ para $1000 < X \leq 15000$ $SI = 10$ para $X > 15000$
Conductividad	Stoner	$SI = +100 - 0,0002X^2$ para $X < 700$ $SI = 0$ para $X \geq 700$
Demanda bioquímica de oxígeno	Propuesta nueva	$SI = \frac{ab+cx^d}{b+cx^d}$ donde $a= 98,84689$, $b= 235,2236$, $c = -4,829346$, $d = 2,470089$ $SI = 10$ para $X > 20$
Dureza	Dinius	$SI = 10^{(1,974-0,00132X)}$
Fenoles	Stoner	$SI = +100 - 100X$ para $X < 1,0$ $SI = 10$ para $X \geq 1$
Fosfatos	Propuesta nueva	$SI = a + bx + cx^2 + dx^3$ donde $a= 99,76275$, $b= -95,18685$, $c=37,73048$, $d = -5,042201$ $SI = 10$ para $X > 3,7$
Fósforo de fosfatos	Propuesta nueva	$SI = a + bx + cx^2 + dx^3$ donde $a= 99,759$, $b= -291,678$, $c=354,29$, $d = -145,089$ $SI = 10$ para $X > 1,2$
Nitratos	Propuesta nueva	$SI = 10$ para $X \geq 23$ $SI = a+bx+cx^2 + dx^3$ donde $a=99,29607$, $b=0,4259834$, $c= -0,4072464$, $d= 9.420290 \cdot 10^{-3}$

continúa...



...Continuación

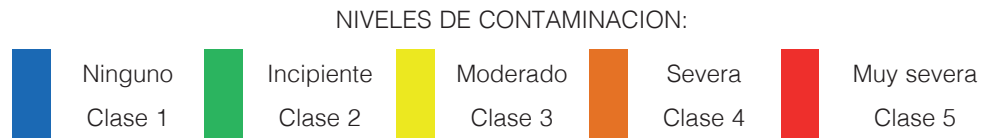
INDICADOR	AUTOR	FORMULA
Nitrógeno amoniacal	Propuesta nueva	$SI = \frac{1}{a+bx^c}$ donde a= 9,935773 10^{-3} , b= 3,681907 10^{-3} , c= 1,580439 SI = 10 para X > 9
Oxígeno disuelto	Propuesta nueva	$SI = \frac{ax^b}{c^b+x^b}$ donde a=141,0464 b=2,283152, c= 5,30566 SI = 10 para X < 1,75 SI = 100 si SI >100
pH	Cude	SI = 10 para X < 4 SI = +2,628e ^{+0,5200X} para 4 ≤ X < 7 SI = 100 para 7 ≤ X ≤ 8,0 SI = 100e ^{-0,5188(X-8)} para 8 < X ≤ 11,0 SI = 10 para X > 11
Porcentaje de saturación de oxígeno (0-100%)	Propuesta nueva (0-100%)	$SI = a + bx + cx^2 + dx^3 + ex^4$ donde a=178,5266, b=-13,3111, c=0,3717939, d = -3,908086 10^{-3} , e= 1,442735 10^{-5} SI = 10 para X < 30
Porcentaje de saturación de oxígeno (100 - >130%)	Propuesta nueva (100 - >130%)	$SI = \frac{(a+bx)}{(1+cx+dx^2)}$ donde a= 175,5930, b= -1,339841, c= -1,474162 10^{-3} , d = -4,364949 10^{-5} SI = 10 para X > 130
Sólidos suspendidos totales	Propuesta nueva	$SI = \frac{a+bx}{(1+cx+dx^2)}$ donde a = 100,1271, b = -0,2002545, c = 1,04527 10^{-2} , d= -2,384969 10^{-5} SI = 10 para X > 800
Sólidos totales	Propuesta nueva	SI = 10 para X ≥ 1750 SI = 100 para X ≤ 1 $SI = \frac{(a+bx)}{(1+cx+dx^2)}$ donde a= 100,0154, b= -9,740514 10^{-3} , c= 1,445411 10^{-4} , d = 6,835947 10^{-7}
Sulfatos	Propuesta nueva	$SI = \frac{(a+bx)}{(1+cx+dx^2)}$ donde a= 100,00, b= -0,1666, c= -1,444 10^{-3} , d = 2,222 10^{-6} SI = 10 para X > 550
Turbiedad	Propuesta nueva	$SI = \frac{ab+cx^d}{b+x^d}$ donde a= 99,7988, b= 484,5982, c = -283,7007, d = 0,7688 SI = 10 para X > 700

Finalmente, el cuadro 6 muestra el ICA calculado a varios ríos en base a datos de muestreos efectuados en el pasado [9], utilizando fórmulas de transformación para el cálculo de los SI del cuadro 5 y empleando la fórmula de agregación 1.

Cuadro 6. Evaluación del ICA en varios ríos de Costa Rica en su desembocadura

Río	Período Timestral				Promedio
	I	II	III	IV	
Maria Aguilar	22.5	19.7	19.1	17.4	19.7
Torres	17.8	16.4	15.1	15.0	16.1
Segundo	57.0	61.9	60.7	52.3	58.0
Rincon	83.0	84.3	87.9	89.4	86.1
Tigre	34.2	28.5	49.0	50.1	40.4
Agres	59.1	67.1	58.2	53.1	59.4

Fuente: Modificado de Calvo-Brenes, 2013



Conclusiones y recomendaciones

La selección de un ICA adecuado es importante con el fin de evaluar la calidad del recurso hídrico. La evaluación de los niveles de concentración de los indicadores que conforman el índice ayuda en la determinación de las causas que influyen en la calidad del agua y en las posibles soluciones.

Investigaciones anteriores efectuadas por Calvo-Brenes [9] [33] [16] y Calvo-Brenes y Araya-Ulloa [23] han demostrado que el índice Holandés le confiere a los ríos evaluados una calidad superior a la que realmente posee, especialmente por no contar con suficientes indicadores de calidad en su evaluación. Además, este índice muestra poca sensibilidad a los cambios fisicoquímicos y microbiológicos que puede sufrir un río entre un período de evaluación y otro. Este nuevo índice ha demostrado ser más sensitivo y evalúa mejor la calidad de los ríos [9] [16].

La metodología empleada en esta investigación se puede utilizar en otros países para generar ICAs que sean elaborados considerando las condiciones ambientales de un país y su reglamentación.

Agradecimientos

El autor expresa su agradecimiento al Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR). También, agradezco al Centro de Investigación en Protección Ambiental (CIPA) y al Laboratorio de Servicios Químicos y Microbiológicos (CEQIATEC) por su gran respaldo a esta investigación.

Referencias

- [1] Global Water Partnership. (2009). Manual para la gestión integrada de recursos hídricos en cuencas. Recuperado de https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=2ahUKEwjvPaw1_fAhUFuVkkHYDgCv0QFjAAegQICRAC&url=https%3A%2F%2Fwww.rioc.org%2FIMG%2Fpdf%2FRIOC_GWP_Manual_para_la_gestion_integrada.pdf&usg=AOvVaw2ZYA2UIMfQesaG_3i01qUT
- [2] AyA (Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados, "VII Congreso Nacional de ingeniería sanitaria y ambiental", Simposio realizado en el Colegio Federado de Ingenieros y Arquitectos. San José, Costa Rica, 2003.
- [3] OMCO. Estadísticas de enfermedades provocadas por el agua. (2010). Consumer World Organization. Recuperado de www.omco.org/agua/estadisticas_enfermedades_por_agua.htm.
- [4] Organización Mundial de la Salud (OMS). Agua. (2018). Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>
- [5] V. Sánchez, "Antología curso: geodinámica y problemas ambientales", Doctorado en Ciencias Naturales para el desarrollo, 3a promoción 2009. Universidad de Chapingo, México, 2009.
- [6] La contaminación del suelo. Capítulo II. Recuperado de <https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/11036/Tasm03de16.pdf>
- [7] G. Calvo-Brenes y J. Mora-Molina, "Evaluación y clasificación preliminar de la calidad del agua de la cuenca del río Tárcoles y el Reventazón. Parte III: Calidad de cuerpos receptores de agua, según el Sistema Holandés de Valoración", Tecnología en Marcha, vol. 20, no. 4, pp. 59-67, Nov. 2007.
- [8] S.S. Nas, A. Bayram, E. Nas, and V.N. Bulut, "Effects of some water quality parameters on the dissolved oxygen balance of streams", Polish Journal of Environmental Studies, vol. 17, no. 4, pp. 531-538, 2008.
- [9] G. Calvo-Brenes, "Modelo de predicción de la calidad del agua en ríos basado en índices e indicadores del recurso hídrico y el entorno socio ambiental", tesis para optar al grado de doctor en Ciencias Naturales para el Desarrollo, Universidad Estatal a Distancia, Universidad Nacional de Costa Rica, Instituto Tecnológico de Costa Rica. San José, Costa Rica, 2013.
- [10] S.A. Abbasi, "Water quality indices", Published by INCOH Secretariat, National Institute of Hydrology, University of Roorkee, India, 2002.
- [11] FAO. (2001). Indicadores de la calidad de la tierra y su uso para la agricultura sostenible y el desarrollo rural. Boletín de tierras y aguas de la FAO. Recuperado el 15 de Junio, 2009 desde <http://uned.blackboard.com/webct/urw/lc5116001.tp0/cobaltMainFrame.dowebct>
- [12] N. Fernández, A. Ramírez y F. Solano. (2003). "Índices físicoquímicos de calidad del agua: un estudio comparativo", International Water Association. Memorias del evento: Agua 2003. Conferencia internacional usos múltiples del agua para la vida y el desarrollo sostenible. Recuperado el 1 de Julio del 2015 desde <http://www.ingenieroambiental.com/4014/fisic.pdf>
- [13] P.K. Swamee, and A. Tyagi. "Improved method for aggregation of water quality subindices", *Journal of environmental engineering*, vol. 133, no. 2, pp. 220-225, 2007.
- [14] L. León. (1992). Índices de calidad del agua (ICA), forma de estimarlos y aplicación en la Cuenca Lerma-Chapala. Trabajos presentados en el VIII Congreso Nacional, 1992, acciones para un ambiente limpio. Instituto Mexicano de Teconología del Agua. Recuperado el 1 de Noviembre, 2009 desde <http://www.science.uwaterlooca.ca/~lfleonvi/rtic/art09.pdf>
- [15] W.R. Ott. (1978). Water quality índices: a survey of índices used in the United States. Office of monitoring and technical support. U. S. Environmental Protection Agency. EPA-600/4-78-005. Washington, United States of America
- [16] G. Calvo-Brenes, "Índices e indicadores sobre la calidad del agua", 1 ed. Cartago, CR: Editorial Tecnológica. 2018.
- [17] R.P. Singh, S. Nath, S.C. Prasad and A.K. Nema, "Selection of suitable aggregation function for estimation of aggregate pollution index for river Ganges in India", *Journal of environmental engineering*, vol. 134, no. 8, pp. 689-701, 2008.
- [18] G. Calvo-Brenes, "Nueva metodología para valorar la calidad de las aguas superficiales para su uso como clase 2 en Costa Rica", Tecnología en Marcha, vol. 26, no. 2, pp. 9-19, 2013b.
- [19] T. Abbasi and S.A. Abbasi, "Water quality índices", 1 ed. Oxford, UK: Elsevier, 2012.
- [20] P. Torres, C. Cruz y P. Patiño, "Índices de calidad en agua en fuentes superficiales utilizadas en la producción de agua para consumo humano: una revisión crítica", *Revista Ingenierías Universidad de Medellín*, vol. 8, no. 15, pp. 79-94, 2009.

- [21] D.S. Bhargava, "Use of a wáter quality index for river classification and zoning of Ganga river. Environmental Pollution (Series B)", vol. 6, pp 51-67, 1983.
- [22] MINAE, "Reglamento para la Clasificación y Evaluación de la Calidad de Cuerpos de Agua Superficiales para la clasificación y la evaluación de la calidad de cuerpos de agua superficiales", no 33903 MINAE-S.. San José, Costa Rica, Gaceta #178, 17 de setiembre del 2007
- [23] G. Calvo-Brenes y A. Araya-Ulloa, "Evaluación de dos índices de calidad del agua en varios sitios de la quebrada La Central, Pacayas de Alvarado, Costa Rica", *Tecnología en Marcha*, vol. 31, no. 4, pp. 73-83, 2018.
- [24] K. Salazar-Céspedes, "Estrategia de monitoreo hídrico comunitario para la microcuenca río Jorco basado en el análisis de indicadores fisicoquímicos, microbiológicos y biológicos de la calidad del agua", tesis de licenciatura, Universidad Estatal a Distancia, San José, Costa Rica, 2018.
- [25] M. Nasirian, "A new water quality index for environmental contamination contributed by mineral processing: a case study of amang (tin tailing) processing activity", *Journal of applied sciences*, vol. 7, no. 20, pp. 2977-2987, 2007.
- [26] C.G. Cude, "Oregon water quality index: a tool for evaluating water quality management effectiveness", *Journal of the American Water Resources Association*, vol. 37, no. 1, pp. 125-137, 2001.
- [27] D.G. Smith, "A better wáter quality indexing system for rivers and streams", *Water Research*, vol. 24, no. 10, pp. 1237-1244, 1990.
- [28] J. Dojlido, J. Raniszewski and J. Woyciechowska, "Water quality index applied to rivers in the vistula river basin in Poland", *Environmental monitoring and assessment*, vol. 33, pp. 33-42, 1994.
- [29] N. Fernández y F. Solano, "Índices de calidad y de contaminación del agua", 2ª edición, Colombia: Universidad de Pamplona, ISBN 958-33-7810-0, 2007.
- [30] J.M. Landwehr, "Water quality indices: construction and analysis", tesis para optar al grado de doctor, University of Michigan. Michigan, Estados Unidos, 1974.
- [31] S.H. Dinius, "Design of an index of wáter quality", American Water Resources Association. *Water Resource Bulletin* # 86088, vo.23, no. 5, pp. 833-842, 1987.
- [32] J.D. Stoner. (1978). Water quality índices for specific wáter uses. U.S Geological Survey Circular 770. Recuperado el 1 de Diciembre, 2014 desde <http://pubs.usgs.gov/circ/1978/0770/report.pdf>
- [33] G. Calvo-Brenes, "Ríos: fundamentos sobre su calidad y la relación con el entorno socioambiental", 1 ed. Cartago, CR: Editorial Tecnológica, 2015.

Retención de carbono en un suelo dedicado al cultivo de piña (*Ananas comosus* (L.) bajo un manejo convencional y de mínima labranza

Carbon sequestration in a soil dedicated to the cultivation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) under conventional management and minimum tillage

Ronald Fonseca-Vargas¹, Parménides Furcal-Beriguete²,
Roel Campos-Rodríguez³, Edwin Esquivel-Segura⁴

Fecha de recepción: 31 de enero de 2019

Fecha de aceptación: 17 de abril de 2019

Fonseca-Vargas, R; Furcal-Beriguete, P; Campos-Rodríguez, R; Esquivel-Segura, E. Retención de carbono en un suelo dedicado al cultivo de piña (*Ananas comosus* (L.) bajo un manejo convencional y de mínima labranza. *Tecnología en Marcha*. Vol. 32-4. Octubre-Diciembre 2019. Pág 116-132.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i4.4797>

- 1 Estudiante Maestría en Gestión de Recursos Naturales y Tecnologías de Producción. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: rfonsecaxr@gmail.com.
- 2 Maestría en suelos. Escuela de Agronomía. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: pafurcal@tec.ac.cr.
 <https://orcid.org/0000-0001-8695-4523>
- 3 Doctor en Ciencias Naturales para el Desarrollo, profesor-investigador de la Escuela de Agronegocios. Coordinador del Área Académica Agroforestal Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: rocampos@tec.ac.cr.
 <https://orcid.org/0000-0003-4460-2313>
- 4 Doctor en Ciencias forestales. Escuela de Ingeniería Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: eesquivel@tec.ac.cr.
 <https://orcid.org/0000-0001-9553-060X>



Palabras clave

Carbono orgánico; conservación de suelos; materia seca; tratamiento; cultivo de piña; labranza en suelo.

Resumen

La piña, *Ananas comosus* (L.), es un cultivo de importancia en Costa Rica con un área de siembra de aproximadamente 38 000 ha. El objetivo del estudio fue evaluar el contenido de carbono orgánico y la biomasa de la planta de piña en la etapa de crecimiento en un suelo bajo los sistemas de labranza convencional y labranza mínima. El experimento se estableció en una finca localizada a 10° 89'N y 84° 65'O con una altitud que va desde 60 a 92 msnm y un relieve con pendiente de 5% al 15%. En la producción convencional la preparación del suelo conlleva la liberación de carbono hacia la atmósfera y la pérdida de materia orgánica. Lo anterior, en parte, ha motivado que su cultivo sea considerado uno de los más degradantes de suelo a nivel nacional. Mediante la aplicación de un tratamiento de labranza mínima y uno convencional se logró apreciar luego de tres años, que existen algunas variaciones en los niveles nutricionales de suelo y de la planta, mientras que, en relación con las variables productivas, en la etapa evaluada no fue posible determinar efectos atribuibles a la diferencia entre tratamientos. Tampoco se lograron evidenciar diferencias en el nivel de carbono de suelo y la relación C: N. Se concluye que el carbono de suelo puede llegar a variar, pero que es necesario profundizar más en la investigación para demostrar que la labranza mínima en piña puede traer beneficios en el almacenamiento de carbono orgánico. Se recomienda continuar con las mediciones de las variables analizadas, las cuales permitan observar lo reportado en otros cultivos.

Keywords

Organic carbon; soil conservation; dry matter; treatment; pineapple cultivation; tillage in soil.

Abstract

The pineapple, *Ananas comosus* (L.), is an important crop in Costa Rica with a planting area of approximately 38,000 ha. The objective of the study was evaluate the organic carbon content and biomass of the pineapple plant in the growing stage in a soil under conventional tillage and minimum tillage systems. The experiment was established on a farm located at 10°89'N and 84°65'W, with an altitude from 60 to 92 m above sea level and a slope of 5 % to 15 %. In conventional production, soil preparation leads to the release of carbon into the atmosphere and the loss of organic matter. Somehow, those issues have caused its cultivation to be considered one of the most degrading of the soil, nationwide. Through the application of a minimum tillage treatment and a conventional one, it was possible to appreciate that there are some variations in the nutritional levels of the plant and the soil, while in relation to the productive variables in the evaluated stage it was not possible to determine effects attributable to the difference between treatments. Neither was it possible to show differences in the soil carbon level and the C: N ratio. It is concluded that soil carbon may vary but it is necessary continue with the researcher to demonstrate that minimum pineapple tillage can bring benefits in the storage of organic carbon. It is recommended to continue with the measurements of the analyzed variables, which allow observing what is reported in other related investigations in crops.

Introducción

El carbono (C) es la unidad principal de la vida en el planeta tierra y su ciclo es fundamental para el desarrollo de todos los organismos. Este se acumula en compartimientos llamados depósitos y circula activamente entre ellos [1].

El carbono en el suelo se encuentra en forma orgánica e inorgánica. La forma orgánica representa la mayor reserva en interacción con la atmósfera y se estima en cerca de 1.500 pg de C a 1 m de profundidad y cerca de 2.456 pg a 2 m de profundidad [2].

El carbono orgánico presente en los suelos naturales representa un balance dinámico entre la absorción de material vegetal muerto y la pérdida por mineralización. En condiciones aeróbicas del suelo, gran parte del carbono que ingresa al mismo es lábil y solo una pequeña fracción (1 %) del que ingresa (55 pg año^{-1}) se acumula en la fracción húmica estable ($0,4 \text{ pg año}^{-1}$) [1].

El carbono orgánico del suelo (COS) es un componente importante del ciclo global del carbono, ocupando 69,8 % del C orgánico de la biosfera [1]. Por tanto, el suelo puede actuar como fuente o reservorio de carbono, dependiendo de su uso y manejo [3] y [4]. Sin embargo, la pérdida histórica de los suelos agrícolas fue de 50 Pg de carbono en el último medio siglo, lo cual representa un tercio de la pérdida total del suelo y la vegetación [1].

Realmente, en condiciones naturales, el carbono se incorpora al suelo a través del aporte continuo de material orgánico, principalmente de origen vegetal. En suelos cultivados el mayor aporte de carbono ocurre con los residuos de cosecha. Por otro lado, el carbono del suelo se puede perder en forma gaseosa (CO_2 , CH_4) por difusión directa hacia la atmósfera. El aire del suelo tiene una composición similar a la de la atmósfera, pero difiere en la concentración de los gases. El aire del suelo tiene una mayor concentración de CO_2 respecto al aire atmosférico. Los gases entran o salen del suelo por flujo de masa y por difusión. En este caso, el flujo de masa se produce debido a variaciones en la temperatura y en la presión entre las distintas capas del suelo y entre éste y la atmósfera [5]. Así que, la perturbación del suelo por labranza es una de las mayores causas de la disminución del contenido de la materia orgánica del suelo (MOS) [6] y la disminución del tamaño y estabilidad de los agregados del suelo cuando los ecosistemas nativos son convertidos a la agricultura [7] perdiéndose por ende el carbono orgánico del suelo.

La materia orgánica del suelo es un indicador clave de la calidad del mismo, tanto en sus funciones agrícolas (por ejemplo, la producción y economía) como en sus funciones ambientales (entre ellas la captura de carbono y la calidad del aire). También es el principal determinante de su actividad biológica. Así mismo, la materia orgánica y la actividad biológica que ésta genera tienen gran influencia sobre las propiedades químicas y físicas de los suelos y por ende la producción de los cultivos [8]. Uno de estos cultivos es la piña, cuya extensión en Costa Rica es de unas 38 000 ha aproximadamente. Se cultiva en 16 cantones, de los cuales la Zona Norte representa el 56 % del área cultivada, el Atlántico con el 25 % y el Pacífico el 19 %. Todo distribuido entre unos 258 productores de piña en todo el país [9].

Este cultivo básicamente se realiza de forma convencional y se basa en la labranza del suelo como la operación principal. Para una preparación de terreno completa se requieren hasta siete pasadas de implementos, entre ellos subsolador, arado, rastra, "rotoking", entre otros. Este proceso resulta en el largo plazo, en una reducción de la materia orgánica del suelo. Por tanto, la mayoría de los suelos se degradan bajo una agricultura arable intensiva y prolongada [1].

El uso de la labranza convencional y el monocultivo, generalmente, incrementan la productividad en el corto plazo, ya que, temporalmente, mejoran las condiciones físicas del suelo (relación suelo-agua-aire) necesarias para el óptimo desarrollo de las plantas. Sin embargo, se reconoce que estas prácticas incrementan la pérdida de la materia orgánica como resultado de la mezcla e inversión del suelo, así como de los residuos de cosecha [10].

Por otra parte, se encuentra la agricultura de conservación, misma que está recibiendo atención global como alternativa al uso de los sistemas de labranza convencional y como un medio de secuestro de carbono orgánico del suelo [11]. Más importante aún, las prácticas que secuestran carbono orgánico del suelo contribuyen a la calidad ambiental y al desarrollo de un sistema agrícola sostenible.

La agricultura de conservación es un concepto para el manejo de agro-ecosistemas para una productividad mejorada y sostenible, mayor rentabilidad económica y seguridad alimentaria. Conserva y refuerza al mismo tiempo, los recursos naturales y el medio ambiente, mediante la aplicación de tres principios: una perturbación mínima del suelo, una cobertura permanente del suelo y la rotación de cultivos [12].

Metodología

Localización

Esta investigación se llevó a cabo en el poblado de El Corozo, distrito de El Amparo, cantón de Los Chiles, perteneciente a la provincia de Alajuela, Costa Rica. La finca donde se estableció el experimento se encuentra ubicada a 10° 89' Latitud Norte y 84° 65' Longitud Oeste, con una altitud que va desde 60 a 92 msnm., en la Zona de Vida de Bosque Húmedo Tropical [13]. El relieve es semi ondulado con pendientes moderadas del 5 % al 15 %.

Generalidades

Dicha zona se caracteriza por tener suelos pertenecientes al sub grupo Typic plinthaquults del orden de los Ultisoles (Mapa de suelos de Costa Rica). Los cuales son poco profundos, compactados, arcillosos, por lo general con poco contenido de materia orgánica menor al 1 % [14].

La temperatura mínima promedio es de 23 °C, y la máxima promedio es de 32 °C. Tiene una temperatura promedio general de 27,5 °C, con un periodo seco bien definido. Este inicia en enero y termina en abril. La precipitación media anual en la zona es de 1 511 mm distribuida en dos épocas de mayor precipitación (junio, julio y octubre).

Diseño Experimental

Se seleccionaron dos lotes colindantes entre sí, separados por un camino secundario, donde se implementaron los tratamientos, uno con manejo de labranza convencional y otro de labranza mínima. En todos los casos se sembró a una misma densidad de plantación (65 000 plantas por hectárea). En cada tratamiento se midieron 4 repeticiones conformadas por secciones como se puede ver en la figura 1.

Ambos lotes fueron sembrados con piña del material genético Híbrido MD-2 en el mes de abril del año 2016, como un nuevo ciclo de plantación. Sin embargo, el de mínima labranza fue labrado por última vez en febrero del 2013 y el de uso convencional en febrero 2016.

El tratamiento de mínima labranza, consistió en dejar el suelo fuera de las labores de preparación, dándole descanso al mismo. Se realizó una aplicación de herbicida quemante después de realizadas la primera y segunda cosecha de fruta y cinco semanas después una chapea a la base de las plantas desecadas "ñongas", en ese caso todo el material vegetal queda como rastrojo en la capa superior del suelo, realizando a su vez, un control mecánico de las malezas y de erosión de suelos.

En el caso de labranza convencional, se realizaron labores agrícolas de uso común para la des compactación y el afinado de las partículas de suelo, el cual se compone de dos pases

de trituración, dos pases de rastra, un pase de subsolador, un pase de arado rotativo y la formación de las camas con el “rotoking”, para posteriormente realizar la formación de drenes secundarios y terciarios y de gavetas y ceniceros recolectores de sedimento. El cuadro 1 muestra la distribución de áreas por tratamiento.

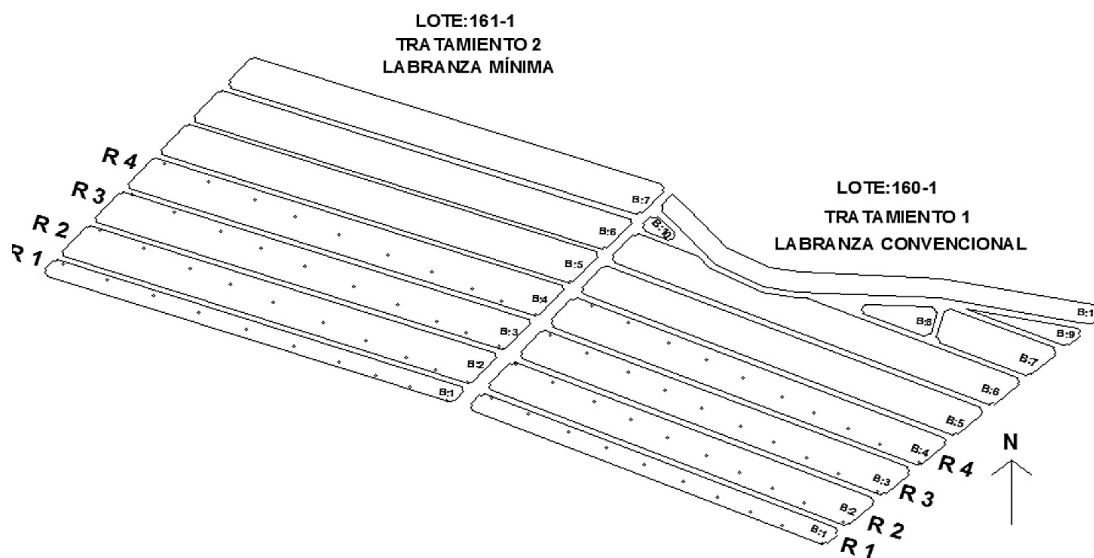


Figura 1. Croquis de distribución de los puntos de muestreo en campo.

Cuadro 1. Distribución de las áreas por tratamiento.

Labranza	Lote	Tratamiento	Repetición	Área (ha)
Convencional	160	1	1	0,35
		1	2	0,68
		1	3	0,67
		1	4	0,65
Mínima	161	2	1	0,33
		2	2	0,65
		2	3	0,65
		2	4	0,65

Descripción de muestreos

En cada punto de muestreo se consideraron los horizontes A y B para obtener las muestras de suelo y realizar el análisis de fertilidad, carbono orgánico y materia orgánica. Adicionalmente se midieron las siguientes variables: peso fresco de las plantas y cantidad de materia seca, evaluado a los cuatro meses de edad del cultivo.

Muestreo de suelos

Para cada tratamiento se hizo una evaluación por cada repetición, a los cuatro meses de edad de la plantación. La evaluación fue conformada por 10 sub muestras que se obtuvieron a lo largo del bloque, de las cuales al final del cuarteo del suelo se obtuvo una sola muestra por repetición. Las muestras tomadas en cada unidad de muestreo ($n=10$) se unieron por profundidad A y B para formar muestras compuestas por repetición.

Muestreos foliares y de plantas

El procedimiento consistió en tomar la hoja más larga de la planta de piña a los cuatro meses de edad, previamente se seleccionaron 10 plantas al azar por repetición a lo largo del bloque, para conformar una muestra foliar. Estas mismas 10 plantas se pesaron antes de extraer la muestra foliar, para realizar los cálculos de peso de planta, previamente se retiraron las raíces y se registró el peso fresco total de cada tratamiento.

Muestreo de Materia Seca

Para la determinación de la materia seca, en el momento que se realizaba el muestreo de peso fresco de planta se tomaron las 10 plantas muestreadas y se le cortó una sección de las puntas de las hojas y otra sección del tallo de la planta. Estos 10 pesos parciales de plantas se registraron en uno solo, se procedió con el secado en una estufa de aire forzado a 55 °C hasta obtener peso constante y luego se registró el peso seco. Este valor se relacionó con el peso fresco total de la planta entera que se obtuvo de las 10 plantas en cada repetición.

Análisis de los datos

Para el análisis se hizo comparaciones de medias entre tratamientos mediante una prueba T con el software Infostat versión 2013.

Resultados y discusión

Comportamiento de la fertilidad del suelo

En el cuadro 2 se muestra los resultados de los análisis de suelo, se destaca que la mayoría de variables evaluadas en el Horizonte A son mayores en el Tratamiento de mínima Labranza (T2), a excepción del calcio y el hierro. Todos los elementos, así como el pH y la acidez del suelo, se encuentran cercanos a los niveles críticos propuestos por [28]. No se presentaron diferencias significativas entre las variables, exceptuando el manganeso.

Por otro lado, en el caso del Horizonte B (cuadro 3) existieron diferencias significativas para algunas variables como la acidez, la saturación de acidez y el calcio, a favor del T1, y del zinc, cobre, hierro y manganeso, a favor del T2. En este caso, se justifica, ya que estos dos últimos elementos están relacionados con suelos de mayor acidez, como es el caso del T2, así como que se incrementan en suelos saturados y menos drenados. Quizás esto se debe a que el suelo con labranza convencional fue subsolado, lo que permite mayor evacuación del agua en el horizonte B.

Contenido nutricional foliar

Partiendo del uso de una tabla de rangos óptimos adaptada en la finca para el cultivo de piña, se puede observar en el cuadro 4 que, para ambos tratamientos, el nivel de la concentración de elementos en la planta está dentro del rango adecuado para la plantación o por encima de

él. A excepción del zinc que, en dos de las cuatro repeticiones para el T1 y una repetición en el T2, aparece levemente por debajo del nivel óptimo con 19 mg/L de 20 mg/L como límite inferior.

Para el nitrógeno, fósforo y potasio la concentración de elementos en la hoja es mayor en el T2, y se da el mismo comportamiento con el hierro y el manganeso. No obstante, en el caso del calcio, magnesio y zinc sucede lo contrario, donde se obtuvo la mayor concentración de estos elementos a nivel foliar en el T1. Por último, el cobre resultó igual para ambos tratamientos.

Desde el punto de vista nutricional existe una tendencia de un mejor nivel para las plantas del tratamiento de mínima labranza en comparación con la convencional.

Cuadro 2. Resultados de los análisis nutricionales a nivel de suelo para el Horizonte A.

ANÁLISIS QUÍMICO DE SUELOS														
Horizonte A		pH (H ₂ O)	cmol(+)/L					%		mg/L				
			Acidez	Ca	Mg	K	CICE	SA	P	Zn	Cu	Fe	Mn	
Valor nivel crítico		5,5	0,5	4	1	0,2	5	10	10	3	1	10	5	
Labranza	Repetición													
Convencional (T1)	R1 A	5,00	0,42	2,78	0,73	0,36	4,29	10	3	3,6	10	170	39	
	R2 A	4,80	0,66	2,83	0,75	0,25	4,49	15	2	3,7	10	171	52	
	R3 A	4,70	0,67	2,78	0,70	0,24	4,39	15	3	3,9	8	176	51	
	R4 A	4,80	0,46	3,10	0,94	0,34	4,84	10	3	4,8	9	150	51	
	Desv est.	0,109	0,113	0,133	0,094	0,053	0,207	2,500	0,433	0,474	0,829	9,934	5,356	
	Promedio	4,8 ^a	0,55 ^a	2,87 ^a	0,78 ^a	0,30 ^a	4,50 ^a	12,3 ^a	2,8 ^a	4,0 ^a	9,3 ^a	166,8 ^a	48,3 ^a	
Mínima (T2)	R1 A	4,90	0,44	2,95	1,00	0,25	4,64	9,5	3,0	4,2	11	166	63	
	R2 A	4,90	0,54	2,62	0,86	0,41	4,43	12,2	3,0	4,1	10	154	71	
	R3 A	4,80	0,46	2,48	0,86	0,29	4,09	11,2	3,0	3,2	9	132	85	
	R4 A	4,80	0,46	2,96	1,05	0,44	4,91	9,4	3,0	4,7	9	138	93	
	Desv est.	0,050	0,038	0,208	0,084	0,079	0,300	1,180	0,000	0,541	0,829	13,370	11,705	
	Promedio	4,8 ^a	0,48 ^a	2,75 ^a	0,94 ^a	0,35 ^a	4,52 ^a	10,6 ^a	3,0 ^a	4,1 ^a	9,8 ^a	147,5 ^a	78,0 ^b	

Las letras iguales indican que no hay diferencia significativa.

Simbología: CICE, capacidad de intercambio catiónico efectivo, SA, saturación de aluminio, Desv Est., desviación estándar.

Cuadro 3. Resultados de los análisis nutricionales a nivel de suelo para el Horizonte B.

ANÁLISIS QUÍMICO DE SUELOS													
Horizonte B		pH (H ₂ O)	cmol(+)/L					%	mg/L				
			Acidez	Ca	Mg	K	CICE		SA	P	Zn	Cu	Fe
Valor nivel crítico		5,5	0,5	4	1	0,2	5	10	10	3	1	10	5
Labranza	Repetición												
Convencional (T1)	R1 B	5,0	0,11	3,24	0,94	0,23	4,52	2	3	2,0	8	84	15
	R2 B	4,9	0,18	3,18	0,92	0,24	4,52	4	3	2,2	8	103	28
	R3 B	4,9	0,15	3,29	0,91	0,18	4,53	3	2	1,8	6	59	25
	R4 B	4,9	0,20	3,62	1,00	0,29	5,11	4	2	2,5	8	85	36
	Desv est.	0,043	0,034	0,170	0,035	0,039	0,254	0,829	0,500	0,259	0,866	15,658	7,517
	Promedio	4,9 ^a	0,16 ^a	3,33 ^a	0,94 ^a	0,24 ^a	4,67 ^a	3,4 ^a	2,50 ^a	2,1 ^b	7,5 ^b	82,8 ^b	26,0 ^b
Mínima (T2)	R1 B	4,8	0,39	3,14	0,99	0,16	4,68	8	3	3,2	11	164	67
	R2 B	4,8	0,27	3,12	0,86	0,16	4,41	6	2	3,3	10	112	55
	R3 B	4,9	0,23	2,75	0,82	0,21	4,01	6	2	2,6	9	113	67
	R4 B	4,6	0,43	2,47	0,74	0,20	3,84	11	2	3,5	10	106	84
	Desv est.	0,109	0,082	0,278	0,090	0,023	0,330	2,046	0,433	0,335	0,707	23,392	10,329
	Promedio	4,8 ^a	0,33 ^b	2,87 ^b	0,85 ^a	0,18 ^a	4,24 ^a	7,8 ^b	2,25 ^a	3,2 ^a	10,0 ^a	123,8 ^a	68,3 ^a

Las letras iguales indican que no hay diferencia significativa.

Simbología: CICE, capacidad de intercambio catiónico efectivo, SA, saturación de aluminio, Desv Est., desviación estándar.

Diferentes estudios han indicado que cuando la relación C:N en el suelo es mayor de 30, existe inmovilización de nitrógeno por los microorganismos del suelo, cuando esta fluctúa entre 20 a 30, no existe pérdida o ganancia. Sin embargo, cuando ésta, es menor de 20 existe una mineralización de los componentes orgánicos y el nitrógeno puede ser utilizado por las plantas [15]. En este caso la relación C:N menor es en el Horizonte A con un valor de 8,45 para el T2, el cual, a pesar de no tener diferencia estadística con el T1, si marca esa tendencia que se menciona en la literatura y que se ve reflejada en el contenido de nitrógeno a nivel foliar.

Sin embargo, se cree que a pesar de que el suelo se conserva y no se remueve, el aporte de la materia orgánica por el procedimiento que se hace en la mínima labranza se asimila más lentamente por el suelo, y por ende se disminuye la facilidad de poner esos minerales a disposición para el siguiente ciclo de cultivo. Así lo confirma [16], cuando menciona que los residuos de cultivos aplicados en la superficie, se descomponen más lentamente que aquellos incorporados por la labranza, ya que tienen menor contacto con los microorganismos y el agua del suelo.

Cuadro 4. Contenido nutricional a nivel foliar en plantas de piña (*Ananas comosus*).

Labranza	Repetición	%					mg/L			
		N Total	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn
Convencional (T1)	1	1,88	0,2	5,71	0,37	0,24	125	16	19	296
	2	1,72	0,18	4,68	0,34	0,22	152	14	24	274
	3	1,75	0,21	5,08	0,39	0,24	150	13	19	283
	4	1,87	0,19	5,01	0,42	0,27	133	16	26	354
	Promedio	1,81 ^a	0,20 ^b	5,12 ^b	0,38 ^a	0,24 ^a	140,0 ^a	14,8 ^a	22,0 ^a	301,8 ^a
Mínima (T2)	1	1,83	0,23	6	0,35	0,23	186	13	20	284
	2	1,98	0,23	6,19	0,35	0,21	106	14	19	301
	3	1,83	0,25	5,67	0,34	0,23	153	15	23	391
	4	1,98	0,24	6,45	0,32	0,21	148	17	21	367
	Promedio	1,91 ^a	0,24 ^a	6,08 ^a	0,34 ^a	0,22 ^a	148,3 ^a	14,8 ^a	20,8 ^a	335,8 ^a
	Bajo	<1,4	<0,15	<2,6	<0,3	<0,2	<75	-	<20	-
Rangos	Óptimo	1,4 - 1,7	0,15 - 0,25	2,6 - 3,6	0,3 - 0,38	0,2 - 0,28	75 - 175		20 - 30	
	Alto	>1,7	>0,25	>3,6	>0,38	>0,28	>175	-	>30	-

Las letras iguales indican que no hay diferencia significativa.

Contenido de materia seca

El cuadro 5 presenta los valores del peso seco de las plantas para cada tratamiento. El tratamiento T2 obtuvo un promedio de 208,1 gramos de materia seca por planta, contra 190,4 gramos de materia seca del T1; el cual significa una diferencia por un margen de 17,7 gramos por planta. Este resultado no representa un valor estadístico que permita definir diferencias entre tratamientos a la edad evaluada, sin embargo, podría aumentar esta diferencia en el tiempo o provocar alguna diferencia en la fruta cosechada.

Cuadro 5. Promedio de materia seca por planta de piña.

Labranza	Repetición	Peso seco de la planta (gr)	Promedio MS (gr)
Convencional (T1)	1	207	190,4 ^a
	2	173,6	
	3	214,7	
	4	166,2	
Mínima (T2)	1	207,8	208,1 ^a
	2	250,7	
	3	194,8	
	4	179	

Las letras iguales indican que no hay diferencia significativa.

Tomando en cuenta los valores del cuadro 5 y la densidad de las plantas (65 000 plantas por hectárea) se obtiene que en el caso del T1 hay una producción de 12,38 tn ha⁻¹ de materia seca; mientras que en el T2 se da una producción de 13,52 tn ha⁻¹ de la misma. La diferencia no es significativa estadísticamente.

Cuadro 6. Toneladas de materia seca por hectárea y tratamiento.

Labranza	Repetición	Peso seco (g/planta)	Materia seca (tn/ha)	Promedio MS/TM/ha
Convencional (T1)	1	206,99	13,45	12,38 ^a
	2	173,6	11,28	
	3	214,74	13,96	
	4	166,24	10,81	
Mínima (T2)	1	207,85	13,51	13,52 ^a
	2	250,7	16,3	
	3	194,75	12,66	
	4	178,99	11,63	

Las letras iguales indican que no hay diferencia significativa.

El porcentaje de materia seca permite ver cuánta agua tiene la planta y cuánto corresponde a la parte sólida. Dicho dato debe ser bien interpretado, ya que la planta con mayor cantidad de materia seca no va a ser mayor necesariamente a la hora de verlo en términos relativos, sino que, por lo general, las plantas más grandes por ser más suculentas van a tener más agua en su sistema. El caso contrario se da cuando la planta es más pequeña, ya que el agua en su sistema es menor. Esto se debe al estrés al que ha sido sometida la semilla en el proceso de siembra, y la casi nula presencia de raíz en los primeros 15 días de trasplante, lo cual le impide absorber agua del suelo, por ende, su porcentaje de materia seca probablemente aumentará. Esto puede ser atribuido a lo descrito por [17], ya que mencionan que las plantas en las primeras semanas carecen de raíces adventicias y presentan escasez de raíces primarias, lo que dificulta la absorción de agua para la planta y, por tanto, este órgano carece de agua, de ahí que se obtenga una mayor concentración en la cantidad de materia seca.

Los resultados de porcentaje de materia seca permiten destacar que no hay diferencia estadística, como se muestra en el cuadro 7.

Peso de la planta

El peso inicial de la planta al momento de la siembra fue de 0,38 kg, en labranza convencional se obtuvo un promedio de 1,81 kg por planta y para la labranza mínima un 2,04 kg por planta (cuadro 8), sin que se evidenciaran diferencias significativas. Por tanto, no hay efecto del tratamiento sobre el peso de la planta.

Adicionalmente se consideró analizar la variable ganancia de peso, con un promedio de 1,44 kg para la labranza convencional y para la mínima labranza un promedio de 1,67 kg sin que se evidenciaran diferencias estadísticamente significativas.

Cuadro 7. Porcentaje de materia seca por planta.

Labranza	Repetición	Peso verde de la planta (g)	Peso seco de la planta (g)	Materia Seca (%)	Promedio Materia Seca (%)
Convencional (T1)	1	1 902,3	207	10,88	10,53 ^a
	2	1 509,1	173,6	11,5	
	3	2 090,9	214,7	10,27	
	4	1 756,8	166,2	9,46	
Mínima (T2)	1	1 965,9	207,8	10,57	10,17 ^a
	2	2 354,5	250,7	10,65	
	3	2 004,5	194,8	9,72	
	4	1 838,6	179	9,73	

Las letras iguales indican que no hay diferencia significativa.

Cuadro 8. Peso de la planta de piña y ganancia de peso a los cuatro meses de edad.

Labranza	Repetición	Peso por planta (kg)	Peso promedio por planta (kg)	Ganancia peso por planta (kg)	Promedio ganancia peso (kg)
Convencional (T1)	1	1,9	1,81 ^a	1,53	1,44 ^a
	2	1,51		1,13	
	3	2,09		1,72	
	4	1,76		1,38	
Mínima (T2)	1	1,97	2,04 ^a	1,59	1,67 ^a
	2	2,35		1,98	
	3	2		1,63	
	4	1,84		1,46	

Las letras iguales indican que no hay diferencia significativa.

Se puede decir que la tendencia, a pesar de no existir diferencia estadística, se da hacia una mejor ganancia de peso y, por ende, hacia un mejor peso por planta en la siembra en suelos de mínima labranza.

Carbono orgánico y materia orgánica

La captura de carbono y el aumento de la materia orgánica del suelo van a tener un impacto directo sobre la calidad y la fertilidad de los suelos [1]. Sin embargo, [18] indican que un aumento de la concentración de CO₂ en la atmósfera induce un incremento de la biomasa o de la red primaria de producción, con un papel muy importante sobre la fotosíntesis y el crecimiento de las plantas.

Por tanto, se sustenta la tendencia obtenida sobre la ganancia de peso de la planta, en relación al carbono obtenido actualmente en ambos tratamientos, permitiendo predecir, que a futuro es un factor importante a considerar en el aumento de la producción, si se parte del hecho que con el paso del tiempo puede el suelo capturar más carbono proveniente del crecimiento que presenta el cultivo.

Comportamiento del contenido de carbono orgánico y relación C/N

El grado de labranza no influyó sobre los contenidos de materia orgánica, carbono orgánico, ni el nitrógeno almacenado. Solo se notó una disponibilidad menor en el Horizonte A para el tratamiento de mínima labranza. Dichos valores no permitieron definir una diferencia significativa a favor de la labranza convencional. Como lo mencionan los autores [3], [4], los sistemas de labranza cero o labranza reducida, a largo plazo, aumentan el contenido de materia orgánica del suelo de la capa superficial, como resultado de la interacción de varios factores, tales como (un mayor retorno de residuos, menos mezcla y disturbio del suelo, mayor contenido de humedad del suelo, menor temperatura de la superficie del suelo, proliferación del crecimiento de las raíces y de la actividad biológica y menores riesgos de erosión del suelo).

Las variables reflejadas en el cuadro 9, en el horizonte A, mostraron un comportamiento completamente distinto a las variables analizadas en el cuadro 10, lo que se puede deber a la disponibilidad de la materia orgánica que hay en el suelo procedente de la plantación que se eliminó del ciclo anterior. Lo normal sería que se viera reflejado en el resultado del T2; sin embargo, existe la posibilidad de que, a pesar de que el proceso de descomposición se da, su incorporación al suelo es más lenta que el proceso de trituración e incorporación del material vegetal que se le realiza al suelo en una preparación convencional. Lo anterior porque lo que se hace es minimizar al máximo las partículas de material para facilitar la incorporación y descomposición en el suelo. Es decir, lo probable es que el aporte efectivo al suelo del material dejado en las mínimas labranzas se vea, pero a mayor plazo.

Para el caso del T2, por ser mínima labranza, el material vegetal es más grande y, por consiguiente, el proceso de descomposición y mineralización es más lento, por lo que pasa a formar parte del suelo como materia orgánica y, a su vez, a aumentar la disponibilidad de nitrógeno y contenido de carbono del suelo. Según [4], los depósitos de carbono en el suelo y su dinámica se encuentran estrechamente relacionados con la fauna edáfica, la cual es considerada un factor de gran influencia en las propiedades físicas y biológicas del suelo, especialmente en lo relacionado con la estructura, porosidad, aireación, infiltración, drenaje, ciclaje de nutrientes y flujo de materia orgánica.

Es por esto, que la posible razón por la cual no se encontrara más carbono orgánico en la labranza mínima respecto a la convencional, puede deberse a que tanto la labranza convencional como la labranza mínima, fueron manejadas igual durante más de dos años, ya que era el periodo durante el cual se desarrolló el cultivo en su primera y segunda cosecha. Sin embargo, posteriormente, la labranza convencional se preparó próximo a la siembra, lo que le confiere un periodo de descanso previo a la siembra similar al de labranza mínima. Sin embargo, [19] menciona que, para que ocurra un verdadero impacto en el cambio climático los sumideros deben ser permanentes. Si la tierra bajo agricultura de conservación es labrada, todas las ganancias de carbono y de materia orgánica del suelo se pierden, por tanto, a pesar de no haber mucha diferencia en tiempo, si hay una ruptura total del proceso de descanso del suelo en el momento de la preparación del mismo en la labranza convencional.

Es posible que este tipo de suelo, para la zona de influencia, el tipo de cultivo y el manejo anterior que se le ha dado, necesite un periodo más extenso de tiempo para poder determinar diferencias significativas respecto a las variables de fertilidad y de composición del suelo.

De acuerdo al resultado obtenido, cabe mencionar lo propuesto por [20] cuando sugirieron que las tasas de secuestro de carbono en el suelo, con el cambio a prácticas de labranza cero, podían tener una respuesta lenta. También, indican que se puede alcanzar una tasa máxima

de secuestro en cinco o diez años y, entonces declinar a casi cero en 15 a 20 años. Esto concuerda con una revisión de [3] basada en resultados de [21] que muestra que puede haber poco o ningún incremento en el carbono orgánico del suelo en los primeros dos a cinco años después del cambio en las prácticas de manejo, pero seguido por un gran incremento en los siguientes cinco o diez años.

Esta situación se relaciona con la cantidad de materia orgánica que, a pesar de no ser más alta en comparación con el T1 (cuadro 9), presenta niveles relativamente altos para el tipo de suelo, cuando lo normal es un rango entre el 1 % y 2 %, por tanto, siempre hay beneficio.

Cuadro 9. Relación entre la materia orgánica, el carbono, nitrógeno y la interacción de ambos.

ANÁLISIS QUÍMICO DE SUELOS						
Horizonte A		CE (mS/cm)	% C	% N	Relación C/N	% MO
Labranza	Repetición					
Convencional (T1)	R1 A	0,1	2,01	0,24	8,4	2,9
	R2 A	0,1	1,95	0,23	8,5	2,8
	R3 A	0,2	2,56	0,24	10,7	3,7
	R4 A	0,2	1,88	0,19	9,9	2,7
	Promedio	0,15 ^a	2,10 ^a	0,23 ^a	9,38 ^a	3,00 ^a
Mínima (T2)	R1 A	0,1	1,75	0,21	8,3	2,5
	R2 A	0,1	1,88	0,22	8,5	2,7
	R3 A	0,1	1,71	0,2	8,6	2,4
	R4 A	0,2	1,84	0,22	8,4	2,6
	Promedio	0,13 ^a	1,80 ^a	0,21 ^a	8,45 ^a	2,57 ^a

Las letras iguales indican que no hay diferencia significativa.

CE: Conductividad eléctrica MO: Materia orgánica

En el caso del horizonte B, los valores que se obtuvieron sobre las cantidades de carbono, nitrógeno y el porcentaje de materia orgánica, presentan un efecto contrario a los resultados obtenidos para el horizonte A. En el caso del T2, son mayores en el estrato más profundo (Horizonte B) y no en la superficie del suelo, como se muestra en el cuadro 10. Se podría justificar dicho resultado, ya que la perturbación ocurrida por la labranza, acorta el proceso de estructuración de un macro agregado, disminuyendo la formación de nuevos micro agregados y la captura de carbono dentro de ellos [7].

Estos resultados a su vez, a pesar de no haber diferencia significativa en todas las variables, a excepción del porcentaje de nitrógeno, demuestran que, con el pasar del tiempo, el comportamiento del suelo tiende a mejorar en cantidad de carbono, nitrógeno y materia orgánica en la labranza mínima en el horizonte B, por lo que a mayor profundidad del suelo y comparado con la labranza convencional en la cual fue removido el mismo, se determina que esa mejoría de suelo se da de las capas superficiales a las más profundas, al menos en estas variables medidas. Así lo confirma [22], en Australia y [23] en Etiopía, donde encontraron que

el carbono incrementó desde la superficie hacia las partes más profundas del suelo, lo que es consecuente con mayores pérdidas respiratorias de carbono isotópicamente ligero, durante la descomposición de las capas superficiales del suelo, resultando en un enriquecimiento del carbono más antiguo a mayor profundidad.

Cuadro 10. Relación entre la materia orgánica, el carbono, nitrógeno y la interacción de ambos en el horizonte B.

ANÁLISIS QUÍMICO DE SUELOS						
Horizonte B		CE	% C	% N	Relación C/N	% MO
Labranza	Tratamiento	(mS/cm)				
Convencional (T1)	R1 B	0,20	1,34	0,17	7,90	1,90
	R2 B	0,20	1,39	0,19	7,30	2,00
	R3 B	0,20	1,23	0,17	7,20	1,80
	R4 B	0,20	1,88	0,19	9,90	2,70
	Promedio	0,20 ^a	1,46 ^a	0,18 ^b	8,08 ^a	2,09 ^a
Mínima (T2)	R1 B	0,20	1,74	0,21	8,30	2,50
	R2 B	0,10	1,57	0,19	8,30	2,20
	R3 B	0,10	1,74	0,20	8,70	2,50
	R4 B	0,10	1,59	0,20	8,00	2,30
	Promedio	0,13 ^a	1,66 ^a	0,20 ^a	8,33 ^a	2,37 ^a

Las letras iguales indican que no hay diferencia significativa.

CE: Conductividad eléctrica MO: Materia orgánica

Según [24], el incremento en los valores de carbono y nitrógeno, van en función de la profundidad del suelo y se atribuye también a la acumulación de biomasa microbiana (hongos saprofitos, micorrizas arbusculares y ectomicorrizas). De igual manera, la naturaleza dinámica de la relación carbono y nitrógeno puede requerir nitrógeno orgánico adicional para incrementar el secuestro de carbono en profundidad. Como lo encontraron [25], determinando que la mayor parte de la ganancia de nitrógeno ocurre a profundidades por debajo del nivel de paso del arado, lo que sugiere que la mayor parte del carbono acumulado en el suelo se derivaba de los residuos de las raíces; lo cual concuerda con la tendencia del carbono en el Horizonte B para el T2.

Otro punto relevante de rescatar es la disminución en los costos económicos de la labranza mínima, dada la menor cantidad de labores, además de la conservación del recurso suelo.

Como lo mencionan, [3], la labranza mínima además del secuestro de carbono con la consecuente remoción del CO₂ de la atmósfera presenta otros beneficios; entre los que se puede mencionar, la reducción en el consumo de combustibles, disminución de la erosión, fortalecimiento en la fertilidad del suelo y su capacidad de retención de agua. Además, indican que, el potencial de secuestro de carbono orgánico del suelo por la conversión a la agricultura de conservación varía de 0,1 a 0,5 t/ha/año para las regiones templadas húmedas y de 0,05 a 0,2 t/ha/año para las regiones semiáridas y tropicales.

Lo anterior respalda lo mencionado por [26] afirmando que dicha actividad se convierte en una consideración importante para el manejo futuro de créditos de carbono. Además, los mercados se están extendiendo globalmente y los mecanismos de desarrollo limpio del protocolo de Kyoto

ofrecen una oportunidad económica atractiva para la subsistencia de agricultores de países en vía de desarrollo, quienes podrían obtener recursos económicos por medio de la venta de carbono secuestrado en sus agroecosistemas a países industrializados [27], al evidenciar que la disminución de emisiones de gases de efecto invernadero a partir del almacenamiento de carbono, además de ser un servicio ecosistémico, se convierte en una alternativa económica, que se puede potenciar a través de las evaluaciones del carbono orgánico del suelo en paisajes rurales neo tropicales. Así también, los beneficios adicionales relacionados incluirán el mejoramiento de las propiedades químicas, la biodisponibilidad de elementos (mayor fertilidad) y la resiliencia contra la degradación física, especialmente de la erosión. Por lo tanto, el secuestro de carbono contribuirá a restaurar la calidad de los suelos degradados [1].

Conclusiones

La presencia de mayor acumulación de materia seca, el comportamiento nutricional de las plantas y del suelo en el horizonte A con el tratamiento de mínima labranza, en comparación con el tratamiento de labranza convencional, y aún sin haber resultado estadísticamente diferentes, evidencia un aporte al suelo con la mínima labranza y una economía para el productor en el manejo del cultivo, especialmente por la mecanización.

En cuanto a variables productivas como el peso de la planta, ganancia de peso, materia seca por planta y el porcentaje de materia seca, no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos o tipos de labranza evaluados, sin embargo, hay una tendencia, en su mayoría, en la mejora de las variables en el tratamiento de mínima labranza en comparación con la convencional.

Al comparar la cantidad de carbono orgánico que hay en los horizontes A y B del suelo, para ambos tratamientos, no se encontró diferencia estadística alguna que permitiera darle un valor agregado a la labor de mínima labranza en relación a la labranza convencional. Sin embargo, hay una tendencia en la que, a través del tiempo, el contenido de carbono orgánico en la labranza mínima puede superar al carbono acumulado en la labranza convencional.

No se muestran diferencias significativas para la relación C/N a nivel de suelo que permitan determinar el efecto entre los dos sistemas de labranzas y la profundidad. No obstante, la relación C:N menor, resultante en el horizonte A para el T2, pese a no tener diferencia estadística con el T1, si marca una tendencia favorable en dicha relación que se ve reflejada en el contenido de nitrógeno a nivel foliar.

En el lote donde se aplicó labranza mínima no hubo mayor diferencia en la presencia de plagas en comparación con el lote donde se aplicó labranza convencional, además los cambios en el carbono de suelo producto de una labranza mínima no son apreciables con un solo ciclo de aplicar esta técnica.

Dada la naturaleza del cultivo con labranza mínima, la implementación de un estudio a largo plazo, de al menos cinco años, debería evidenciar diferencias significativas en la capacidad de captura y retención del carbono entre ésta y la labranza convencional.

Referencias

- [1] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), "Captura de carbono en los suelos para un mejor manejo de la tierra", no. 96, Roma, 2002.
- [2] S. Brown, J. Sathaye, M. Cannel, and P. Kauppi, "Mitigation of carbon emissions to the atmosphere by forest management", *Commonwealth Forestry Review*, vol. 75, no. 1, pp. 80-91, 1996.
- [3] R. Lal, "Global carbon pools and fluxes and the impact of agricultural intensification and judicious land use. In Preservation of Land Degradation, Enhancement of Carbon Sequestration and Conservation of Biodiversity through Land Use Change and Sustainable Land Management with a Focus on Latin America and the Caribbean". *World Soil Resources Report*, 86, Rome: FAO, 1999.
- [4] R. Lal, "Los suelos y el cambio climático", in *Protección del suelo y el desarrollo sostenible*, Serie: Medio Ambiente N° 6, A. Callaba, I. Iribarren and P. Fernández, Ed. Madrid: Instituto Geológico y Minero de España, 2005, pp. 163-177.
- [5] R. Healy, R. Striegl, T. Russell, G. Hutchinson and G. Livingston, "Numerical Evaluation of Static-Chamber Measurements of Soil—Atmosphere Gas Exchange: Identification of Physical Processes", *Soil Science Society of America Journal*, vol. 60, no. 3, pp. 740-747, 1996.
- [6] J. Six, S. Ogle, F. Breidt, R. Conant, A. Mosiers and K. Paustian, "The potential to mitigate global warming with no-tillage management is only realized when practiced in the long term", *Global Change Biology*, no. 10, pp. 155-160, 2004.
- [7] J. Six, E. Elliott and K. Paustian, "Soil macroaggregate turnover and microaggregate formation: a mechanism for C sequestration under no-tillage agriculture", *Soil Biol. Biochem*, no. 32, pp. 2099-2103, 2000.
- [8] M. Robert, *Le sol: Interface dans l'environnement, ressource pour le développement*. Paris: Masson, 1996.
- [9] Cámara Nacional de Productores y Expostadores de Piña, CANAPEP. San José, Costa Rica, 2019. Disponible en <https://canapep.com/historia/>
- [10] Food and Agriculture Organization, "Sustainable agriculture production: For international agricultural research", Rep. of the Technical Advisory Com. Consultative Group on International Agricultural Research (CGIAR), Washington, DC, 1989.
- [11] R. Follett, "Soil management concepts and carbon sequestration in cropland soils", *Soil and Tillage Research*, vol. 61, no. 1-2, pp. 77-92, 2001.
- [12] Food and Agriculture Organization of the United Nations, "Conservation Agriculture", Roma, 2017. Disponible en: <http://www.fao.org/publications/card/en/c/981ab2a0-f3c6-4de3-a058-f0df6658e69f/>
- [13] I. Holdridge, "Ecología basada en zonas de vida" 1ª. ed. San José, Costa Rica: IICA, 1967.
- [14] R. Mata, "Mapa digital de suelos de Costa Rica". Centro de Investigaciones Agronómicas. Universidad de Costa Rica, 2009.
- [15] L. Tislade y W. Nelson, "Soil fertility and fertilizers" New York: Macmillan, 1993.
- [16] D.A. Angers, M.R. Carter, E.G. Gregorich, M.A. Bolinder, R.G. Donald, R.P. Voroney, C.F. Drury, B.C. Liang, R.R. Simard and R.P. Beyaert, "Agriculture Management Effects on Soil Carbon Sequestration in Eastern Canada", In: Beran M.A. (eds) *Carbon Sequestration in the Biosphere*. NATO ASI Series (Series I: Global Environmental Change), vol 33. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Quebec, 1995.
- [17] E. Malézieux, F. Côte y P. Bartholomew, "Crop environment, plant growth and physiology. Chapter 5. In The Pineapple, Botany, Production and Uses" 69–107, 2003.
- [18] Gregory, P.J., Simmonds, L.P., Warren, C.P. 1998. Interactions between plant nutrients, water and carbon dioxide as factors limiting crop yields. *Philosophical transactions of the Royal Society of London, Series B*, 352: 987-996.
- [19] Pearce D W., Cline W R., Achanta A N., Fankhauser S., Pachauri R K., Tol R S J., and Vellinga P. 1996. *The social costs of climate change: greenhouse damage and benefits of controls. In: Climate change (1995): Economic and Social Dimensions of Climate Change. Bruce et al (eds). Cambridge University Press, Cambridge.*
- [20] T. West and W. Post, "Soil organic carbon sequestration rates by tillage and crop rotation: a global data analysis", *Soil Science Society of America Journal*, no. 66, pp. 1930-1946, 2002.
- [21] A. Franzluebbers and M. Arshad, "Soil Organic Matter Pools during Early Adoption of Conservation Tillage in Northwestern Canada", *Soil Science Society of America Journal*, vol. 60, no. 5, pp. 1422-1427, 1996.
- [22] E. Krull, J. Skjemstad and J. Baldock, Grains Research & Development Corporation, "Functions of Soil Organic Matter and the Effect on Soil Properties", No CSO 00029, 2004.

- [23] Michelsen, A., Anderson, M., Kjoller, A., Gashew, M., 2004. Carbon stock, soil respiration and microbial biomass in fire- phone tropical glassland, woodland and forest ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 1707-1717.
- [24] Etcheverria, P., Huygens, D., Godoy, R., Borie, F. and Boeckx, P. 2009. Arbuscular mycorrhizal fungi contribute to 13C and 15N enrichment of soil organic matter in forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 858-861.
- [25] Sisti, C.P.J., dos Santos, H.P., Kohhann, R., Alves, B.J.R., Urquiaga, S. and Boddey, R.M. (2004) Changing carbón and nitrogen stocks in soil under 13 years of conventional or zero tillage in southern Brazil. *Soil and Tilage Research* 76, 39-58.
- [26] Feldpausch, T.R., Rondón, M.A., Fernandes, E.C.M., Riha, S.J., Wandelli, E. 2004. Carbon and nutrient accumulation in secondary forests regenerating from degraded pastures in Central Amazônia, Brazil. *Ecological Applications* 14, 164-176.
- [27] Nair, P.K.R., Nair, V.D., Kumar, B.M., Haile S.G., 2009. Soil carbon sequestration in tropical agroforestry systems: a feasibility appraisal. *Environmental Science and Policy*. En Prensa
- [28] Méndez, J., y Bertsch, F. (2012). Guía para la interpretación de la fertilidad de los suelos de Costa Rica. Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo (ACCS). 118 p.

Producción de proteínas recombinantes a partir de animales transgénicos: Sistemas y aplicaciones





Recombinant protein production from transgenic animals: Systems and applications

María Fernanda Alvarado-Madrigal¹, Tannia Chavarría-Quirós²,
Brayan Leiva-Montero³, Juan José Mora-Román⁴

Fecha de recepción: 22 de enero de 2019
Fecha de aceptación: 1 de mayo de 2019

Alvarado-Madrigal, M; Chavarría-Quirós, T; Leiva-Montero, B; Mora-Román, JJ. Producción de proteínas recombinantes a partir de animales transgénicos: Sistemas y aplicaciones. *Tecnología en Marcha*. Vol. 32-4. Octubre-Diciembre 2019. Pág 133-144.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i4.4798>

- 1 Estudiante de Licenciatura en Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. Correo electrónico: maria.alvaradomadrigal@ucr.ac.cr.
 <https://orcid.org/0000-0002-7472-4226>
- 2 Estudiante de Licenciatura en Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. Correo electrónico: tannia.chavarría@ucr.ac.cr.
 <https://orcid.org/0000-0002-0381-7599>
- 3 Estudiante de Licenciatura en Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. Correo electrónico: brayan.leiva@ucr.ac.cr.
 <https://orcid.org/0000-0002-3003-5269>
- 4 Máster en Bioquímica, Departamento de Farmacia Industrial, Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. Correo electrónico: juanjose.moraroman@ucr.ac.cr.
 <https://orcid.org/0000-0001-9148-3025>



Palabras clave

Biotecnología; Ingeniería Genética; animales transgénicos; proteínas recombinantes.

Resumen

El uso de animales transgénicos para la producción de proteínas recombinantes con fines terapéuticos ha sido una alternativa utilizada para la producción de medicamentos. La habilidad de realizar complejas modificaciones post traduccionales de una manera eficiente es una ventaja que este tipo de tecnología posee sobre el uso de otros organismos transgénicos. Por esta razón, a lo largo de los años se han desarrollado diferentes animales transgénicos (ruminantes, conejos, cerdos, aves e insectos) y se han estudiado distintos sistemas (leche, huevo, sangre, orina y fluido seminal) para la obtención de proteínas recombinantes. Cada animal y cada sistema cuenta con ventajas y desventajas, las cuales deben ser consideradas antes de comenzar el proceso productivo de la proteína de interés. Medicamentos como el ATryn®, el Ruconest® y el Kanuma® ya han sido aprobados por la FDA para la administración en humanos. El futuro de este tipo de preparados debe ser tomado en consideración, pues existen varias proteínas terapéuticas que se hallan en fase de investigación o a la espera de ser aprobadas y comercializadas.

Keywords

Biotechnology; Genetic Engineering; transgenic animals; recombinant proteins.

Abstract

The use of transgenic animals for the production of recombinant proteins for therapeutic purposes has been an alternative used for the production of drugs. The ability to make complex post-translational modifications in an efficient manner is an advantage that this type of technology has over the use of other transgenic organisms. For this reason, different transgenic animals (ruminants, rabbits, pigs, birds and insects) have been developed over the years and different systems (milk, egg, blood, urine and seminal fluid) have been studied to obtain recombinant proteins. Each animal and each system has advantages and disadvantages, which should be considered before starting the productive process of the protein of interest. Drugs such as ATryn®, Ruconest® and Kanuma® have already been approved by the FDA for human administration. The future of this type of preparations must be considered, given that there are several therapeutic proteins that are in the research phase or waiting to be approved and commercialized.

Introducción

La Biotecnología se define como el uso de organismos vivos en una materia prima dada con el propósito de obtener un producto en particular [1]. Previo a la implementación de la técnica de ADN recombinante para la producción de proteínas con fines terapéuticos, estas eran obtenidas por medios menos seguros, como es el caso del aislamiento de insulina del páncreas de cerdos o como la hormona del crecimiento, que se obtenía de cadáveres de personas. Esto representaba un reto, ya que con estos métodos existía un gran riesgo de contraer alguna enfermedad, debido a las inadecuadas técnicas de purificación con las que se contaba en esa época [2]. Debido a esto, la tecnología del ADN recombinante significó una gran revolución, pues aumentó la seguridad del proceso gracias a novedosas técnicas de purificación y se incrementó la cantidad de proteínas obtenidas [3].

Desde la comercialización del primer fármaco obtenido mediante dicha tecnología (insulina basal de efecto prolongado) en 1982 [2], la Biotecnología ha producido un gran impacto sobre la vida de las personas y sobre la Salud Pública. Además, el desarrollo de procesos a escala industrial ha representado un gran ingreso a las compañías farmacéuticas. Se estima que en el 2013 se obtuvieron ganancias por más de 175 000 millones de dólares por la venta de productos recombinantes [4]. Una de las razones de este gran auge está ligada a la variedad de disciplinas que abarca la Biotecnología, tales como Bioinformática, Ingeniería, Nanotecnología, Biología Molecular, Bioquímica, entre otras [5]. Este carácter interdisciplinario ha permitido el desarrollo de distintas estrategias de manufactura, una de las cuales es el uso de animales como biorreactores para la producción de proteínas recombinantes. A pesar de ser un proceso complicado, permite obtener grandes cantidades del producto de interés a un menor costo, en comparación a los procesos que utilizan células eucariotas aisladas [6]. Lo anterior ha promovido que distintos laboratorios de investigación y compañías farmacéuticas se centren en el perfeccionamiento y en la producción de nuevos productos biotecnológicos que lleguen a suplir una necesidad para mejorar la salud de la población.

El objetivo de la presente revisión es proporcionar información sobre la producción de proteínas recombinantes a partir de animales transgénicos y su aplicabilidad para la elaboración de productos biotecnológicos por parte de la industria farmacéutica.

Técnicas de ADN recombinante para la producción de proteínas

La implementación de la tecnología del ADN recombinante es uno de los grandes avances en el área de la Biotecnología. La misma permite transferir genes de una especie en el genoma de otra especie, con la finalidad de utilizar la maquinaria metabólica de esta última para producir una proteína que no sintetizaría de forma natural. Previo al desarrollo de esta metodología, los seres humanos ya utilizaban microorganismos, con la finalidad de obtener alimentos como pan y vino. Tales prácticas fueron estudiadas por Louis Pasteur, quien descubrió el papel esencial que poseían algunos de ellos sobre los procesos de fermentación [7]. A partir de estos conocimientos, se dio el auge de la industria de bioproducción de alimentos, la cual sigue siendo muy importante en la actualidad.

Durante la década de 1960, sucedió un progreso científico, debido a la elucidación de la estructura y de los mecanismos de la replicación, la expresión y la regulación de genes procariontes. Tal situación sentó las bases para el desarrollo de investigaciones para descubrir dichos procesos en células eucariotas [8]. Gracias a los hallazgos encontrados durante las mismas, en 1972 Berg, Cohen y Boyer introdujeron la tecnología del ADN recombinante, al construir el primer plásmido recombinante, introducido exitosamente en una bacteria. Esto sirvió como base para que años después se diera la expresión de la primera proteína humana en *Escherichia coli* [2]. En 1982, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) aprobó el uso del primer fármaco producido por medio de la tecnología del ADN recombinante, utilizando esta bacteria. Dicho fármaco fue denominado Humulin®, el cual es una insulina basal de efecto prolongado/intermedio [9].

Para el proceso de producción de proteínas recombinantes es necesario utilizar enzimas de restricción. Estas son enzimas cortadoras de ADN, es decir, son capaces de cortar el enlace fosfodiéster que une los nucleótidos adyacentes de este material genético. Dicho reconocimiento lo realizan a través de la ubicación de secuencias específicas de nucleótidos, usualmente cuatro a ocho pares de bases [10]. Su descubrimiento y su empleo han permitido elaborar mapas de plásmidos y del genoma de cada uno VEGF165 de los vectores utilizados para la producción de ADN recombinante, lo cual es esencial para conocer que segmentos del plásmido se pueden cortar para insertar el gen foráneo [11].

Otra herramienta esencial de esta tecnología son los plásmidos. Se trata de ADN extracromosómico capaz de codificar para proteínas que le brindan distintas funciones a la bacteria, como resistencia a los antibióticos, degradación de toxinas presentes en el medio, producción de proteínas que facilitan el proceso de replicación celular, entre otras [12]. La utilidad de los plásmidos es su capacidad para aceptar genes. Esto es una ventaja para la producción de ADN recombinante.

El éxito del proceso de inserción de los genes en el plásmido puede ser comprobado al añadir genes de resistencia hacia un antibiótico. Si con el tiempo se observa el desarrollo de resistencia hacia este, el proceso de inserción del material genético en la bacteria fue exitoso [13]. No obstante, esta técnica está en desuso debido a la problemática que representa la resistencia a los antibióticos hacia la Salud Pública. Por ello, se han desarrollado otras estrategias como la presencia de un sitio de restricción en el gen *lacZ*. Este gen es interrumpido por la inserción del ADN recombinante, ocasionando la disminución de la expresión de β -galactosidasa funcional. Para verificar esta situación, se añaden los sustratos de esta enzima y el inductor isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), el cual posee la función de promover la expresión de la enzima. Si la inserción fue exitosa, las colonias se presentan de color blanco. En contraposición, si la inserción no sucedió u ocurrió en una zona distinta a la del gen *lacZ*, las colonias se aprecian de color azul, como consecuencia de los productos derivados de la reacción en presencia de la enzima funcional [14].

Gracias a distintos estudios, se ha encontrado que es posible emplear esta técnica para insertar genes en modelos animales. En uno de ellos, con la ayuda del plásmido VEGF165, se ha logrado transferir el gen que codifica para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) en ratas Fisher, favoreciendo el proceso de angiogénesis. Esto es de utilidad en distintas patologías como enfermedades cardíacas isquémicas e isquemia en las extremidades inferiores [15]. Además, esta técnica posee aplicabilidad en modelos animales de mayor tamaño. Con la inyección de una solución con hidrogel de alginato, plásmidos que contenían el gen que codifica para la proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2, por sus siglas en inglés) y células estromales multipotentes de cabra, ha sido posible aumentar la formación de nuevas estructuras óseas en cabras [16].

Además de la clonación por medio de plásmidos, se usan bacteriófagos como el lambda (λ). En esta técnica, se inserta el ADN clonado dentro de los sitios de restricción en el centro del cromosoma λ . Dichos cromosomas recombinantes se insertan dentro de los fagos, los cuales infectan a la bacteria. Con ello, se lleva a cabo la inserción de varios genes, al ser posible cortar diversas partes del ADN viral. Además, como los bacteriófagos poseen mecanismos propios para insertar el material genético dentro de las bacterias, se produce ADN recombinante con una mayor tasa de éxito [17] [18].

Los bacteriófagos también son ampliamente utilizados en modelos animales. Por ejemplo, gracias al bacteriófago IME-SA1 se ha logrado obtener endolisina activa recombinante en especies bovinas, efectiva para el tratamiento de mastitis bovina producida por cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes (MRSA, por sus siglas en inglés) [19]. También se pueden emplear en animales más pequeños como los conejos para el tratamiento de osteomielitis crónica causada por MRSA [20]. Por todo esto, los plásmidos y los bacteriófagos son herramientas biotecnológicas de gran utilidad para la producción de proteínas recombinantes en animales transgénicos.

Sistemas y animales transgénicos para la producción de proteínas recombinantes de uso terapéutico

El uso de mamíferos como biorreactores en la industria biotecnológica permite la síntesis de proteínas que no pueden obtenerse a partir de otros organismos menos complejos. Esto se debe a que cuentan con la maquinaria enzimática necesaria para realizar diferentes modificaciones post traduccionales. La glicosilación de proteínas es una de ellas. Se trata de una modificación, ya sea en los grupos hidroxilo de los residuos de serina y de treonina (O-glicosilación) o en los grupos funcionales de las cadenas laterales de los residuos de asparagina (N-glicosilación). Otras modificaciones importantes de este tipo en mamíferos son la carboxilación de factores de coagulación en los residuos de ácido γ -carboxiglutámico, la adición de un residuo de sulfato en el grupo OH de la tirosina y la adición de grupos fosfato a cadenas laterales de aminoácidos (fosforilación) [21].

Asimismo, el uso de otros sistemas como bacterias puede llevar a la obtención de proteínas con propiedades no deseadas, incluyendo una alta inmunogenicidad y una falta de actividad, pues, como se mencionó anteriormente, no sufren modificaciones post traduccionales, necesarias para que sean funcionales para los seres humanos. Por otro lado, el uso de levaduras sí permite obtener ciertas modificaciones en las proteínas recién sintetizadas, pero son diferentes a aquellas que toman lugar en células de mamífero [22]. Adicionalmente, esos sistemas de expresión no pueden asegurar un adecuado plegamiento de las proteínas recombinantes [23] [24]. Por todo lo anterior, los animales transgénicos ofrecen oportunidades atractivas para la síntesis de proteínas con potencial terapéutico.

Dentro de las principales ventajas del uso de animales transgénicos están la posible disminución en los costos de producción (el costo de producción de una plataforma animal está estimada en una décima parte del costo de la construcción de un biorreactor para células [25]) y un aumento en la calidad de las proteínas, por todas las funciones capaces de realizar dichos animales a nivel genético [26].

Sin embargo, un inconveniente de este tipo de sistemas está en la dificultad de separar las proteínas humanas de la contraparte animal. Además, debe asegurarse que los patógenos animales no estén presentes en los preparados proteicos y que las proteínas recombinantes no sean activas o nocivas para los animales transgénicos [26].

Sistemas transgénicos utilizados para la obtención de proteínas recombinantes

Leche

La glándula mamaria ha sido considerada el tejido de elección para expresar proteínas recombinantes de gran valor en animales transgénicos, porque la leche es recolectada en grandes volúmenes en animales rumiantes [27] [28]. Como complemento, la glándula es capaz de realizar modificaciones post traduccionales y patrones de glicosilación similares a las humanas [29]. Por ello, este sistema suele utilizarse en cabras, ovejas y vacas [30].

En cuanto al producto de dicho tejido (la leche), ofrece la ventaja de que las proteínas recombinantes puedan estar almacenadas sin ningún tipo de alteración a la salud del animal, problema presentado cuando se utilizan otros sistemas como la sangre. Una excepción a la afirmación anterior está en la producción de eritropoyetina en leche de conejo. Esta provoca un aumento anormal en la cantidad de eritrocitos, impidiendo la reproducción exitosa de los animales, así como la obtención de leche de ellos, y ocasionando su muerte prematura [31].

También se ha reportado que otra ventaja de este sistema se relaciona con la cantidad de proteínas recombinantes obtenidas. Se indica la posibilidad de conseguir varios gramos por litro de leche producida [32] [33].

Sin embargo, la producción de proteínas en la leche se ve limitada debido al intervalo relativamente largo entre el nacimiento y la lactancia de los mamíferos rumiantes, la naturaleza discontinua en el ciclo de lactancia, y la cantidad de tiempo y de dinero invertidos en la manutención de estos animales [34]. Otro factor limitante es la dificultad en el posterior aislamiento de la proteína recombinante como consecuencia de la presencia de micelas de caseína y grasa en la leche. Esto implica la adición de procesos adicionales para la separación y la purificación de la proteína. Algunas de ellas son la centrifugación de los glóbulos de grasa seguida por la filtración en membrana de las micelas, los métodos de intercambio iónico, la separación de la caseína mediante el uso de ácido etilendiaminotetraacético (AEDT) y fosfato de calcio, la disminución de pH y la precipitación con polietilenglicol. Una desventaja que conlleva la separación de la caseína por precipitación usando dichas técnicas es la potencial pérdida de la proteína deseada, que puede quedar ocluida en el precipitado de caseína [35] [36] [37].

Clara de huevo

Recientemente se ha empezado a utilizar la clara de huevo para la obtención de proteínas recombinantes, debido a la creación de gallinas transgénicas. Las ventajas son que una única gallina puede producir más de 330 huevos al año, su producción se da en cortos períodos y la clara de huevo contiene cerca de cuatro gramos de proteína [38] [39].

Sangre

Este sistema ha sido considerado para aislar proteínas circulantes en sangre. No obstante, es poco ideal, debido a que el proceso de obtención es muy invasivo para el animal [40]. Junto con ello, el aislamiento de las proteínas humanas de las del animal puede tener cierta dificultad, especialmente cuando se deben separar a partir de sangre de cerdo, la cual posee proteínas con afinidades muy similares a su contraparte humana, dificultando la purificación mediante cromatografía de intercambio iónico [41] [42]. Además, las proteínas circulantes podrían afectar la vida del animal hasta hacerlo impráctico. Se ha demostrado que en cerdos transgénicos la sobreexpresión de la hormona de crecimiento produce un detrimento en su salud general, ocasionando letargo, úlceras gástricas, cojera y pérdida del libido [27] [43].

Orina

Distintas investigaciones han explorado la posibilidad de utilizar la vejiga como un biorreactor, al modificar las células que la revisten, y promover la producción y la secreción de proteínas a la orina [44] [45] [46] [47]. La ventaja de este sistema sobre la leche es que la producción de orina se da mucho más rápida, el proceso de purificación es más simple y se obtienen proteínas análogas a las humanas [40]. Asimismo, los efectos de las proteínas recombinantes son menos dañinos para la salud del animal en comparación con los de aquellas que se obtienen de la sangre [48]. El factor limitante es que la tasa de producción de proteínas es muy baja [40].

Fluido seminal

El fluido seminal se consideró para la secreción de proteínas recombinantes en animales transgénicos, ya que se ha podido recuperar hasta 30 mg de proteína por mL de líquido seminal porcino. En cuando al semen de jabalí, en 200 a 300 mL de este se recuperaron de seis a nueve gramos de proteína. Otra ventaja consiste en la automatización a gran escala de la recolección de semen de cerdos y jabalíes en unidades de inseminación artificial. Junto con

ello, la excreción de proteínas por este medio es meramente exocrino, minimizando el riesgo de que los productos recombinante puedan causar algún daño en la salud del animal [27]. Pero, una de las limitantes es que no se sabe aún el efecto que dicha expresión tiene sobre la fertilidad del animal y, consecuentemente, la posible afectación de la continuidad de la línea transgénica [49].

Animales transgénicos para la producción de proteínas recombinantes

Rumiantes

Son potencialmente la especie más apropiada para producir grandes cantidades de proteínas en leche. Las cabras transgénicas, por ejemplo, tienen una producción de leche promedio de entre 600 y 800 litros por animal en cada período de lactancia y se adaptan bien para la obtención de proteínas terapéuticas. El tiempo que transcurre desde la transferencia génica hasta la producción de leche es de 16 a 18 meses y se pueden llegar a obtener varios cientos de kilogramos de producto al año. Por su parte, las vacas lecheras pueden llegar a producir hasta 10 000 litros de leche al año. Por tanto, se pueden conseguir rendimientos en la producción de proteínas terapéuticas de decenas de kilogramos por vaca transgénica. A pesar de eso, toma más de tres años desde la transferencia del material genético hasta la obtención de la leche con los productos de interés [29].

En cuanto a las ovejas transgénicas, pueden llegar a producir hasta 300 litros de leche al año por oveja, su ciclo de lactancia es de 14 meses y se han obtenido rendimientos de hasta 35 g/L de proteínas recombinantes en su leche. La desventaja es que toma cerca de dos años el llegar a un nivel de producción adecuado después de la transferencia génica [24] [50] [51].

Otros aspectos a considerar con respecto a los rumiantes transgénicos son la necesidad de clonación para ser obtenidos o el uso de vectores lentivirales para la integración de genes ajenos, una reproducción relativamente lenta, la inadecuada glicosilación de las proteínas con respecto a los conejos y a los cerdos, y su sensibilidad a enfermedades ocasionadas por priones [26].

Conejos

Estos mamíferos heredan las modificaciones genéticas fácilmente a la descendencia, poseen una alta fertilidad, una producción de leche relativamente alta, insensibilidad a enfermedades por priones y no generan la transmisión de enfermedades severas a humanos. Asimismo, respecto a los rumiantes, poseen un intervalo de gestación corto, permitiéndoles tener hasta ocho períodos de lactancia al año. Aún así, sólo es posible recuperar 1,5 litros de leche por período de lactancia. Tal situación limita su valor como sistema de expresión a nivel industrial, ya que para obtener cantidades sustanciales de leche, sigue siendo necesaria una considerable cantidad de animales [26] [29].

Cerdos

El uso de cerdos en la producción de proteínas recombinantes tiene como punto negativo su costo [26]. Los cerdos hembra, en lactancia, pueden llegar a producir de 100 a 200 litros de leche y se ha reportado que las células de la glándula mamaria porcina puede llevar a cabo complejas modificaciones post traduccionales como γ -carboxilación, como se mencionó anteriormente [52].

Estos animales también han sido considerados para la recuperación de proteínas recombinantes de su fluido seminal. Las glándulas sexuales porcinas poseen una capacidad elevada para

la obtención de dichas sustancias, una producción continua de estas a través de toda la vida reproductiva del animal y la habilidad de producir modificaciones post traduccionales complejas [27].

Aves

El uso de gallinas transgénicas como biorreactores puede ser de utilidad dado su alto nivel de producción de proteínas recombinantes. Ha sido posible la creación de estas mediante el uso de vectores lentivirales y células germinales. Las células con genes foráneos son introducidas en embriones, produciéndose gallinas quiméricas capaces de secretar anticuerpos monoclonales en las claras de huevo [27].

Insectos

En muchos hay un rápido período de crecimiento larval, lo cual involucra una gran síntesis de proteínas antes de la pupación. Algunos insectos transgénicos han representado sistemas económicamente ventajosos para producir estas sustancias, debido a su corto tiempo de reproducción, la tecnología disponible para su producción en masa y la habilidad de ejecutar complejas modificaciones post traduccionales [53] [54]. Otra ventaja demostrada es que los genes insertados en su genoma pueden heredarse hasta 50 generaciones, haciendo viable la producción a gran escala de proteínas recombinantes obtenidas a partir de su hemolinfa [55].

Aplicaciones de los sistemas y animales para la obtención de proteínas recombinantes con usos terapéuticos

El desarrollo de animales genéticamente modificados para producir proteínas recombinantes con actividad terapéutica ha estado en curso por más de 30 años. Sin embargo, hasta el 2009 la FDA aprobó el primer medicamento de este tipo, registrado con el nombre de ATryn® [56]. Esta es una forma recombinante de la antitrombina humana producida en cabras [29]. La misma previene la formación de coágulos en pacientes que no poseen la proteína de forma endógena. Está indicado para deficiencia hereditaria de antitrombina, enfermedad que afecta a una en 3 000 a 5 000 personas [3].

Para el 2018, únicamente otras dos proteínas producidas a partir de animales genéticamente modificados han sido aprobadas para ser empleadas como medicamentos en humanos. Estas fueron registradas bajo los nombres comerciales Ruconest® y Kanuma®. Su aprobación por la FDA se llevó a cabo en el 2014 y en el 2015, respectivamente [57].

El Ruconest® o conestat alfa es un inhibidor recombinante de la C1 esterasa. Específicamente, es una glicoproteína soluble de cadena sencilla que contiene 478 aminoácidos y posee una masa molecular de 68 kDa, de los cuales aproximadamente el 22 % comprende estructuras de oligosacáridos. Se obtiene de la leche de conejos genéticamente modificados. Es una formulación estéril, libre de preservantes, y en forma de polvo liofilizado para su reconstitución y su posterior aplicación por vía intravenosa [58].

Este producto se emplea para el tratamiento de ataques agudos en pacientes con angioedema hereditario. Se trata de un desorden autosómico recesivo hereditario en la sangre, causado por la deficiencia de la proteína inhibitoria de la C1 esterasa. Dicha deficiencia causa síntomas agudos como inflamación excesiva en la cara, extremidades, genitales, tracto gastrointestinal y vías respiratorias superiores. Sin el adecuado tratamiento, el excesivo hinchamiento de las vías respiratorias puede llegar a amenazar la vida [59]. El propósito del medicamento es restablecer el nivel del inhibidor de C1 esterasa en el plasma, con el fin de tratar ataques agudos [58].

En cuanto a la sebelipasa alfa (Kanuma®), es una lipasa ácida lisosomal (LAL) humana recombinante desarrollada para ser usada como terapia enzimática de reemplazo a largo plazo en pacientes con deficiencia de esta enzima. Dicha deficiencia se debe a una enfermedad autosómica recesiva poco común relacionada con el almacenamiento lisosomal. Específicamente, es producto de mutaciones en el gen LIPA (en inglés) que codifica para la enzima LAL. Su deficiencia causa la acumulación de ésteres de colesterol y triglicéridos, particularmente en hepatocitos y macrófagos [60].

Kanuma® se administra por infusión intravenosa, reduciendo la acumulación de lípidos lisosomales. De esta forma, se disminuyen ciertos problemas relacionados a su deficiencia, entre ellas dislipidemias y anormalidades hepáticas. La proteína es producida y purificada mediante claras de huevo de gallinas transgénicas [60]. Actualmente, existen otras proteínas recombinantes obtenidas de leche de animales transgénicos con posible valor terapéutico, pero no han sido aprobadas, ni comercializadas [57]. Las mismas se detallan en el cuadro 1.

Cuadro 1. Proteínas recombinantes con valor terapéutico producidas a partir de animales transgénicos que se encuentran en fase de desarrollo [29] [61] [62] [63] [64].

Producto	Animal de producción	Empresa	Uso
Alfa-antitripsina (AAT)	Cabra	rEVO Biologics	-Terapia de reemplazo para la deficiencia de AAT (trastorno genético que puede causar problemas pulmonares) -AAT es el principal inhibidor de proteasas en el plasma humano
CD137 (4-1BB) mAb	Cabra	rEVO Biologics	-Tratamiento del cáncer y trastornos autoinmunes -CD137 (4-1BB) es una molécula coestimuladora que puede regular respuestas inmunes
MM-093 (AFP)	Cabra	Merrimack y rEVO Biologics	-Tratamiento de miastenia gravis, esclerosis múltiple, artritis reumatoide y psoriasis -Versión recombinante de la alfa-fetoproteína humana, la cual tiene función inmunomoduladora
Alfa-glucosidasa	Conejo	Pharming	-Tratamiento de la enfermedad de Pompe (defectos en el almacenamiento lisosomal), causada por deficiencia de alfa-glucosidasa -Enfermedad genera acumulación de glucógeno dentro de los lisosomas y el citoplasma, llevando a la destrucción de tejido

Conclusiones

Con el auge de la Biotecnología, la producción de proteínas terapéuticas a base de tecnología del ADN recombinante es uno de los métodos para la obtención de productos para el tratamiento de diversas enfermedades. Como fuente para la síntesis de proteínas (biorreactores) se cuentan con los animales transgénicos (ruminantes, conejos, cerdos, aves e insectos), cuyo genoma ha sido modificado a partir de plásmidos o bacteriófagos. Estos representan una alternativa a otros sistemas de expresión como bacterias, levaduras, hongos o células de mamífero, pues permiten la obtención de proteínas con modificaciones post traduccionales más complejas y a un costo de producción menor. Sin embargo, también muestran desventajas referentes a la purificación de los productos finales y los efectos de estos sobre la salud de los animales.

Como complemento, los sistemas transgénicos utilizados en la obtención de proteínas recombinantes incluyen la leche, los huevos, la sangre, la orina y el fluido seminal. La leche es el sistema más comúnmente elegido. Al igual que con los animales, cada sistema cuenta con ventajas y desventajas, las cuales deben ser consideradas antes de comenzar el proceso productivo de la proteína de interés.

Medicamentos como el ATryn®, el Ruconest® y el Kanuma® ya han sido aprobados por la FDA para la administración en humanos. El futuro de este tipo de preparados debe ser tomado en consideración, pues existen varias proteínas terapéuticas que se hallan en fase de investigación o a la espera de ser aprobadas y comercializadas.

Referencias

- [1] H. Almeida, M. H. Amaral, and P. Lobão, "Drugs obtained by biotechnology processing," *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47(2), 199-207, 2011.
- [2] K. Buchholz and J. Collins, "The roots—a short history of industrial microbiology and biotechnology," *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(9), 3747-3762, 2013.
- [3] C. Schmidt, "Belated approval of first recombinant protein from animal," *Nature Biotechnology*, 24(8), 877, 2006.
- [4] R. Evens and K. Kaitin, "The evolution of biotechnology and its impact on health care," *Health Affairs*, 34(2), 210-219, 2015.
- [5] N. K. Ganguly, S. Croft, L. Singh, S. Sinha, and T. Balganes, "Biomedicine and Biotechnology: Public Health Impact," *BioMed Research International*, 2014, 1-2, 2014.
- [6] M. V. Shepelev, S. V. Kalinichenko, A. V. Deykin, and I. V. Korobko, "Production of Recombinant Proteins in the Milk of Transgenic Animals: Current State and Prospects," *Acta Naturae*, 10(3), 40-47, 2018.
- [7] Y. H. P. Zhang, J. Sun, and Y. Ma, "Biomanufacturing: history and perspective," *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 44(4-5), 773-784, 2017.
- [8] P. Berg and J. E. Mertz, "Personal Reflections on the Origins and Emergence of Recombinant DNA Technology," *Genetics*, 184(1), 9-17, 2010.
- [9] J. Sandow, W. Landgraf, R. Becker, and G. Seipke, "Equivalent Recombinant Human Insulin Preparations and their Place in Therapy," *European Endocrinology*, 11(1): 10-16, 2015.
- [10] S. E. Wirt and M. H. Porteus, "Development of nuclease-mediated site-specific genome modification," *Current Opinion in Immunology*, 24(5), 609-616, 2012.
- [11] P. F. R. Little and S. H. Cross, "A cosmid vector that facilitates restriction enzyme mapping," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(10), 3159-3163, 1985.
- [12] P. Jajesniak and T. S. Wong, "QuickStep-Cloning: a sequence-independent ligation-free method for rapid construction of recombinant plasmids," *Journal of Biological Engineering*, 9(15), 2015.
- [13] J. Mairhofer, M. Cserjan-Puschmann, G. Striedner, K. Nöbauer, E. Razzazi-Fazeli, and R. Grabherr, "Marker-free plasmids for gene therapeutic applications—Lack of antibiotic resistance gene substantially improves the manufacturing process," *Journal of Biotechnology*, 146(3), 130-137, 2010.
- [14] J. A. Gossen, A. C. Molijn, G. R. Douglas, and J. Vijg, "Application of galactose-sensitive *E. coli* strains as selective hosts for LacZ⁻ plasmids," *Nucleic Acids Research*, 20(12), 3254, 1992.
- [15] J. Skóra, P. Barć, T. Dawiskiba, D. Baczyńska, and A. Mastalerz-Migas, "Angiogenesis after plasmid VEGF165 gene transfer in an animal model," *Central European Journal of Immunology*, 38(3), 305-309, 2013.
- [16] F. Wegman, R. E. Geuze, Y. J. van der Helm, F. Cumhur Öner, W. J. A. Dhert, and J. Alblas, "Gene delivery of bone morphogenetic protein-2 plasmid DNA promotes bone formation in a large animal model," *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 8(1), 763-770, 2014.
- [17] C. E. Catalano, "Bacteriophage lambda: The path from biology to theranostic agent," *Wiley Interdisciplinary Reviews Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 10(5), e1517, 2018.
- [18] E. M. Ryan, S. P. Gorman, R. F. Donnelly, and B. F. Gilmore, "Recent advances in bacteriophage therapy: how delivery routes, formulation, concentration and timing influence the success of phage therapy," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63(10), 1253-1264, 2011.

- [19] J. Fan, Z. Zeng, K. Mai, Y. Yang, J. Feng, Y. Bai et al, "Preliminary treatment of bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, with trx-SA1, recombinant endolysin of *S. aureus* bacteriophage IME-SA1," *Veterinary Microbiology*, 191, 65-71, 2016.
- [20] C. Kishor, R. R. Mishra, S. K. Saraf, M. Kumar, A. K. Srivastav, and G. Nath, "Phage therapy of staphylococcal chronic osteomyelitis in experimental animal model," *Indian Journal of Medical Research*, 143(1), 87-94, 2016.
- [21] D. G. Knorre, N. V. Kudryashova, and T. S. Godovikova, "Chemical and Functional Aspects of Posttranslational Modification of Proteins," *Acta Naturae*, 1(3), 29-51, 2009.
- [22] O. G. Maksimenko, A. V. Deykin, Y. M. Khodarovich, and P. G. Georgiev, "Use of Transgenic Animals in Biotechnology: Prospects and Problems," *Acta Naturae*, 5(1), 33-46, 2013.
- [23] Y. Durocher and Butler M, "Expression systems for therapeutic glycoprotein production," *Current Opinion in Biotechnology*, 20(6), 700-707, 2009.
- [24] A. L. Demain and P. Vaishnav, "Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms," *Biotechnology Advances*, 27(3), 297-306, 2009.
- [25] A. Dove, "Uncorking the biomanufacturing bottleneck," *Nature Biotechnology*, 20(8), 777-779, 2002.
- [26] L. M. Houdebine, "Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals," *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 32(2), 107-121, 2009.
- [27] M. K Dyck, D. Lacroix, F. Pothier, and M. -A. Sirard, "Making recombinant proteins in animals – different systems, different applications," *Trends in Biotechnology*, 21(9), 394-399, 2003.
- [28] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, "Producción y productos: Animales lecheros, 2018. Disponible en: <http://www.fao.org/dairy-production-products/production/production-dairy-animals/es/> (Accesado: 9-dic-2018)
- [29] Y. Echelard, C. A. Ziomek, and H. M. Meade, "Production of recombinant therapeutic proteins in the milk of transgenic animals," *Biopharm International*, 19(8), 36-46, 2006.
- [30] W. H. Eyestone, "Production and breeding of transgenic cattle using in vitro embryo production technology," *Theriogenology*, 51(2), 509-517, 1999.
- [31] M. Massoud, J. Attal, D. Thépot, H. Pointu, M. G. Stinnakre, M. C. Théron et al, "The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit when acidic protein gene promoter in transgenic rabbits", *Reproduction Nutrition Development*, 36(5), 555-563, 1996.
- [32] L. M. Houdebine, "The production of pharmaceutical proteins from the milk of transgenic animals," *Reproduction Nutrition Development*, 35(6), 609-617, 1995.
- [33] K. Potočník, V. Gantner, K. Kuterovac, and A. Cividini, "Mare's milk: composition and protein fraction in comparison with different milk species," *Mljekarstvo*, 61(2), 107-113, 2011.
- [34] R. J. Wall, D. E. Kerr, and K. R. Bondioli, "Transgenic Dairy Cattle: Genetic Engineering on a Large Scale," *Journal of Dairy Science*, 80(9), 2213-2224, 1997.
- [35] T. D. Wilkins and W. Velander, "Isolation of recombinant proteins from milk," *Journal of Cellular Biochemistry*, 49(4), 333-338, 1992.
- [36] Z. L. Nikolov and S. L. Woodward, "Downstream processing of recombinant proteins from transgenic feedstock," *Current Opinion in Biotechnology*, 15(5), 479-486, 2004.
- [37] T. Morçöl, Q. He, and S. J. D. Bell, "Model Process for Removal of Caseins from Milk of Transgenic Animals," *Biotechnology Progress*, 17(3), 577-582, 2001.
- [38] A. J. Harvey, G. Speksnijder, L. R. Baugh, J. A. Morris, and R. Ivarie, "Expression of exogenous protein in the egg white of transgenic chickens," *Nature Biotechnology*, 20(4), 396-399, 2002.
- [39] T. S. Park, H. G. Lee, J. K. Moon, H. J. Lee, J. W. Yoon, B. N. Yun et al, "Deposition of bioactive human epidermal growth factor in the egg white of transgenic hens using an oviduct-specific minisynthetic promoter," *The FASEB Journal*, 29(6), 2386-2396, 2015.
- [40] Y. Wang, S. Zhao, L. Bai, J. Fan, and E. Liu, "Expression Systems and Species Used for Transgenic Animal Bioreactors," *BioMed Research International*, 2013, 2013.
- [41] E. Reh binder, M. Engelhard, K. Hagen, and R. B. Jørgensen, R. Pardo-Avellaneda, A. Schnieke et al, "Promises and risks of biopharmaceuticals derived from genetically modified plants and animals," *Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 2009, p. 26.
- [42] M. E. Swanson, M. J. Martin, J. K. O'Donnell, K. Hoover, W. Lago, V. Huntress et al, "Production of functional human hemoglobin in transgenic swine," *Biotechnology (N Y)*, 10(5), 557-559, 1992.

- [43] V. G. Pursel, D. J. Bolt, K. F. Miller, C. A. Pinkert, R. E. Hammer, R. D. Palmiter et al, "Expression and performance in transgenic pigs," *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 40, 235-245, 1990.
- [44] D. E. Kerr, F. Liang, K. R. Bondioli, H. Zhao, G. Kreibich, R. J. Wall et al, "The bladder as a biorreactor: Urothelium production and secretion of growth hormone into urine," *Nature Biotechnology*, 16 (1), 75-79, 1998.
- [45] H. M. Zbikowska, N. Soukhareva, R. Behnam, R. Chang, R. Drews, H. Lubon et al, "The use of the uromodulin promoter to target production of recombinant proteins into urine of transgenic animals," *Transgenic Research*, 11(4), 425-435, 2002.
- [46] H. M. Zbikowska, N. Soukhareva, R. Behnam, H. Lubon, D. Hammond, and S. Soukharev, "Uromodulin promoter directs high-level expression of biologically active human α_1 -antitrypsin into mouse urine," *Biochemical Journal*, 365 (Pt 1), 7-11, 2002.
- [47] Z. Y. Ryoo, M. O. Kim, K. E. Kim, Y. Y. Bahk, J. W. Lee, S. H. Park et al, "Expression of recombinant human granulocyte macrophage-colony stimulating factor (hGM-CSF) in mouse urine," *Transgenic Research*, 10(3), 193-200, 2001.
- [48] P. Chrenek, A. V. Makarevich, J. Pivko, and J. Bulla, "Transgenic Farm Animal Production and Application," *Slovak Journal of Animal Science*, 43(2): 45-49, 2010.
- [49] L. R. Bertolini, H. Meade, C. R. Lazzarotto, L. T. Martins, K. C. Tavares, M. Bertolini et al, "The transgenic animal platform for biopharmaceutical production," *Transgenic Research*, 25(3), 329-343, 2016.
- [50] G. Wright, A. Carver, D. Cottom, D. Reeves, A. Scott, P. Simons et al, "High Level Expression of Active Human Alpha-1-Antitrypsin in the Milk of Transgenic Sheep," *Biotechnology (N Y)*, 9(9), 830-834, 1991.
- [51] N. Rudolph, "Technologies and economics for protein production in transgenic animal milk", *Genetic Engineering News*, 17(16), 36-37, 1997.
- [52] H. Luboń and R. K. Paleyanda, "Vitamin K-dependent protein production in transgenic animals," *Thrombosis and Haemostasis*, 78(1), 532-536.
- [53] M. Tomita, H. Munetsuna, T. Sato, T. Adachi, R. Hino, M. Hayashi et al, "Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons," *Nature Biotechnology*, 21(1), 52-56, 2003.
- [54] S. Maeda, T. Kawai, M. Obinata, H. Fujiwara, T. Horuchi, Y. Saeki et al, "Production of human alpha-interferon in silkworm using a baculovirus vector," *Nature*, 315 (6020), 592-594.
- [55] M. Markaki, D. Drabek, I. Livadaras, R. K. Craig, F. Grosveld, and C. Savakis, "Stable expression of human growth hormone over 50 generations in transgenic insect larvae," *Transgenic Research*, 16(1): 99-107, 2007.
- [56] W. Gavin, "ATryn®: 1st GE (genetically engineered) animal success story for production of a human recombinant pharmaceutical," *BMC Proceedings*, 8(Suppl 4), 2014.
- [57] A. Sánchez y J. Gadea, "Animales transgénicos para la producción de proteínas humanas," *Anales de Veterinaria de Murcia*, 30, 7-18, 2014.
- [58] M. P. Cruz, "Conestat Alfa (Ruconest): First Recombinant C1 Esterase Inhibitor for the Treatment of Acute Attacks in Patients With Hereditary Angioedema," *Pharmacy and Therapeutics*, 40(2), 109-114, 2015.
- [59] J. Lipozenčić and R. Wolf, "Life-threatening severe allergic reactions: urticaria, angioedema, and anaphylaxis," *Clinics in Dermatology*, 23(2), 193-205, 2005.
- [60] M. Shirley, "Sebelipase Alfa: First Global Approval," *Drugs*, 75(16), 1935-1940, 2015.
- [61] J. A. Bornhorst, F. R. O. Calderon, M. Procter, W. Tang, E. R. Ashwood, and R. Mao, "Genotypes and serum concentrations of human alpha-1-antitrypsin "P" protein variants in a clinical population," *Journal of Clinical Pathology*, 60(10), 1124-1128, 2007.
- [62] D. S. Vinay and B. S. Kwon, "4-1BB (CD137), an inducible costimulatory receptor, as a specific target for cancer therapy," *BMB Reports*, 47(3), 122-129, 2014.
- [63] V. N. Pak, "The use of alpha-fetoprotein for the treatment of autoimmune diseases and cancer," *Therapeutic Delivery*, 9(1), 37-46, 2018.
- [64] N. Raben, P. Plotz, and B. Byrne, "Acid α -Glucosidase Deficiency (Glycogenosis Type II, Pompe Disease)," *Current Molecular Medicine*, 2(2), 145-166, 2002.

Uso de la simulación en procesos de construcción

Use of simulation in construction processes

Alejandro Ramón-Elizondo¹, Róger Barboza-Arguedas²

Fecha de recepción: 3 de febrero de 2019

Fecha de aceptación: 21 de mayo de 2019

Alvarado-Madrigal, M; Chavarría-Quirós, T; Leiva-Montero, B; Mora-Román, J. Uso de la simulación en procesos de construcción. *Tecnología en Marcha*. Vol. 32-4. Octubre-Diciembre 2019. Pág 145-157.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i4.4799>



- 1 Ingeniero Civil. Correo electrónico: a.ramon@ricsacr.com. Ramón Ingeniería y Construcción S.A. Costa Rica.
 <https://orcid.org/0000-0002-2225-3880>
- 2 Ingeniero en Construcción. Ramón Ingeniería y Construcción S.A. Costa Rica. Correo electrónico: proyectos@ricsacr.com.
 <https://orcid.org/0000-0002-5121-4792>

Palabras clave

Procesos de construcción; operaciones de construcción; modelado; simulación; FlexSim.

Resumen

En un entorno económico como el actual, las empresas de construcción deben procurar que los procesos que se desarrollan en sus proyectos se caractericen por altos rendimientos y desempeños operacionales, sean eficientes en cuando al uso de materiales, cuenten con altas tasas de productividad de los recursos físicos y humanos y lo hagan en un ambiente de riesgos controlados. En este artículo se exploran las estrategias y herramientas relacionadas con el modelado y la simulación de procesos que pueden ayudar a conseguir estos fines y otros relacionados.

Para lograr esto primero se aborda la conceptualización necesaria para entender la gestión de procesos orientada a resultados, enseguida se profundiza en los conceptos del modelado y la simulación, así como otros temas relacionados, abordando aquí el uso y las características mas sobresalientes de los programas informáticos de simulación, incluyendo las ventajas y desventajas de su uso. Se ahonda luego en la descripción del software FlexSim, explorando sus principales características y facilidades que ofrece para su uso y para el análisis de los resultados de las simulaciones.

Luego de lo anterior se incluyen apartados en los que se amplía estos temas realizando un estudio más detallado, particularizándolos para relacionarlos con los procesos de construcción y la utilización de escenarios y su importancia para la gestión de riesgos y la depuración y validación de modelos.

Keywords

Construction processes; construction operations; modeling; simulation; FlexSim.

Abstract

In an economic environment like the present, the construction companies should procure that the processes they develop in their projects are characterized by high yields and operational performance, efficiency in the use of materials, high rates of physical and human resource productivity, and manage to do it under a risk-controlled environment. In this article are explored the strategies and tools related with the modeling and simulation of processes, that can help to get these purposes and others related.

To achieve it, first, it is necessary to address the conceptualization required to understand results-oriented process management. Next, going further in the concepts of modeling and simulation, and in other related subjects, leading at this point the use and the most outstanding characteristics of the software of simulation, including the advantages and disadvantages of its purpose. Then, intensifying the description of the FlexSim software, exploring the main features and the ease that it offers for the usage as well as for the analysis of the outcomes of the simulations.

Finally, some sections are included to expand these themes, making a particular and more detailed study to relate them with the construction processes and scenarios, and their importance for risks management, debugging and validation of models.

Introducción

La gestión efectiva de los proyectos de construcción debe incluir el análisis y mejoramiento de los procesos que los componen, ya que esto permite la incorporación de mejoras operacionales y de la de productividad en la ejecución de los distintos procesos.

La necesidad de las compañías de construcción de contar con sistemas que incluyan métodos para el modelado y simulación de procesos y operaciones se vuelve de esta manera evidente, sobre todo, si se añaden las virtudes que tienen estos modelos de permitir la gestión de la información y el conocimiento acumulado de cada procedimiento y de simular respuestas en distintos escenarios que responden a variaciones en las condiciones que intervienen en los proyectos. Todo lo que contribuye a la mejora del desempeño operacional y además permite que se aislen resultados no deseados antes de la implementación de los procesos en la realidad e incluyendo aspectos como el análisis de escenarios.

Con el progresivo desarrollo de la computación, la simulación en sistemas informáticos se ha convertido en una versátil herramienta que permite la experimentación, verificación y validación de procesos y que ha sido ampliamente probada en distintas aplicaciones de producción y de servicios, lo que valida su uso particular en los procesos de construcción.

Con el fin de fomentar el uso de la simulación de procesos de construcción, en este artículo se exponen las bases conceptuales para la implementación de sistemas modelado y simulación de procesos y operaciones de construcción. También se explora el uso de programas informáticos de simulación para la representación de procesos constructivos y el análisis de resultados que estos proveen en distintos escenarios

Conceptos relativos a los procesos, modelado y la simulación

Un ciclo de gestión de procesos tiene como etapas características las fases de modelado, que se configura como una representación fiable de la realidad deseada, la de simulación, que trata de la construcción y evaluación de escenarios, la de emulación, en la que se introducen datos reales en los modelos y escenarios proyectados y la de implementación real de los procesos [1]. Para entender y afianzar conceptualmente la Gestión de Procesos y la Simulación, enseguida se anotan los conceptos relacionados con estos.

Proceso

Un proceso es una transformación de entradas que se convierten en resultados de procesamiento o salidas. Si se dirige el enfoque más a los resultados que a las acciones, un proceso es mucho mas que una simple secuencia de actividades [1].

Modelado o modelación

Un modelo es la representación de la realidad en términos de sus características, construido a partir de algunos parámetros que se consideren como más importantes, por tanto, modelar un proceso es representarlo por medio de los componentes que se consideren de mayor importancia. Es común que durante el modelado se recurra a diseños de componentes y sus relaciones, especificaciones, niveles de calidad y tolerancia y a la determinación de eventualidades que se pueden presentar en el proceso, así como a planes de acción y contingencia para contrarrestarlas [1].

Simulación

El modelado puede implicar también la construcción de escenarios potenciales que puedan revelar situaciones que pudieran presentarse durante la ejecución del proceso. Estos escenarios surgen a partir de las simulaciones de variaciones en los valores normales de operación y de la verificación de los resultados y los impactos en curso, y pueden servir para tomar medidas correctivas previas a la implementación del proceso. La simulación es, por tanto, una evaluación de si las premisas del modelo funcionan según lo previsto, y una observación del comportamiento del proceso frente a la presencia de múltiples variables [1].

Si se considera en la definición de simulación su relación con recursos informáticos, habría que agregar que la simulación es el proceso de modelado computarizado de un sistema real con el fin de experimentar con escenarios numéricos que sirvan para entender el comportamiento de dichos los sistemas según distintos conjuntos de condiciones [2].

Emulación

La emulación es una extensión de la simulación que permite incluir datos reales junto a los cálculos ya efectuados. Con esto se ayuda en la confirmación de hipótesis o el hallazgo de errores [1].

Transformación

La transformación es el componente de los procesos que suscita los cambios, modifica las entradas del proceso y genera los resultados o valores [1].

Conectores

Los conectores son los medios por lo cuales los valores y las transformaciones se asocian para que se de la generación de resultados [1].

Puertas lógicas

Las puertas lógicas son componentes que sirven para representar que es necesario de que dos o más entradas estén disponibles para que ocurra una transformación, para recalcar que la salida de una transformación generó dos o más resultados o para simbolizar la posibilidad de que la transformación ocurra cuando está disponible sólo una de varias entradas [1].

Roles

En los procesos un resultado generado por una salida puede convertirse en entrada para otra parte del proceso. Por otro lado, no todas las entradas que contribuyen a la generación de un resultado tienen el mismo rol en la transformación, así, las entradas de un proceso que se transforman en un resultado se conocen como insumos, las entradas que orientan la transformación se denominan referencias y los elementos del proceso que son total o parcialmente consumidos en las transformaciones se designan como recursos [1].

Modelado

La intención del modelado es la de generar un modelo de procesos y operaciones que refleje de manera fiable la realidad, por tanto para iniciar se debe partir de la definición del objetivo que se busca al modelar el proceso. Ahora bien, teniendo en cuenta que es normal que en las organizaciones lo que se busca con estos procedimientos es la generación de valor, entregar mejores productos y servicios, generar satisfacción en los interesados y garantizar la aceptación de las entregas, se hace claro que la mejor alternativa para el planteamiento del modelado es la

de comenzar por los resultados y definir en concordancia los objetivos. Ya que las salidas de un proceso están asociadas a los resultados que genera, se hace entonces claro que el inicio de un modelado debe arrancar con la identificación de los resultados que el proceso debe generar.

En la figura 1 se establece la configuración un proceso de un proceso típico, en esta se resalta el elemento por el cual se debe iniciar el modelado, que es el o los resultados finales (valores) [1].

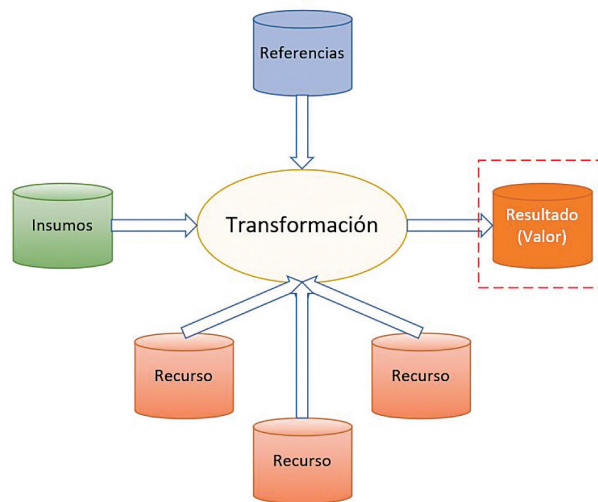


Figura 1. Configuración de un proceso típico, adaptado de [1].

Los resultados proyectados pueden provenir de normas, planos, especificaciones, planes estratégicos, objetivos prioritarios, las necesidades y expectativas de los interesados y otros documentos que señalen lo que se espera del proceso modelado. Una vez se tienen identificados los resultados esperados se debe describir la calidad requerida para estos resultados, esto garantiza una verificación permanente de la adecuación de lo que el proceso genera [1].

Transformación de las entradas en salidas

La descripción de las transformaciones debe contener como información fundamental la definición de la calidad que se espera al recibir cada uno de los componentes y esto se debe repetir para cada entrada del proceso: insumos, referencias y recursos. Siguiendo esta lógica, sólo se debe conectar las entradas con las salidas a través de las transformaciones, si todos los requisitos de calidad y los criterios de aceptación se ajustan, reflejando así el modelo una cadena de valor [1].

A partir de lo anterior, si los resultados y sus interacciones están bien identificados y especificados y si se tiene una apropiada descripción de la calidad de lo que va a generarse, se disminuye la posibilidad de que ocurra alguna condición no prevista [1].

Condiciones y acciones

Durante la ejecución del proceso se puede descubrir la existencia de algunas condiciones que exigirán tomar ciertas acciones para garantizar la concordancia de los resultados. Pueden ocurrir algunas condiciones del contexto, que si se detectan a tiempo, permiten evitar grandes trastornos sobre el trabajo. Los planes de acción pueden incluir contingencias y otros detalles, como la definición de responsables, que mejoran sustancialmente el conocimiento del proceso

y documentan la toma de decisiones antes de la ocurrencia de ocurrencia de algún hecho, lo que ayuda en la gestión de riesgos y de oportunidades derivados de cambios contextuales [1].

Actividades

La descripción de las actividades debe incluir los pasos necesarios para producir resultados con la calidad descrita y las características mencionadas en el proceso. Describir actividades, conociendo los demás componentes y requisitos del proceso permite registrar todo el conocimiento asociado en el momento del modelado y no sólo un conjunto de etapas o tareas [1].

Simulación

La simulación es la manera como se aproxima el modelo a la realidad que se busca representar. Para lograr esto se puede recurrir a una serie de modelos de simulación agrupados en varias clasificaciones, sin embargo, para el desarrollo de este artículo solo interesan los que se agrupan dentro de la clasificación de modelos discretos. Esta clasificación obedece al tipo de variable que se utiliza, la cual se limita solo a algunos valores específicos definidos por la presencia o ausencia de algún atributo, lo que es lo mismo, se orienta a un conjunto finito de valores [3].

De acuerdo con [4] los modelos de simulación de variable discreta presentan las siguientes características:

- Por su naturaleza de variable discreta se favorece la simulación de procesos de manufactura.
- Los sistemas informáticos de simulación creados siguiendo este modelo incluyen interfaces gráficas de usuario, animación y salidas reunidas automáticamente para medir el desempeño del sistema.
- Los resultados son desplegados en forma gráfica o tabular, son observables mientras corre la simulación y se pueden generar reportes a partir de estos.
- El análisis estadístico incluye intervalos de confianza para la medición del desempeño y su comparación.

Ahora bien, no para todos los sistemas o situaciones reales es viable aplicar una simulación, ya que dependerá de la conveniencia de invertir los recursos necesarios (tiempo y dinero) en su desarrollo. Aquellas situaciones que por su simplicidad no requieren una simulación o que por su complejidad demandarían una gran cantidad de recursos, no es conveniente simularlas [3].

En [2] se establecen algunas de condiciones específicas en las que es adecuada la simulación:

- Experimentación o procesos difíciles de observar o muy caros de realizar en sistemas reales.
- Problemas en los cuales el modelo matemático puede ser formulado pero las soluciones analíticas son demasiado complicadas.
- Si la validación del modelo matemático que describe el sistema resulta extremadamente cara de implementar.

Procedimiento de simulación

Si las condiciones son propicias para llevar a cabo una simulación en [2] se propone la siguiente secuencia de desarrollo:

- Identificar el problema.
- Formular el problema.
- Recolectar y procesar los datos del sistema real.
- Formular y desarrollar el modelo.
- Llevar a cabo el modelado.
- Documentar el modelo.
- Seleccionar el diseño del experimento.
- Establecer las condiciones experimentales para la simulación.
- Correr la simulación.
- Interpretar y presentar los resultados.
- Proponer cursos de acción.

Por otro lado en [5] se proponen los pasos que se muestran en el diagrama de flujo de la figura 2 para la creación de un modelo de simulación. En este diagrama fue adaptado y se introdujo el paso de la definición de los resultados esperados, como una etapa primordial propuesta por la gestión de procesos basada en resultados.

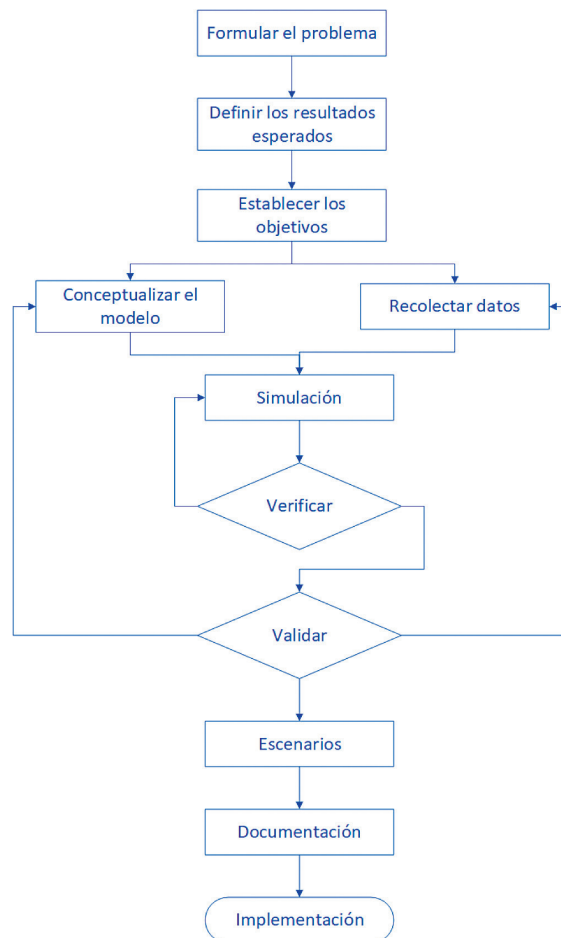


Figura 2. Pasos para la creación de un modelo de simulación, adaptado de [5].

Ventajas y desventajas del uso de la simulación

De acuerdo con [5] dentro de las principales ventajas de elaborar modelos de simulación se encuentran:

- Permite evaluar todos los aspectos para la toma de decisiones necesarios para apreciar el impacto de los cambios o adiciones antes de implementar un sistema.
- Facilita el explorar nuevas políticas y procedimientos sin interrumpir la operación de los procesos del sistema real.
- Logra presentar un proceso en la escala de tiempo que se requiera, acelerando o disminuyendo su marcha y obteniendo información más o menos detallada según se necesite.
- El análisis de resultados y condiciones permite dilucidar el origen de algunas situaciones.
- Con un modelo válido de simulación se pueden explorar diferentes posibilidades de comportamiento de un sistema.
- Hace factible diagnosticar problemas presentes en los procesos de producción.
- Puede poner de manifiesto en qué proceso se produce una demora del sistema.
- Identifica restricciones o cuellos de botella en un proceso.
- Visualiza el plan de trabajo.
- Ofrece un punto de vista objetivo y racional para la propuesta de cambios y prepara los procesos para estos cambios.
- La inversión resulta más baja con relación a los costos de implementación de los cambios.
- Ayuda en la obtención de requerimientos específicos de un sistema.

Dentro de las posibles desventajas de utilizar la simulación en [2] se refieren a las siguientes:

- En situaciones complejas requiere equipo costoso y la obtención de los resultados puede tomar un tiempo considerable.
- Por ser una aproximación del sistema real no genera necesariamente las soluciones óptimas para los problemas.
- El usuario debe generar las condiciones y restricciones.
- Se requiere de equipo informático, software especializado y del conocimiento y entrenamiento necesarios para poder aplicarlo.
- Por ser un enfoque iterativo de ensayo y error puede generar diferentes soluciones.

Los sistemas de simulación son medios para producir una aproximación de la realidad, pero no para reemplazarla, de aquí que será conveniente su utilización si se hace de manera adecuada y conociendo sus limitaciones y particularidades [2].

Software de simulación de procesos

Los programas informáticos de simulación permiten resolver procesos cuyo análisis por medio de métodos tradicionales resulta muy complejo. Gracias al uso de estos sistemas se construyen modelos que permiten imitar el desarrollo de los procesos en la realidad, agregando el beneficio de que la repetición de la simulación faculta para reunir un número importante de observaciones sobre el comportamiento del proceso, a partir de las cuales, mediante técnicas de análisis estadístico y probabilístico, es posible reunir información y conclusiones sobre el funcionamiento del sistema real [6].

En la actualidad existen comercialmente una variedad importante de programas informáticos de simulación y virtualización de procesos, que resultan sencillos e intuitivos en su utilización. Algunos programas incluyen inclusive simulación animada en 3D, lo que agrega una mejor comprensión de los procesos. Dentro de estas herramientas informáticas de simulación se encuentran Anylogic, Arena, ProModel, Flexsim, IndustrySim, Simio y muchas otras de uso general y de uso más específico para ciertas industrias [6].

Para conocer las características principales de los programas de simulación modernos se realizará la revisión de las propiedades principales del software FlexSim, ya que este puede resultar versátil para la simulación de procesos y operaciones de construcción.

FlexSim es un software con un ambiente orientado a objetos con animación 3D en la visualización de los modelos, permite el modelado y simulación de actividades y procesos de sistemas de producción sin la necesidad de programaciones especializadas. Utiliza objetos parametrizados que representan, entre otros, procesos, transportes y colas, teniendo cada objeto localización en el espacio, velocidad, rotación y un comportamiento específico [7].

El software permite además la inclusión de escenarios del tipo ¿qué pasa sí? que corren automáticamente guardando los resultados en forma tabular, gráficos y reportes. Se puede analizar el desempeño de cada escenario mediante la utilización de una serie de indicadores y variables definidos por el usuario [8].

Para [9] las siguientes características justifican el uso de FlexSim para la simulación de procesos:

- Es un software orientado a objetos lo que permite una mejor visualización del flujo del proceso.
- La interfaz gráfica de usuario facilita y posibilita la optimización del sistema simulado.
- Posee un entorno realista y ambiente 3D que aporta a la comprensión del proceso.
- Permite importar objetos y archivos desde programas como: AutoCAD, SketchUP, SolidWorks, Excel y otros.
- Permite la simulación de sistemas discretos y de sistemas combinados continuos-discretos.
- Facilita el programar escenarios y condiciones variadas.
- Utiliza distribuciones de probabilidad que pueden ser representadas con gran precisión.
- La visualización de resultados posee una gran calidad ya que utiliza tablas, gráficos y reportes con estadísticas variadas.
- Su aplicación se puede adaptar para diferentes campos como el de salud, logística, manufactura, construcción, minería, servicios y muchos otros.

Modelado y simulación en las operaciones de construcción

Para un mejor entendimiento del modelado y simulación de las operaciones de construcción se recurre a la ejemplificación de la metodología por medio de un caso sencillo. Se describe el modelado y simulación de un proceso típico de los proyectos de construcción, un movimiento de tierras, para esto se realiza el análisis, modelado y la definición de las variables del proceso. La descripción incluye las etapas que se deben seguir para el modelado de las operaciones que componen el movimiento tierras.

Se tiene que anotar que aunque el ejemplo se trata de un proceso muy sencillo, esto no disminuye los alcances que ofrece el modelado y posterior simulación de procesos de construcción, ya que se pueden desarrollar análisis mucho más complejos por medio de estos procedimientos [10].

Modelado

En [10] se recomienda la definición de un modelado de procesos de construcción siguiendo estas etapas:

- Definición del proceso a modelar.
- Identificación de los insumos, recursos y unidades de flujo más importantes.
- Identificación de todos los estados posibles de las unidades de flujo (productivo, contributivo, no productivo).
- Identificación de los ciclos individuales de los recursos.
- Integración de los ciclos individuales de los recursos antes definidos.
- Ubicación de los recursos.
- Determinación de la duración de las actividades.
- Validación y verificación del modelo.

Siguiendo estas recomendaciones se contemplan la utilización de recursos que comprenden un cargador y vagonetas que cumplen con procesos cíclicos de acopio, carga, viaje para descarga, descarga y viaje para carga. Las dos últimas etapas de la lista anterior son más factibles de ser incorporadas en la simulación informática del proceso y en la simulación de escenarios, que se esbozan seguido de este apartado.

Los elementos del flujo del proceso incluyen: suelo en sitio de excavación, suelo excavándose y acopiándose, suelo cargándose en las vagonetas, suelo cargado en las vagonetas, suelo transportado hacia sitio de descarga y suelo descargándose [10].

El modelado del proceso incluye las operaciones individuales del cargador y las vagonetas que posteriormente serán combinadas en un ciclo relacionado. Se identificaron ciclos que delimitan sus movimientos, para el cargador el ciclo es el que describe en la figura 3 y para las vagonetas el que describe en la figura 4. Los ciclos relacionados combinados se muestran en la figura 5.

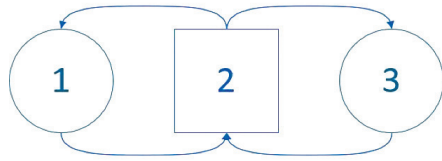
Simulación

A partir del modelado se definen los subprocesos, los insumos, recursos y unidades de flujo necesarios y se han identificado los ciclos de los recursos. Para la simulación se hace necesario determinar además la duración de las actividades, las cantidades que se manejarán en las etapas distintas de los ciclos, estimar la disponibilidad de los insumos y recursos, estimar las velocidades, los tiempos de transporte y espera o la distribución en que se presentan y definir las condiciones y restricciones que afectan el proceso [11].

Está más allá del alcance de este artículo el mostrar la programación de la simulación en el software y la obtención y análisis de resultados, por lo que únicamente se presenta gráficamente en la figura 6 su inclusión en el programa FlexSim, que muestra los mismos ciclos relacionados definidos en el modelado.

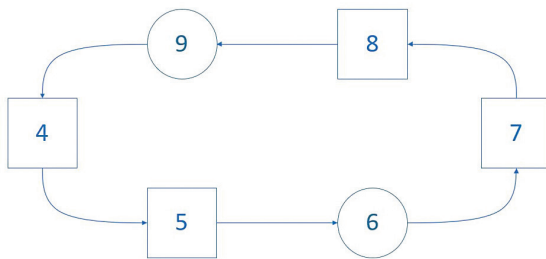
Escenarios

La simulación de escenarios permite anticipar situaciones con posibilidad de presentarse cuando el proceso esté en funcionamiento, lo que posibilita validar el modelo que se elaboró y tomar las debidas medidas correctivas con anticipación a la implementación [1].



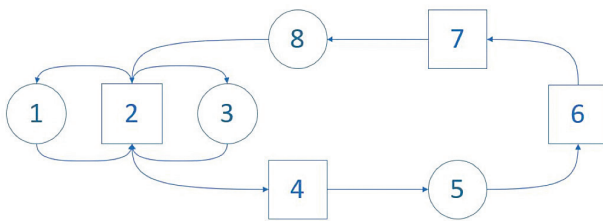
1. Cargador disponible.
2. Cargador llenando la vagoneta.
3. Material acopiado para ser cargado.

Figura 3. Ciclo del cargador, adaptado de [10].



4. Vagoneta siendo cargada.
5. Viaje de la vagoneta para descargar.
6. Vagoneta esperando para descargar.
7. Vagoneta descargando.
8. Viaje de la vagoneta para cargar.
9. Vagoneta esperando para ser cargada.

Figura 4. Ciclo de las vagonetas, adaptado de [10].



1. Cargador disponible.
2. Cargador llenando la vagoneta.
3. Material acopiado para ser cargado.
4. Viaje de la vagoneta para descargar.
5. Vagoneta esperando para descargar.
6. Vagoneta descargando.
7. Viaje de la vagoneta para cargar.
8. Vagoneta esperando para ser cargada.

Figura 5. Ciclo combinado, adaptado de [10].

Siguiendo con el ejemplo tratado, con el fin de realizar análisis ¿qué pasa sí? del proceso, se pueden plantear diferentes escenarios que tiene posibilidad a ocurrir, como incluir tiempos de excavación superiores a lo estimado inicialmente por condiciones particulares del suelo a excavar, excavación en suelo saturado, excavación en suelo no saturado, inclusión de tiempos por salida de maquinaria por reparaciones y otros. Para finalizar es factible realizar una combinación de los escenarios para simular la condición más crítica que puede afectar al proceso [12].

Conclusiones

Para realizar un correcto modelado de procesos se debe partir del resultado o valor a ser generado y enseguida identificar los elementos más importantes para su correcta implementación. Se debe definir también la calidad que se espera que presente el resultado y las condiciones en las que el proceso será eventualmente ejecutado.

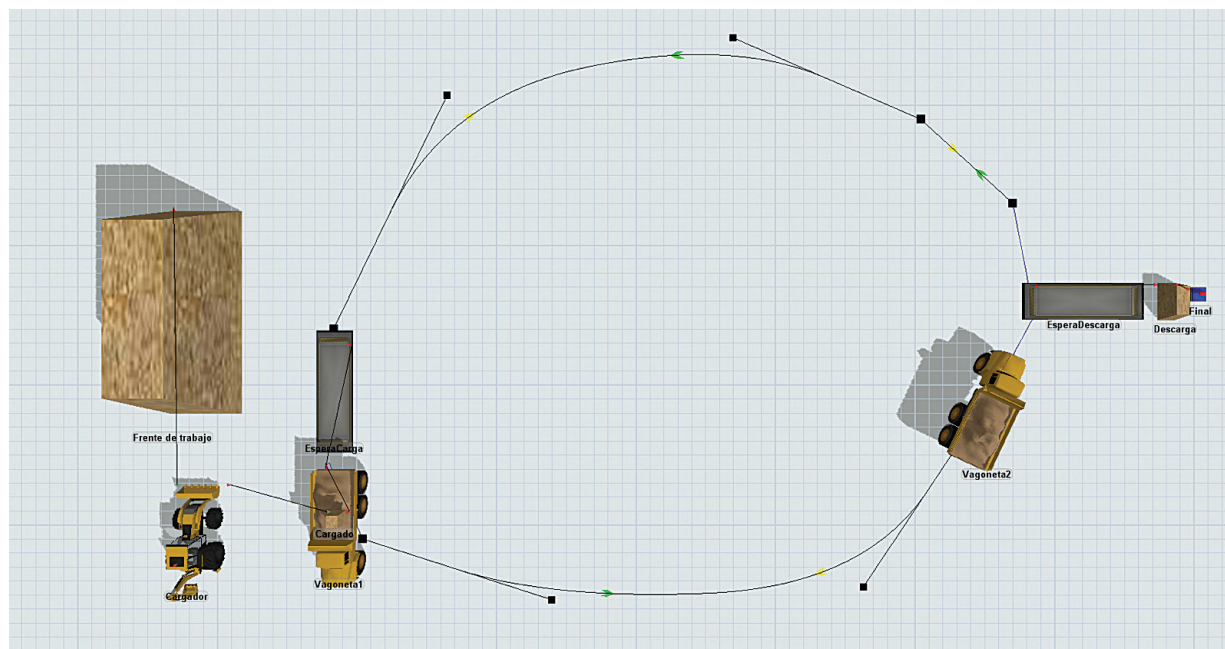


Figura 6. Representación gráfica de la simulación del ejemplo en FlexSim.

Para lograr la calidad establecida en los resultados se debe extender su definición para abarcar no solo las salidas del proceso, si no, todas las entradas que incluyen los insumos, las referencias y los recursos.

El uso de la simulación de procesos puede mejorar la eficiencia y el desempeño operacional, ya que gracias a la simulación es posible adelantar decisiones sobre probables cambios a efectuar en los procesos, efecto de situaciones indeseadas o el efecto de múltiples variables mucho antes de su implementación en la realidad.

Una buena gestión de los procesos debe ocuparse de minimizar los riesgos asociados a estos. Esto se puede lograr con el uso de simulaciones y escenarios que logren una representación cercana a realidad, la verificación de algún efecto adverso durante la implementación de los procesos, la falta de algún componente vital o cualquier otro tipo de trastorno o situación emergente que perjudique los procesos y las operaciones del proyecto.

Referencias

- [1] B. Palvarini y C. Quezado. *Gestión de Procesos Orientada a los Resultados*. Brasilia, Brasil: Vertysys, 2013.
- [2] J. Cantú, M. Guardado y J. Balderas. "Simulación de procesos, una perspectiva en pro del desempeño operacional", *Revista Iberoamericana de Producción Académica y Gestión Educativa*. no. 4, pp. 1-21, enero-junio 2016.
- [3] B. Render, R. Stair y M. Hanna. *Métodos Cuantitativos para los Negocios*. México D.F., México: Pearson Education, 2012.
- [4] D. Möller. *Introduction to Transportation Analysis, Modeling and Simulation*. Londres, Inglaterra: Springer, 2014.
- [5] J. Banks, J. Carson, B. Nelson y D. Nicol. *Discrete-Evet System Simulation*. New Jersey, EE. UU.: Prentice Hall, 2005.
- [6] Xunta de Galicia. "Oportunidades de la Industria 4.0 en Galicia" en Estado del Arte en Modelización, Simulación y Virtualización de Procesos. Santiago de Compostela, España: 2017, pp. 2 - 34.
- [7] I. Simón. *Un Primer Paso a la Simulación con FlexSim*. Madrid, España: FlexSim Iberia, 2016.

- [8] D. Casadiego. *Guía de Usuario para el Modelamiento y Análisis con el Software FlexSim*. Cúcuta, Colombia: Universidad Francisco de Paula Santander, 2015.
- [9] I. Simón, F. Santana, R. Granillo y V. Piedra. “La simulación con FlexSim, una fuente alternativa para la toma de decisiones en las operaciones de un sistema híbrido”, *Científica*, vol.17, no. 1, pp. 39-49, enero-marzo 2013.
- [10] R. Verbal y A. Serpell. “Modelación y simulación de operaciones de construcción”, *Revista Ingeniería de Construcción*, pp.1-19, julio-diciembre 1992.
- [11] M. Verdecho, J. Alfaro y D. Pérez. *Ejercicios Resueltos Mediante el Software FlexSim*. Valencia: Universitat Politècnica, 2011.
- [12] A. Gómez. “Simulación de procesos constructivos”, *Revista Ingeniería de Construcción*, vol. 25, no. 1, pp. 121-141, abril 2010.

Evaluación del uso de Redes Bayesianas Dinámicas para la predicción del avance de la Sigatoka negra y la productividad en cultivos agrícolas

Evaluation of Dynamic Bayesian Networks for predicting the progress of the Black Sigatoka and the productivity in crops

Luis Alexander Calvo-Valverde¹, Sebastián Argüello²,
José-Antonio Guzmán-Alvarez³, Mauricio Guzmán-Quesada⁴,
Miguel González-Zúñiga⁵

Fecha de recepción: 2 de noviembre de 2018

Fecha de aceptación: 3 de febrero de 2019

Calvo-Valverde, L; Argüello, S; Guzmán-Alvarez, JA; Guzmán-Quesada, M; González-Zúñiga, M. Evaluación del uso de Redes Bayesianas Dinámicas para la predicción del avance de la Sigatoka negra y la productividad en cultivos agrícolas. *Tecnología en Marcha*. Vol. 32-4. Octubre-Diciembre 2019. Pág 158-170.


 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i4.4800>

1 Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo (DOCINADE), Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Maestría en Computación. Programa Multidisciplinar eScience. Correo electrónico: lcalvo@itcr.ac.cr.

 <https://orcid.org/0000-0003-3802-9944>

2 Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Maestría en Computación. Correo electrónico: sebastian.arguello@gmail.com.

3 Corporación Bananera Nacional S.A. (CORBANA). Costa Rica. Correo electrónico: jguzman@corbana.co.cr.

 <https://orcid.org/0000-0002-8729-8457>

4 Corporación Bananera Nacional S.A. (CORBANA). Costa Rica. Correo electrónico: mguzman@corbana.co.cr.

5 Corporación Bananera Nacional S.A. (CORBANA). Costa Rica. Correo electrónico: mgonzalez@corbana.co.cr.



Palabras clave

Redes Bayesianas Dinámicas; Redes Bayesianas; Modelos Gráficos Probabilísticos.

Resumen

Los Modelos Gráficos Probabilísticos (MGP) utilizan una representación basada en grafos para codificar de manera compacta distribuciones complejas en espacios de alta dimensionalidad. Un tipo de MGP son las Redes Bayesianas Dinámicas (RBDs) que se caracterizan por ser un sistema estacionario homogéneo, lo que permite que con ellas se pueden representar, de una manera compacta, grandes cantidades de información de muchas variables.

En este trabajo se estudia la capacidad de predicción de las RBDs en cuanto al avance de la Sigatoka negra y la productividad del cultivo, utilizando los datos proporcionados por CORBANA. Estos datos tienen información histórica del clima y de dos fenómenos: el avance de la enfermedad denominada Sigatoka negra y la productividad del cultivo del banano. Para esto se comparó la capacidad de predicción de la RBDs con la de las Redes Bayesianas (RBs).

Se diseñaron e implementaron una RBD y una RB que representan las relaciones encontradas en los datos, y con ellas se llevaron a cabo experimentos para identificar cómo los distintos factores inciden en la capacidad de predicción de las mismas. Los resultados obtenidos en los experimentos mostraron que la capacidad de predicción de las RBDs no supera la de las RBs utilizando los datos de la Corporación Nacional Bananera. De hecho, no se observó una diferencia significativa entre ambos tipos de red. Además, se observó gran diferencia en las ventajas teóricas del modelo de las RBDs frente a otros MGPs. Ya que en la práctica las limitaciones de las implementaciones disponibles hacen que no sea atractivo su uso.

Keywords

Dynamic Bayesian Networks; Bayesian Networks; Probabilistic graphical Models.

Abstract

The Probabilistic Graphical Models (PGM) use a representation based on graphs to encode complex distributions in high dimensional spaces compactly. One type of PGM are the Dynamic Bayesian Networks (DBN) characterized for being a stationary and homogeneous system, allowing to represent huge amount of information of multiple variables in a compact way.

In this paper the prediction capacity of the DBN on the evolution of the Black Sigatoka and the crops productivity, using the data from CORBANA is studied. This data contains historical information of the weather and of two phenomena: the evolution of the Black Sigatoka and the productivity of the crops. The prediction capacity of the DBN was compare with the Bayesian Networks (BN).

A DBN and a BN were design and implemented representing the variables found on the data and their relations. Using them different experiments were done to determine the influence of the factors on their capacity of prediction. The obtained results on the experiments showed that the prediction capacity of the DBNs is not better that the prediction capacity of the BN using the data from CORBANA. In fact, there was not a significant difference when the network was changed. Although the DBN presented several theoretical advantages in comparison with other PGMs, in practice they were not observed. This happened because of the limitations of the available implementation of framework for using PGMs, making the DBNs not as attractive.

Introducción

Los Modelos Gráficos Probabilísticos (MGPs) utilizan una representación basada en grafos para codificar de manera compacta distribuciones complejas en espacios de alta dimensionalidad [1]. La representación gráfica puede ser interpretada de dos formas: como un conjunto de las independencias que se mantienen en la distribución, o cómo la agrupación de las probabilidades de factores más pequeños. Ambas son inducidas por la estructura del grafo [1].

Un tipo de MGP son las Redes Bayesianas Dinámicas (RBDs), que se caracterizan por ser un sistema estacionario homogéneo. Esto implica que sus variables solamente dependen del estado de la variable en el estado anterior, y además que el modelo no cambia a través del tiempo [1]. Estas características permiten que con ellas se pueden representar, de una manera compacta, grandes cantidades de información de muchas variables.

En este trabajo se estudia la capacidad de predicción de las RBDs en cuanto al avance de la Sigatoka negra y la productividad del cultivo, utilizando los datos proporcionados por CORBANA [2]. Estos datos tienen información histórica del clima y de dos fenómenos: el avance de la enfermedad denominada Sigatoka negra y la productividad del cultivo del banano. Para esto se comparó la capacidad de predicción de la RBDs con la de las Redes Bayesianas (RBs).

Antecedentes teóricos

Se presentan seguidamente algunos conceptos fundamentales para la comprensión de la presente propuesta.

Modelos Gráficos Probabilísticos

Los modelos gráficos probabilísticos utilizan una representación basada en grafos para codificar, de manera compacta, distribuciones complejas en espacios de alta dimensionalidad [1].

Redes Bayesianas

Las Redes Bayesianas (BN) utilizan un grafo acíclico dirigido para codificar la información. En estos grafos, los nodos son variables aleatorias y las aristas representan la influencia directa entre un nodo y otro [1]. Las relaciones entre los nodos del grafo representan la influencia que tienen entre sí. Cada uno de los nodos tiene una tabla de probabilidades asociada.

Los elementos básicos que deben ser definidos para poder modelar una BN son: las variables, la estructura del grafo y las probabilidades iniciales.

Modelos Ocultos de Márkov

Los Modelos Ocultos de Márkov (MOM) son modelos temporales probabilísticos en los que el estado es descrito utilizando una única variable aleatoria. Los valores posibles de las variables son los estados posibles del sistema. Cuando un modelo requiere de dos o más variables estado, éstos se fusionan en una única mega variable cuyos valores son todas las tuplas de los valores de las variables estado individuales. Esto restringe la estructura de los MOM y permite una implementación matricial simple y elegante de todos los algoritmos básicos [3]. Lo anterior se consigue a expensas de crear una matriz cuyo tamaño es dependiente de la cantidad de las variables estado del sistema, y en consecuencia, aumentando el costo en recursos y el costo computacional de los algoritmos que se realicen sobre ésta.

Redes Bayesianas Dinámicas

Las Redes Bayesianas Dinámicas (RBDs) son una extensión a las RBs. Permiten representar no solamente el estado en un momento dado del evento que se está modelando, sino que además permiten modelar su evolución a través del tiempo [1].

Inicialmente se hace una simplificación que consisten en utilizar tiempo discreto. Se asume que las mediciones del sistema van a ser tomadas en intervalos regulares y una granularidad de tiempo dada. Resultaría muy costoso representar tanta información en un modelo para cada tiempo T , más aún si se está modelando un sistema con una gran cantidad de variables e información. Para resolver este problema es necesario presentar dos conceptos que se van a asumir para este modelo: la Propiedad de Márkov y la estacionalidad. Con la Propiedad de Márkov, se asume que el futuro es condicionalmente independiente del pasado, dado el presente. En otras palabras, que el sistema carece de memoria. Lo que permite representar la distribución que se está modelando de manera más compacta [1].

La otra suposición en la que estamos interesados es la homogeneidad o estacionalidad. Un sistema de Márkov es homogéneo si es igual para todo tiempo T . Es decir que las dinámicas del modelo no cambian a través del tiempo [1].

Con estas dos suposiciones, solamente necesitamos representar el estado inicial de la distribución y el modelo de transición $P(X' | X)$. El modelo de transición que representa las dinámicas del modelo $P(X' | X)$, es conocido como Plantilla de Modelo de Transición. Esta transición es una distribución probabilística condicional, que puede representarse como una Red Bayesiana Condicional. Es decir una red en el tiempo T . El, que depende del estado anterior de la red [1].

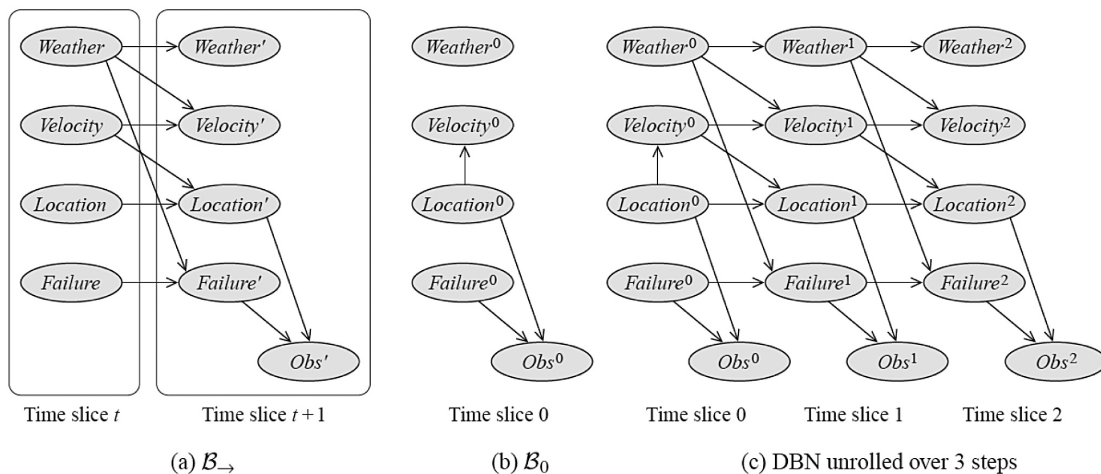


Figura 1. Ejemplo Red Bayesiana Dinámica.

Ahora podemos construir el concepto de Redes Bayesianas de dos fragmentos de tiempo (2TBN por sus siglas en inglés). Los nodos de una 2TBN sobre las variables $X_1..X_n$, incluirá todo las variables X y un subconjunto de las variables de X . En un 2TBN solamente los nodos $X'_1, ..., X'_n$ tendrán padres y su propia distribución conjunta, y define la siguiente distribución conjunta: $P(X' | X) = \prod_{i=1}^n P(X'_i | P_{ax'_i})$ [1].

Como se puede ver en la Figura 1, solamente las variables en el tiempo $t + 1$, es decir X' , tiene padres. Y no todas las variables de X son copiadas para X' . La Figura 1 muestra además en (b), el estado inicial de la red. Aplicando múltiples veces la 2TBN, se crea una red desenrollada. Como se muestra en la parte c de la misma figura, en la cual se muestra la RBD resultante de desenrollar 3 fragmentos de tiempo [1].

Debe notarse que un MOM puede ser representado como una RBD con un único nodo oculto y un único nodo observado. Además, todas las RBD con variables discretas pueden ser representadas como un MOM y viceversa [3]. Lo que hace atractivas las RBD es la manera compacta en la que representan la información. Por ejemplo, dada una RBD con 20 nodos booleanos cada uno con 3 nodos padres, entonces el modelo de transición tendría $120 \cdot 2^3 = 160$ probabilidades, mientras que en un MOM se tendrían 2^{20} estados y 2^{40} , casi mil billones de probabilidades en una matriz de transición. Esto es malo por tres razones: 1) el MOM requiere de muchísimo espacio, 2) una matriz tan grande haría la inferencia más cara y 3) aprender esa cantidad tan grande de parámetros no es factible para problemas grandes [3].

La capacidad de las RBD de representar el tiempo, aunado a su compacta representación, fue lo que finalmente hizo que fueran seleccionadas como modelo para la implementación de la herramienta que se desarrollará en esta investigación.

Trabajos relacionados

Las Redes Bayesianas (RB) han sido utilizadas para la predicción de enfermedades anteriormente. En [4] se utilizan Redes Bayesianas para representar la relación entre los síntomas y las enfermedades. Para tal fin se utilizan la BN, en conjunto con un algoritmo de aprendizaje incremental. Con ello se obtiene un método de diagnóstico eficiente.

Además en [5] se busca cómo crear un modelo que permita la predicción en tiempo real de la presencia de una enfermedad. En el estudio, se plantea la utilización -no solamente las fuentes de datos tradicionales- sino de los datos provenientes de fuentes como: reportes de salas de emergencias, venta de fármacos y reportes de laboratorio. Los datos provenientes de estas fuentes tienden a ser incompletos y además, suelen estar disponibles con cierto retraso en comparación a los datos tradicionales. Se demuestra que su modelo basado en Redes Bayesianas Dinámicas, puede utilizarse con el fin de lograr predicción en tiempo real y a su vez permiten la utilización de fuentes de datos heterogéneas.

En este mismo ámbito, en [6] las RBDs son utilizadas en conjunto con algoritmos de Evolución Diferencial para el diagnóstico de cáncer de hígado. Estos algoritmos se utilizan para maximizar las características en los datos. Con las RBDs se lograron inferir relaciones temporales entre estas características de manera exitosa. Muestra de ello fue que se identificaron relaciones entre genes que no se conocían previamente. En [7] también se usaron con la finalidad de encontrar relaciones entre genes de la levadura y se compararon con otras alternativas. En este estudio se observó que las RBDs encontraron una mayor cantidad de relaciones entre los genes que las otras alternativas evaluadas.

Diseño experimental

Para los experimentos se utilizaron los datos de CORBANA [2]. Estos datos tienen información histórica del clima y de dos fenómenos: el avance de la enfermedad denominada Sigatoka negra y la productividad del cultivo del banano. Para ambos conjuntos de datos las variables climáticas utilizadas fueron: humedad, velocidad del viento precipitación y temperatura.

Para medir el avance de la enfermedad, se utilizó la técnica del Preaviso Biológico. La cual indica el avance y velocidad de la enfermedad [8]. Los datos constan de 675 registros, correspondientes a una muestra semanal. Por su parte la productividad se mide en kilogramos y se cuenta con 159 registros.

Todos los valores fueron discretizados agrupando los valores de cada variable en la cantidad de rangos homogéneos correspondiente al rango deseado. Se crearon dos rangos: valores entre

1 y 5, y valores entre 1 y 3. Estos corresponden a los dos tamaños de nodos que se utilizaron en el experimento.

A partir del estudio de las variables presentes en los datos y las relaciones entre las mismas, se modeló e implementó una RB y una RBD. Se requería representar con las redes las relaciones que existen entre las variables climáticas y el comportamiento del avance de la enfermedad y de la producción. Tomando en cuenta que en ambos casos se tenían numerosas variables climáticas relacionadas a una variable de salida, el avance de la enfermedad o la producción, se utilizó la misma estructura para todos los experimentos independientemente del conjunto de datos utilizado.

Implementación de las redes

Se evaluaron varias opciones para implementar las redes. Entre ellas está la biblioteca Mocapy [9], que fue descartada ya que presentó numerosos problemas de compatibilidad e interoperabilidad con versiones más modernas de las herramientas de las cuales depende, LibPMG [10], que fue descartada para implementar las RBD ya que para el momento de su evaluación no contaba con soporte para hacer inferencia sobre este tipo de redes, y Netica [11] que se descartó su uso debido a la ausencia de acceso a sus APIs sin contar con una licencia, ya que esto imposibilitó evaluarla de manera completa. Finalmente se seleccionó la biblioteca LibBNT [12] para la implementación las RBD y la biblioteca LibPGM [10] para las RB.

Luego de evaluar y finalmente seleccionar las opciones existentes para poder implementar las redes, fue necesario ajustar algunos de los factores utilizados en los experimentos.

Inicialmente se planeaba trabajar utilizando datos continuos, pero debido a que no existe un soporte completo para este tipo de datos fue necesario discretizar los datos y utilizar nodos discretos. Un ejemplo de estos es la biblioteca LibPMG [10]. La biblioteca permite la creación y carga de datos continuos en una RBD, pero solamente soporta algoritmos de inferencia sobre datos discretos.

Se observó un intensivo uso de recursos computacionales requeridos por las bibliotecas. En el caso particular de LibBNT [12], eran necesario más de 100 giga bytes de memoria para poder utilizar nodos con tamaño 25 y se estimó que se requerirían más de 110 horas ejecutar los experimentos con ventanas de tamaño 25. Ya que no se tenía acceso a hardware en el que se pudieran preparar y correr los experimentos utilizando estos valores se limitaron los valores de estos factores en los experimentos. Se decidió limitar el tamaño de la ventana y el tamaño de los nodos a valores entre 1 y 5.

Diseño de la Red Bayesiana Dinámica

Cada conjunto de datos constaba de 4 variables de entrada correspondiente a los datos climáticos. Dado que los valores de cada una de las variables eran conocidos, es decir que se cuenta con las mediciones de cada variable en cada muestra, estas variables fueron representadas en la red como nodos observables. Estos son nodos para los que se conoce su valor.

El valor de la variable de salida, la producción o el avance de la enfermedad dependiendo del conjunto de datos que se estuviese usando en el experimento, también era conocido en cada una de las muestras del conjunto de datos. Por lo que también se modela como un nodo observable.

La RBD codifica las relaciones que aprende de los datos utilizando nodos especiales llamados nodos ocultos. La red aprende al ajustar los valores de los nodos ocultos según las

observaciones que se provean como entrada. Se utilizó un nodo oculto para representar la relación que existe tras el comportamiento de la variable de salida y las variables observadas.

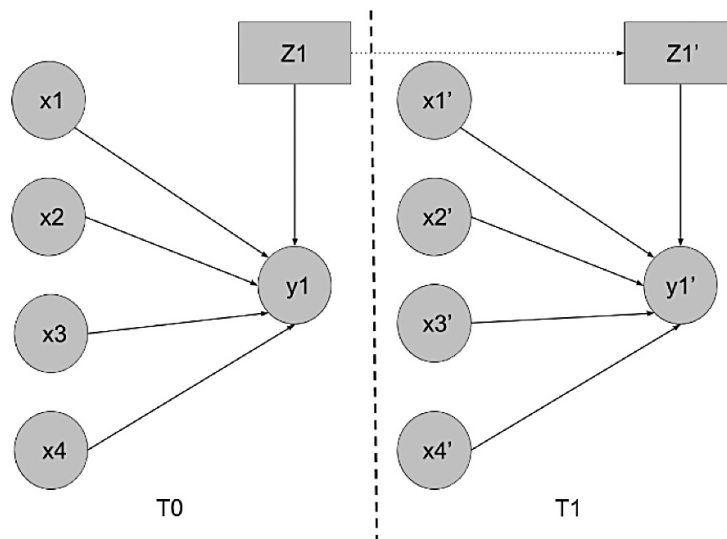


Figura 2. Diseño de la Red Bayesiana Dinámica.

Los arcos entre los nodos de la red representan que un nodo puede influenciar a otro nodo de la red. La influencia fluye a través de la red en los casos en los que los caminos entre los nodos a través de los arcos que los unen sean caminos activos [13].

Cuando existe una estructura en V , es decir dos nodos con arcos a un mismo nodo descendiente, la influencia fluirá por él solamente en el caso de que se cuente con evidencia del valor del nodo descendiente [13]. Tomando en cuenta esta característica de las redes se diseñó la red de forma tal que tanto los nodos de las variables climáticas como el nodo oculto tienen arcos hacia el nodo de salida. Ningún arco se origina desde el nodo de salida. Estos arcos corresponden a las relaciones dentro del mismo periodo o *ventana de tiempo*. Por la naturaleza de los datos, se utilizaron ventanas de una semana.

Los arcos entre ventanas representan cuando un nodo tiene incidencia en el valor del mismo nodo en la siguiente ventana. En la red aquí diseñada existe un único arco entre el nodo oculto en una ventana y sí mismo en la siguiente ventana. Esto sucede porque se quiere que la información que el nodo oculto va aprendiendo, se propague en el tiempo.

La figura 1 muestra la estructura final de la red modelada. La línea vertical punteada separa una ventana del siguiente. En la parte izquierda se muestra la estructura de la red en el T_0 , es decir, el estado inicial de la red. En la parte derecha está el estado de la red en el tiempo T_1 . Los arcos con líneas punteadas representan las relaciones entre ventanas, las negras las relaciones intra ventanas. Los nodos observados se representan con círculos, mientras que los ocultos con rectángulos. Los nodos x_i corresponden a los nodos observados de las variables climáticas, el nodo y_i es el nodo de salida, el nodo del cual la red va a predecir el valor, y el nodo z_i es el nodo oculto. El conjunto de arcos entre las ventanas es lo que se conoce como el 2TBN, y es lo que permite que la red se expanda a través del tiempo.

El nodo oculto aprende las relaciones entre los valores de los nodos observados al ajustar su valor según cada tiempo T . Ya que se quiere que esta información sea propagada a lo largo

del tiempo sobre la red, como puede observarse en la figura 1, la única relación que hay entre ventanas es la del nodo oculto. No hay otro arco entre ventanas dado que el resto de los nodos son observados y sus valores son independientes entre sí.

Diseño de la Red Bayesiana

El diseño de la RB utilizada se basó en el diseño de la RBD descrito en la sección anterior. De igual manera se utilizó la misma estructura de la RB en los experimentos sin importar el conjunto de datos. La estructura de la RB es esencialmente la misma que la de la RBD en el tiempo T_0 .

A diferencia de las RBD, las RB no representan datos temporales de forma directa. Para hacerlo, es necesario expandir o ‘desenrollar’ la red acorde con la cantidad de ventanas que se esté utilizando.

La figura 2 muestra el diseño de la RB equivalente a una RBD para dos ventanas. Esto es una red desenrollada en dos tiempos, específicamente en dos semanas. Los nodos x_{ij} corresponden al i -ésimo nodo observado en el tiempo j , en este caso los nodos correspondientes a las variables climáticas. El nodo y_{1j} corresponde al nodo de salida en el tiempo j . Los arcos representan las relaciones entre los nodos.

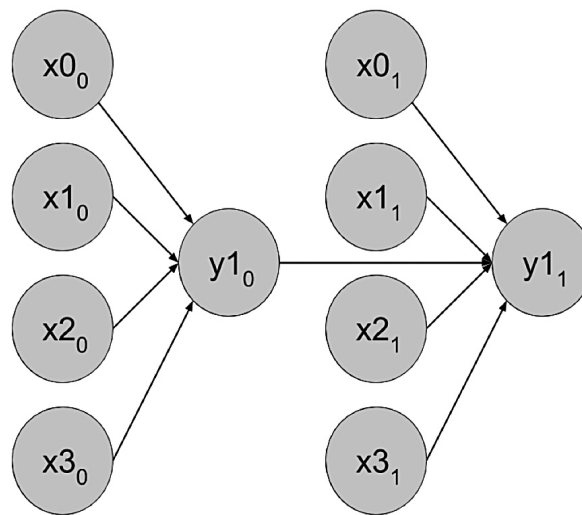


Figura 3:. Diseño de la Red Bayesiana.

Cada nodo tiene asociada una tabla de distribución condicional que representa la probabilidad de su valor dado el valor de cada uno de sus padres. La información en este tipo de red fluye ya que cada nodo de salida es padre del nodo de salida en la siguiente ventana, influyendo así su valor. En este ejemplo (figura 2) el nodo y_{1_0} es padre de y_{1_1} , permitiendo que la información del primer periodo pase al siguiente.

Caracterización de los datos

Para los experimentos se utilizaron dos conjuntos de datos: uno con los datos del avance de la enfermedad y otro con los datos de producción. Se utilizaron además dos tamaños de nodos: nodos de tamaño 3, que son nodos con posibles valores entre 1 y 3, y nodos de tamaño 5, que son nodos con posibles valores entre 1 y 5. Además se utilizó un tamaño de ventana de entre 1 y 5. Un tamaño de ventana de 1 indica que se utilizarán los datos de 1 semana para predecir el

valor de la variable de salida para la siguiente semana. Del mismo modo, un tamaño de variable de 5 indica que se utilizarán los datos de 5 semanas para predecir el valor de la variable de salida para la siguiente semana.

Ambas redes fueron entrenadas y evaluadas siguiendo el mismo procedimiento. El 70% de los datos se utilizaron como conjunto de entrenamiento. Luego el 30% de los datos restantes se usaron como conjunto de pruebas y fueron utilizados para medir la eficacia de la red para predecir el valor correspondiente.

Con cada una de las muestras del conjunto de entrenamiento se comparó el valor predicho por la red con el valor esperado. A partir de esta comparación se calcularon las métricas F1 micro y F1 macro.

Resultados

Se realizó un análisis estadístico de los resultados obtenidos sobre cada una de las variables de respuesta. En todos los casos las pruebas indicaron que los datos no seguían una distribución normal. Debido a que la prueba ANOVA [14] tiene como supuesto que los datos son normales, no fue posible utilizarla. Por lo que se utilizaron métodos no paramétricos para realizar este análisis.

Para determinar la normalidad de los datos se utilizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk [14]. Y para determinar que las poblaciones de cada factor para una variable de respuesta era independientes se utilizaron las pruebas no paramétricas Wilcoxon-Mann-Whitney, [14] para factores con 2 valores, y Kruskal-Wallis [14] para factores con 2 o más valores. Todas las pruebas se hicieron un valor de significancia del 5%.

El cuadro 1 muestra los resultados obtenidos en los experimentos. EE representa el Estado de Evolución de la enfermedad Sigatoka negra, y PN indica que se utilizó el conjunto de datos de producción, expresado en peso neto por kilogramo. Los resultados de estas pruebas indican que el tipo de red no tiene una incidencia significativa en las variables de respuesta. Para representar los datos semanales (la ventana en la RB) se construyó la red de manera que la misma estructura de una semana se repite y conecta con la de la siguiente. Esto conceptualmente es lo que el modelo de las RBD permite representar de manera intrínseca. Es por esta razón que el resultado obtenido no resulta sorprendente.

Se observó que los distintos conjuntos de datos inciden significativamente en los resultados. Esto resulta lógico ya que los conjuntos de datos tienen la información de fenómenos distintos: la productividad del cultivo y el estado de la enfermedad. Como se muestra en el cuadro 2, que muestra el promedio de las variables de salida para cada conjunto de datos, la capacidad de predicción de las redes fue mayor cuando se utilizaron los datos de producción.

Con respecto al tamaño de los nodos, los resultados mostraron que las redes tienen más efectividad al predecir cuándo se utiliza tamaño de nodo 3 en comparación con cuando se utiliza tamaño de nodo 5. El tamaño del nodo, es decir la cantidad de valores que se utilizan para representar cada una de las variables en la red, determina el tamaño de las tablas de distribución conjunta que cada uno de los nodos tiene asociado.

Cuadro 1. Resultados.

Tipo de red	Conjunto de datos	Tamaño del nodo	Tamaño del slice	F1 micro	F1 macro
RB	PN	3	T1	0.49153	0.16384
RB	PN	3	T2	0.49153	0.16384
RB	PN	3	T3	0.49587	0.16529
RB	PN	3	T4	0.49573	0.16524
RB	PN	3	T5	0.49573	0.16524
RB	PN	5	T1	0.19672	0.039344
RB	PN	5	T2	0.19672	0.039344
RB	PN	5	T3	0.21212	0.042424
RB	PN	5	T4	0.21538	0.043077
RB	PN	5	T5	0.22857	0.045714
RB	EE	3	T1	0.41989	0.13996
RB	EE	3	T2	0.41783	0.13928
RB	EE	3	T3	0.41783	0.13928
RB	EE	3	T4	0.41573	0.13858
RB	EE	3	T5	0.4136	0.13787
RB	EE	5	T1	0.014388	0.0028777
RB	EE	5	T2	0.014388	0.0028777
RB	EE	5	T3	0.014388	0.0028777
RB	EE	5	T4	0.014388	0.0028777
RB	EE	5	T5	0.014388	0.0028777
RBD	PN	3	T1	0.275	0.091666667
RBD	PN	3	T2	0.381818182	0.127272727
RBD	PN	3	T3	0.292682927	0.097560976
RBD	PN	3	T4	0.42519685	0.141732283
RBD	PN	3	T5	0.208955224	0.069651741
RBD	PN	5	T1	0.138888889	0.027777778
RBD	PN	5	T2	0.170731707	0.034146341
RBD	PN	5	T3	0.14084507	0.028169014
RBD	PN	5	T4	0.24137931	0.048275862
RBD	PN	5	T5	0.247933884	0.049586777
RBD	EE	3	T1	0.311345646	0.103781882
RBD	EE	3	T2	0.40917782	0.136392607
RBD	EE	3	T3	0.271386431	0.090462144
RBD	EE	3	T4	0.306451613	0.102150538
RBD	EE	3	T5	0.297520661	0.099173554
RBD	EE	5	T1	0.156626506	0.031325301
RBD	EE	5	T2	0.173669468	0.034733894
RBD	EE	5	T3	0.225596529	0.045119306
RBD	EE	5	T4	0.194373402	0.03887468
RBD	EE	5	T5	0.177285319	0.035457064

Cuadro 2. Promedio por conjunto de datos.

Conjunto de datos	Promedio F1 Micro	Promedio F1 Macro
EE	0.2340	0.0713
PN	0.3022	0.0875

Con respecto al tamaño de los nodos, los resultados mostraron que las redes tienen más efectividad al predecir cuándo se utiliza tamaño de nodo 3 en comparación con cuando se utiliza tamaño de nodo 5. El tamaño del nodo, es decir la cantidad de valores que se utilizan para representar cada una de las variables en la red, determina el tamaño de las tablas de distribución conjunta que cada uno de los nodos tiene asociado.

Ya que las redes aprenden a representar el valor de un nodo al ajustar las probabilidades asociadas a cada uno de sus posibles valores según las observaciones de los valores de sus padres y su valor. Con cada observación, en el caso de los experimentos realizados en este trabajo las observaciones en el conjunto de entrenamiento, la red ajusta las probabilidades de cada uno de los nodos. Al presentarse nueva evidencia la red puede calcular basado en las probabilidades ya calculadas el valor esperado o predicho.

Al aumentar el tamaño del nodo lo que se está haciendo es aumentando la granularidad con la que se representa cada una de las variables en la red. Considerando lo anterior y el hecho de que se utilizó la misma cantidad de datos para entrenar las redes para todos los tamaños de nodo, resulta esperado que cuando se aumentó el tamaño del nodo de 3 a 5 la eficacia de la red disminuyera.

El tamaño de ventana, es decir la cantidad de semanas sobre las cuales la red se expande para predecir el valor para la siguiente semana, no tiene una incidencia significativa en las variables de respuesta según los resultados obtenidos. Este resultado no era el esperado, pero puede deberse a que el tamaño de ventana, dadas las características de los datos que se están utilizando, no fue lo suficientemente grande para que fuera significativo.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en los experimentos mostraron que la capacidad de predicción de las RBDs no supera la de las RBs utilizando los datos de CORBANA [2]. De hecho, no se observó una diferencia significativa entre ambos tipos de red.

Se observó una efectividad baja por parte de las RBD. Aún para el mejor resultado, el cual se obtuvo al utilizar los datos de producción y nodos de tamaño 3, la efectividad de predicción de la red fue baja ya que se obtuvo un F1 micro de 0.49 y un F1 macro de 0.16. Por esta razón se concluye que las RBDs no son la mejor alternativa para predecir este tipo de fenómenos cuando se cuenta con datos similares a los utilizados en esta investigación.

La eficacia en la predicción de la red se ve influenciada por la estructura del grafo y el tamaño de los nodos. En el caso del grafo, esto se debe a que los arcos entre los nodos determinan cómo la influencia entre los nodos pasa a través de la red. El tamaño del nodo influye ya que incrementa o disminuye la cantidad de etiquetas que la red deberá aprender a predecir.

Las RBDs en esencia permiten representar datos temporales al replicar y conectar múltiples RBs. Su representación compacta las hace atractivas al trabajar con problemas que tienen un gran número de variables al compararlas con otros MGPs como las RBs y los MOMs. A pesar

de las ventajas que el modelo de las RBDs presenta en la teoría frente a otros MGPs como los MOMs y las RB, en la práctica las limitaciones de las implementaciones disponibles hacen que no sean tan atractivas. Inclusive LibBNT [12], una de las implementaciones evaluadas más completas que fue creada por los considerados proponentes del modelo, resultó requerir una cantidad muy alta de recursos computacionales para poder operar correctamente.

Trabajo futuro

En esta investigación se utilizaron tamaños de ventana entre 1 y 5; lo que representa de 1 a 5 semanas. Se limitó el tamaño de la ventana a estos valores debido al intensivo uso de recursos computacionales requeridos por las bibliotecas. Los resultados obtenidos indican que este factor no tuvo un impacto significativo sobre las variables de respuesta. Es por esto por lo que surge la pregunta de si un tamaño de ventana mayor podría haber tenido un mayor impacto y, de ser así, cuál efecto tendría sobre la eficacia de predicción de la red.

Las probabilidades de los nodos de las redes utilizadas para esta investigación fueron inicializadas utilizando valores aleatorios. En la presente investigación esto no fue considerado debido a que se contaba con muy pocos elementos en los conjuntos de datos. De utilizarse parte de ellos para determinar los valores iniciales quedarían muy pocos elementos disponibles para verificar el modelo. Queda por determinar el efecto que podría tener inicializarlas siguiendo otro criterio, por ejemplo, siguiendo el juicio de un experto en el área particular de los datos que se estén utilizando.

Finalmente, sería interesante experimentar con otros conjuntos de datos que cuenten con un mayor número de elementos, y determinar si con ellos se consigue un resultado distinto.

Agradecimientos

El autor Calvo-Valverde agradece al DOCINADE, al Instituto Tecnológico de Costa Rica y al Dr. Pablo Alvarado Moya, pues es en el marco de la investigación doctoral de dicho autor, que se genera el tema de la presente investigación. El autor Argüello agradece a la Maestría en Computación del Instituto Tecnológico de Costa Rica por la excelente formación recibida en su proceso formativo. Los autores reconocen el aporte de CORBANA S.A. con los datos para la investigación.

Referencias

- [1] D. Koller y N. Friedman, Probabilistic graphical models: principles and techniques. MIT press, 2009.
- [2] CORBANA. (Mayo de 2017). *Corporación Nacional Bananera*. Obtenido de <https://www.corbana.co.cr/categorias/quienes-somos>
- [3] S. J. Russell y P. Norvig, Artificial intelligence: a modern approach. Malaysia; Pearson Education Limited, 2016.
- [4] Y. Zhu, D. Liu, G. Chen, H. Jia, y H. Yu, «Mathematical modeling for active and dynamic diagnosis of crop diseases based on Bayesian networks and incremental learning», *Math. Comput. Model.*, vol. 58, n.o 3-4, pp. 514–523, 2013.
- [5] M. I. K. C. D. Buckeridge, «Using Dynamic Bayesian Networks for Incorporating Non-Traditional Data Sources in Public Health Surveillance», 2014.
- [6] A. Akutekwe, H. Seker, y S. Iliya, «An optimized hybrid dynamic Bayesian network approach using differential evolution algorithm for the diagnosis of Hepatocellular Carcinoma», en 2014 IEEE 6th International Conference on Adaptive Science & Technology (ICAST), 2014, pp. 1–6.
- [7] N. Baba et al., «Continuous Dynamic Bayesian Network for gene regulatory network modelling», en 2014 International Conference on Computational Science and Technology (ICCST), 2014, pp. 1–5.



- [8] D. Marim Vargas y R. Romero Calderon, «El combate de la Sigatoka negra», San José Costa Rica CORBANA Dep. Investig., 1990.
- [9] M. Paluszewski y T. Hamelryck, «Mocapy++-A toolkit for inference and learning in dynamic Bayesian networks», BMC Bioinformatics, vol. 11, n.o 1, p. 126, 2010.
- [10] Cabot, C., Ulrich, J., & Raugas, M. (Febrero de 2012). *LibPGM: Probabilistic Graphical models on Python*. Obtenido de pythonhosted.org: <http://pythonhosted.org/libpgm/#documentation/>
- [11] Norsys Corporation. (1995). *Netica Application*. Obtenido de www.norsys.com: <https://www.norsys.com/netica.html>
- [12] K. Murphy, «The bayes net toolbox for matlab», Comput. Sci. Stat., vol. 33, n.o 2, pp. 1024–1034, 2001.
- [13] K. R. Karkera, Building probabilistic graphical models with Python. Packt Publishing Ltd, 2014.
- [14] R Core Team. (Mayo de 2017). Obtenido de R: A Language and Environment for Statistical Computing: <https://www.R-project.org/>

Rediseño del sistema de transporte de racimos de banano para la recolección en el campo

Caso de estudio: Studer Innotec

Redesign of the transport system of
banana bunches for field harvesting

Case study: Studer Innotec

Jose Luis Ordoñez-Avila¹, Maria Elena Perdomo-Perdomo²

Fecha de recepción: 15 de enero de 2019


Fecha de aceptación: 11 de mayo de 2019

Ordoñez-Avila. J; Perdomo-Perdomo, M. Rediseño del sistema de transporte de racimos de banano para la recolección en el campo. Caso de estudio: Studer Innotec. *Tecnología en Marcha*. Vol. 32-4. Octubre-Diciembre 2019. Pág 171-178.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i4.4801>



1 Máster en Administración de Proyectos profesor investigador, Facultad de Ingeniería y Arquitectura de la Universidad Tecnológica Centroamericana. Honduras. Correos electrónicos:c, jlord_1987@hotmail.com.

 <https://orcid.org/0000-0002-3537-1739>

2 Máster en Dirección de Empresas profesora investigadora, Facultad de Ingeniería y Arquitectura de la Universidad Tecnológica Centroamericana. Honduras. Correos electrónicos: maria_perdomo@unitec.edu, perdomoelena77@gmail.com.

 <https://orcid.org/0000-0002-6059-0650>

Palabras clave

Agroindustrial; Batería de litio; Inversores; Logística; Postcosecha.

Resumen

El presente trabajo describe la experiencia de integración tecnológica en el caso de estudio de Studer Innotec, compañía que fabrica inversores/cargadores y reguladores en Suiza, utilizando un inversor/cargador se rediseño el sistema de transporte mejorando la eficiencia de la cadena agro-productiva de la post cosecha del banano, desarrollado en el sector atlántico de Honduras. Actualmente el sistema de transporte de banano se realiza en cable vía utilizando animales de carga (mulas) haciendo un proceso lento, además de generar costos por el cuidado de estos animales o por máquinas subidas al cable vía que utilizan un motor de combustión diésel acoplado a una bomba de aceite, los cuales generan emisiones de gases que contaminan el ambiente e incluso el mismo banano.

Con el objetivo de integrar equipos industriales que permitan recolectar una mayor cantidad de racimos que en el sistema actual, asegurando las propiedades de calidad del banano se presenta el rediseño de una maquina utilizadas para el transporte del banano, cambiando su motor diésel de 9 hp, por un motor trifásico de 5 hp, donde el mayor reto ha sido pasar la energía eléctrica almacenada en baterías por un inversor, hasta llegar a un variador de frecuencia, con el que se controló el torque y velocidad del motor, permitiendo un mejor uso del equipo con lo que se ha logrado transportar más de 70 racimos de banano en un recorrido mayor a 800 metros dentro de la finca.

Keywords

Agroindustry; Lithium battery; Investors; Logistics; Post-harvest.

Abstract

This paper describes the experience of technological integration in the case study of Studer Innotec, company that manufactures inverters / chargers and regulators in Switzerland, using an inverter / charger to redesign the transport system improving the efficiency of the agro-productive chain of the post-harvest of banana, developed in the Atlantic sector of Honduras. Currently, the banana transport system is carried out via cable using load animals (mules) making a slow process, in addition to generating costs for the care of these animals or by machines uploaded to the cable via a diesel combustion engine coupled to an oil pump, which generate emissions of gases that pollute the environment and even the banana itself.

With the aim of integrating industrial equipment that allows to collect a larger number of bunches than in the current system, ensuring the quality properties of the banana is presented the redesign of a machine used to transport the banana, changing its diesel engine of 9 hp, by a 5-hp three-phase motor, where the greatest challenge has been to pass the electric energy stored in batteries by an inverter, until reaching a frequency inverter, which controlled the torque and speed of the motor, allowing a better use of the motor, with which it has been possible to transport more than 70 bunches of banana in a route greater than 800 meters inside the farm.

Introducción

Por años Honduras ha sido líder en la producción y exportación de banano, siendo el tercer producto que más se exporta en la actualidad, para el 2017 las exportaciones de banano fueron de 182.2 (millones de dólares), ubicándose en el tercer lugar, después del camarón y el café [1].

Las plantas de procesamiento de banano llevan a cabo su proceso desde el cultivo, recolección y empaque de este, los cuales son exportados a los mercados internacionales como Estados Unidos entre otros; estas plantas procesadoras representan una importante fuente de empleo para nuestro país. Estos procesos cada día sufren cambios, obligando a las empresas a estar en la constante búsqueda de mejora para sus procesos, que tengan como resultado una respuesta rápida a esas necesidades cambiantes del mercado. Como lo menciona Deming [2] “los clientes siempre buscan excelencia en la calidad, precios accesibles y velocidad de respuesta en sus necesidades entre todo”.

Actualmente en la mayoría de las empresas cosechadoras de banano en Honduras se utiliza un sistema de empuje empírico de los racimos de banano, a través de un animal de carga. Esto conlleva a la dependencia del animal y la falta de mejora en la eficiencia del sistema. Además, el conjunto de tecnología que acompaña el sistema de empuje actual requiere de un estudio de verificación de calidad técnica. Justificándose la necesidad de aprovechar una innovación más tecnológica que requiera modificar algunas estructuras parciales o equipos que componen actualmente el sistema de carga.

Las actividades de transporte generalmente representan un elemento individual importante que tiene un gran impacto en los costos de logística para la mayoría de las empresas. Se ha observado que el movimiento de carga en todas las etapas del proceso absorbe entre uno y dos tercios de los costos totales de logística. Por ello los responsables de logística necesitan comprender y buscar alternativas que mejoren la eficiencia en las actividades de transportación [3].

Este caso de estudio se basó en el análisis y la mejora del sistema de transporte del banano desde las fincas hasta las plantas de empaque de este. Actualmente el sistema de transporte del banano se realiza en un cable vía que está distribuido en toda la finca que se conecta hasta la planta empacadora y es acarreado por un animal de carga (mula). Mostrando que los sistemas de transporte de banano carecen de automatización, por lo que el objetivo de esta investigación fue rediseñar una máquina para transportar el banano, utilizando equipos europeos de alto rendimiento, los cuales vuelven más eficiente el proceso de recolección de banano, teniendo en cuenta los estándares de seguridad industrial y calidad entre otros.

Materiales y métodos

Los programas de vinculación e investigación de la Universidad Tecnológica Centroamericana (UNITEC) permiten a los alumnos ser parte de proyectos donde se diseñan máquinas e integran tecnología para poder apoyar al desarrollo agroindustrial del país, respondiendo a diferentes necesidades como ser la recolección del banano.

La metodología que se utilizó se basó en que los diseñadores industriales reutilizan la información, no se comienza un diseño desde cero, sino que se inicia mejorando las características de un modelo físico ya existente, mejorando el prototipo [4].

Para tal efecto, se rediseñó e integro una máquina basándose en las dimensiones de la máquina en las plantas cosechadoras y poder realizar cambios en busca del diseño que se ajustó a las necesidades actuales de la finca. También se realizó un análisis de la operación, en el cual se tomaron en cuenta una descripción del proceso de transporte, donde sobresalen la cantidad de

60 racimos que puede traer con la mula y la existencia de una maquina obsoleta con un motor diésel de 9 hp con 3500 revoluciones por minuto.

Los equipos instalados con los cuales se sustituyó un motor de combustión fueron: baterías de litio con estructura química LiFePO_4 , estas se han constituido en el producto de mayor interés comercial como material catódico de baterías de ion litio, fundamentalmente por sus características amigables al medio ambiente, bajo costo de sus precursores y larga vida en el proceso de ciclización [5], un inversor que podemos definir como un sistema que sin necesidad de estar conectados a ninguna red alterna, permite transformar corriente continua a alterna [6], un variador de frecuencia para controlar un motor trifásico de 5 hp el cual se conectó a la bomba hidráulica de la maquina actual.



Figura 1. Instalación en planta cosechadora. [7]

Fue necesario la compra de equipos europeos ya que el mercado nacional no tenía acceso a equipos con las características necesarias para el desarrollo del proyecto. Cuando se obtuvieron los equipos se procedió de la siguiente manera: instalación de los equipos en el laboratorio de mecatrónica (UNITEC), pruebas de laboratorio a para determinar la autonomía de las baterías, rediseño y mecanización de estructura y finalmente pruebas de campo.

Una de las ventajas del inversor y variador fue la posibilidad de monitorear las baterías y el motor por lo que es posible determinar un plan de mantenimiento preventivo basado en predicciones, monitoreando las condiciones en las que se encuentra la maquinaria para buscar predecir cuándo será necesario parar con el propósito de realizarle mantenimiento [8], evitando daños o mal funcionamiento que pongan en peligro al personal, al banano o las instalaciones.

Resultados y discusión

Inicialmente se instalaron los equipos en el laboratorio basado en el diagrama de conexión (figura 2) con el cual se colocan 48 V DC hasta controlar un motor trifásico AC 220 V. Gracias a que el equipo cuenta con un dispositivo que almacena información en una SD permitió la realización de pruebas de laboratorio para comprender el comportamiento y autonomía de las baterías y a su respectiva documentación.

Se comenzó las pruebas de laboratorio con la finalidad de revisar el funcionamiento de los equipos haciendo girar el motor son carga, el tiempo de respuesta de las baterías es mayor a 11 horas el voltaje de las baterías en su punto más bajo (52.16V) está lejos del voltaje de descarga (48V). Al no tener una carga en el motor y no existir perturbaciones en el sistema el consumo energético es estable teniendo como promedio en la prueba de 11 horas, un consumo de 0.325kVA y un máximo de 0.37kVA.

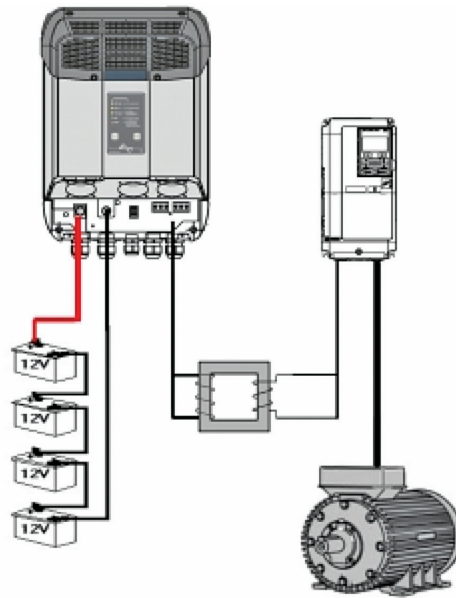


Figura 2. Diagrama de conexión de los dispositivos.

Posteriormente se giró el motor con el equipo hidráulico a una frecuencia de 35 Hertz y se generan perturbaciones encendiendo y apagando el motor donde se verificó las rampas de aceleración y desaceleración configuradas en el variador, el tiempo de respuesta de las baterías se disminuye a 4 horas, la gráfica (figura 3) muestra que el voltaje de las baterías en su punto más bajo (47.8V) después de 4 horas con 15 minutos de trabajo está por debajo del voltaje de descarga (48V). Disminución de aproximadamente 1.125 V por hora.

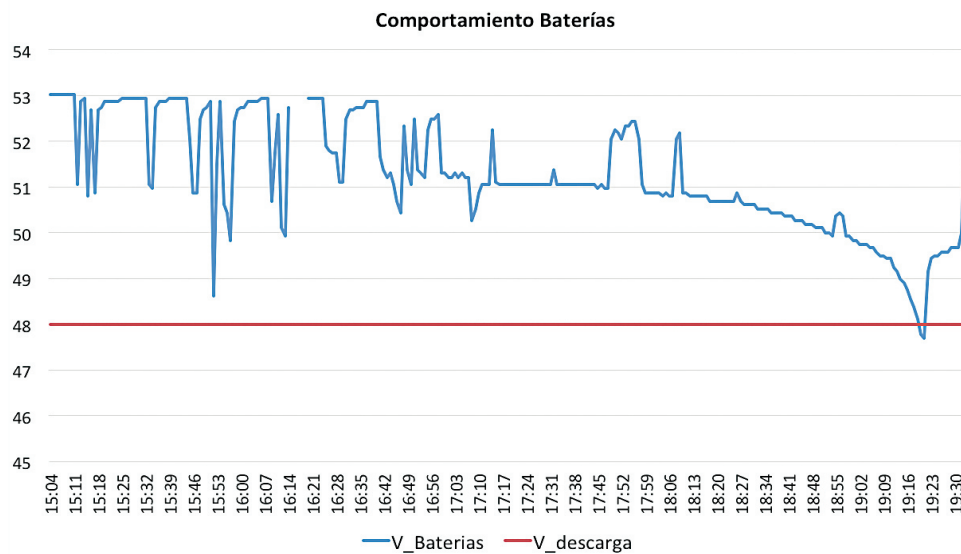


Figura 3. Voltaje de baterías en relación con el tiempo de descarga.

Pese a que el promedio de consumo se mantuvo a lo largo de la prueba 0.332kVA, los picos llegaron a un máximo de 2.03kVA, provocando la descarga de las baterías en 4 horas 15 (figura. 4).



Figura 4. Consumo de potencia durante el tiempo de descarga.

Finalmente cargamos las baterías de 7:30 pm a 10:00 pm. La carga se realizó a 25 A. El equipo tiene capacidad para ser cargado a 50 A, por lo que se estimó que las baterías se cargarán en 1 hora con 15 minutos. Esta configuración se realizó para cargar las baterías en la planta cosechadora. Pese a que la prueba se realizó cargando las baterías a la red eléctrica, es posible por la naturaleza del proyecto utilizar energía solar, al igual como lo menciona Guzmán [9] “el porcentaje de la energía del sol que llega directamente a la Tierra se aprovecha en alguna medida para producir corriente eléctrica mediante celdas fotovoltaicas” y de esta forma cargar las baterías.

Mientras se realizaban las pruebas en el laboratorio se procedió con el diseño industrial basándonos en el grado de funcionalidad que es el factor que marca la mayor parte de los objetivos que se pretenden cubrir, es decir, es el punto estratégico del diseño [4], lo que nos conlleva a tener en cuenta que el diseño que se realizó fue el más funcional posible entendiéndose como funcional protección al equipo, usabilidad y ergonomía del mismo, dejando atrás aspectos estéticos y costo. Al terminar las pruebas de laboratorio de forma congruente se procedió a rediseñar en software CAD el equipo y montar los dispositivos en la estructura.

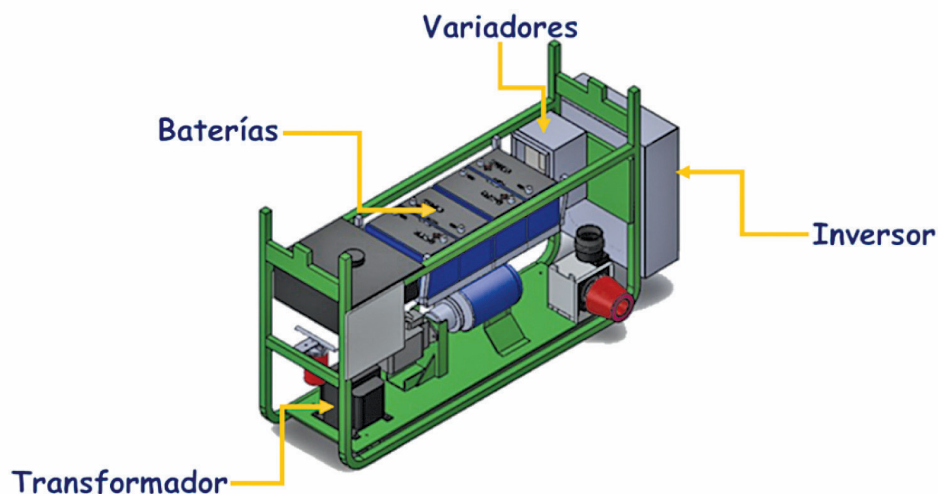


Figura 5. Diseño final en software CAD.

La prueba de campo se realizó inicialmente con 70 racimos de banano, los cuales fueron transportados 400 metros por el cable vía. El voltaje de las baterías disminuyó en 0.5 V, el recorrido duro aproximadamente 40 minutos. EL consumo máximo fue de 2.88 kVA y la frecuencia de trabajo fue de 25 Hertz. Posteriormente cuando se realizaron pruebas con 100 racimos se notó que era necesario aumentar el torque en el arranque hasta que este fuera capaz de mover los racimos y posteriormente aumentar la velocidad. Esto se realizó configurando el uso de multi velocidades en el variador lo cual permitió que el arranque de la maquina se realice a 20 Hertz y posteriormente se aumente mediante los interruptores adicionales para 30 y 35 Hertz.



Figura 6. Prototipo terminado y prueba en campo.

Los equipos europeos que se utilizaron para rediseñar esta máquina son robustos, capaces de trabajar en distintas aplicaciones. Como lo menciona Studer Innotec en su caso de estudio [7], “el integrar el inversor en este proyecto, permitió que el sistema tenga una alimentación de energía estable. Además, que dio flexibilidad en su programación permitiendo optimizar el uso de la carga y descarga de las baterías”.

Conclusión

De acuerdo con los resultados obtenidos en la planta cosechadora de banano en el sector atlántico de Honduras, y basados en que el análisis por medio de la evaluación física es vital para verificar el correcto diseño de un producto o prototipo [4], podemos afirmar que el sistema diésel y los animales de arrastre, se podrán sustituir por 4 baterías de litio, un inversor, un variador de frecuencia y un motor trifásico, logrando la movilización de racimos de banano en mayor cantidad que con el sistema tradicional. Aunado a ello, el uso de esta tecnología disminuye la generación de gases de efecto invernadero que afectan el cambio climático.

Por otro lado, queda abierta la investigación para el desarrollo de una maquina más inteligente la cual tenga capacidades de ser utilizada sin operador y esta pueda recorrer la finca de forma autónoma, buscando tener un mayor grado de automatización, precisión e incluso inteligencia para mejorar el consumo de energía y aumentar la autonomía del dispositivo.

Referencias

- [1] I. N. d. Estadísticas, «<http://www.ine.gob.hn/>,» 8 Mayo 2018. [En línea]. Available: http://www.ine.gob.hn/index.php?option=com_content&view=article&id=168.
- [2] C. C. Sornoza, *Gestión de la calidad*, Mexico: Pearson, 2011.
- [3] R. Ballou, *Logística, Administración de la Cadena de Suministros*, Mexico: Pearson, 2004.
- [4] L. R. y. M. D. Lucía Rodríguez Parada, «Modelo de análisis y validación de propuestas de diseño mediante prototipos flexibles,» *DYNA - Ingeniería e Industria*, vol. 91, n° 5, p. 502, 2017.
- [5] F. B. M. V. J. L. F. M. O. J. V. R. M. N. L. M. L. W. Y. M. B. E. R. P. R. B. Saúl Cabrera, «PERSPECTIVAS EN EL PROCESAMIENTO DE MATERIALES - ELECTRODOS PARA BATERÍAS DE ION LITIO EN BOLIVIA,» *REVISTA BOLIVIANA DE QUÍMICA*, vol. 29, n° 1, p. 22, 2012.
- [6] J. A. Castillo, «Diseño de un inversor trifásico de siete niveles controlado con máquina de estados,» *Tecnología en Marcha*, vol. 30, n° 2, p. 89, 2017.
- [7] S. Innotec, «<http://www.studer-innotec.com/>,» 23 05 2018. [En línea]. Available: <http://www.studer-innotec.com/media/document/0/honduras-movimiento-de-bananos-dole.pdf>.
- [8] J. R. Ocampo, «SISTEMA DE BAJO COSTO PARA MONITOREO DE DISTURBIOS DE VIBRACIÓN EN MÁQUINAS ROTATORIAS,» *Innovare*, vol. 2, n° 2, p. 15, 2013.
- [9] T. Guzmán-Hernández, F. Araya-Rodríguez, G. Castro-Badilla, y J. Obando-Ulloa, «Uso de la energía solar en sistemas de producción agropecuaria: producción más limpia y eficiencia energética,» *Tecnología en Marcha*, vol. 29, n° 8, p. 48, 2016.