



**TECNOLOGÍA**  
*en marcha*

Revista trimestral  
Octubre – Diciembre 2020  
Volumen 33 N° 4  
ISSN-E 2215-3241



**TEC** | Tecnológico  
de Costa Rica

Publicación y directorio en catálogos

latindex

Dialnet  
DOAJ

SciELO

REDIB  
Red Iberoamericana  
de Investigación y Docencia Científica

## Comisión Editorial

Ana Ruth Vílchez Rodríguez. 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

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

## Datos de catalogación en publicación

Tecnología en Marcha / Editorial Tecnológica  
de Costa Rica. - Vol. 33-4, Octubre-  
Diciembre (2020) –Cartago: la Editorial, 2020  
– 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](mailto:editorial@itcr.ac.cr)

Web: [editorial.tec.ac.cr](http://editorial.tec.ac.cr)

[http://revistas.tec.ac.cr/tec\\_marcha](http://revistas.tec.ac.cr/tec_marcha)



Editorial Tecnológica  
de Costa Rica

**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





# **TECNOLOGÍA** *en marcha*

## Contenido

Exposición ocupacional a ruido y vibraciones en cuerpo entero en agricultores de la Zona Norte de Cartago, Costa Rica

Occupational exposure to noise and whole-body vibration in farmers of the Northern Area of Cartago, Costa Rica

*Tannia Araya-Solano, Ara Villalobos-Rodríguez ..... 3*

Evaluation of agro-industrial residues produced in Costa Rica for a low-cost culture medium using *Bacillus subtilis* 168

Evaluación de residuos agroindustriales producidos en Costa Rica para la formulación de un medio de cultivo de bajo costo utilizando *Bacillus subtilis* 168

*Sofía Miranda-Durán, Luis Porras-Reyes, Alexander Schmidt-Durán..... 15*

Determinación de parámetros críticos y análisis exploratorio de datos del proceso de añejamiento de ron

Critical parameters determination and data exploratory analysis of rum aging process

*Beatriz García-Castellanos, Osney Pérez-Ones, Lourdes Zumalacárregui de Cárdenas, Idania Blanco-Carvajal, Luis Eduardo López de la Maza ..... 26*

Efecto de la mezcla de aceites de *Anacardium occidentale*/*Cocos nucifera* en gasoil sobre la velocidad de corrosión de acero al carbono en solución salina

Effect of the mixture of *Anacardium occidentale* / *Cocos nucifera* oils in diesel on the corrosion rate of carbon steel in saline

*Tomás Darío Marín-Velásquez, Dany Day Josefina Arriojas-Tocuyo ..... 37*

Evaluación fisicoquímica y biológica en sistemas de tratamiento comerciales en Costa Rica

Physical-chemical and biological evaluation in commercial treatment systems in Costa Rica

*Guillermo Calvo-Brenes, Diana Zambrano, Sofía Picado-Valverde..... 47*

**A Communication Protocol Design aimed at a Multi-Agent System Framework for Miniaturized Satellite Systems**

Diseño de un protocolo de comunicación para la plataforma de desarrollo software basado en agentes utilizados en sistemas satelitales miniaturizados

*Samantha Interiano-Valverde, Davide Scazzoli, Carmen Chan- Zheng, Johan Carvajal-Godínez, Maurizio Magarini* ..... 62

**Uso de vehículos aéreos no tripulados (VANT's) para el monitoreo y manejo de los recursos naturales: una síntesis**

Use of unmanned aerial vehicles (UAVs) for the monitoring and management on natural resources: a synthesis

*Mario Guevara-Bonilla, Ana Sofía Meza-Leandro, Edwin Antonio Esquivel-Segura, Dagoberto Arias-Aguilar, Andrea Tapia-Arenas, Federico Masís-Meléndez*..... 77

**Efecto de la aplicación foliar suplementaria de calcio sobre la producción de melón (*Cucumis melo* L.)**

Effect of the supplementary foliar application of calcium on melon (*Cucumis melo* L.) production

*José Eladio Monge-Pérez, Michelle Loría-Coto*..... 89

**Fraccionamiento de metales pesados en un suelo contaminado del Valle de Mexicali**

Heavy metals fractionation in Mexicali Valley contaminated soil

*Francisco Javier Gómez-Puentes, Jaime Alonso Reyes-López, María Guadalupe Amado-Moreno*..... 103

**Wood Wide Web: communication through the mycorrhizal network**

Internet de las plantas: comunicación a través de la red micorrízica

*Ana Lucía Castro-Delgado, Stephanie Elizondo-Mesén, Yendri Valladares-Cruz, William Rivera-Méndez* ..... 114

**C-ficocianinas: modulación del sistema inmune y su posible aplicación como terapia contra el cáncer**

C-phycoyanins: immune system modulation and its possible application as therapy against cancer

*Álvaro Esteban Alfaro-Alfaro, Valerie Alpízar-Cambronero, Ana Iris Duarte-Rodríguez, Joana Feng-Feng, Christopher Rosales-Leiva, Juan José Mora-Román*..... 125

**Evaluación en casa malla del efecto de cuatro productos biológicos para el combate de jobotos (*Phyllophaga* sp.)**

Evaluation in house mesh of the effect of four biological products for the combat of jobotos (*Phyllophaga* sp.)

*Ricardo Acuña-Segura, Jaime Brenes-Madriz*..... 140

# Exposición ocupacional a ruido y vibraciones en cuerpo entero en agricultores de la Zona Norte de Cartago, Costa Rica

## Occupational exposure to noise and whole-body vibration in farmers of the Northern Area of Cartago, Costa Rica



Tannia Araya-Solano<sup>1</sup>, Ara Villalobos-Rodríguez<sup>2</sup>

*Fecha de recepción: 24 de agosto de 2019*  
*Fecha de aprobación: 18 de noviembre de 2019*

Araya-Solano, T; Villalobos-Rodríguez, A. Exposición ocupacional a ruido y vibraciones en cuerpo entero en agricultores de la Zona Norte de Cartago, Costa Rica. *Tecnología en Marcha*. Vol. 33-4. Octubre-Diciembre 2020. Pág 3-14.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v33i4.4470>



- 1 MSc. Salud Ocupacional, Escuela de Ingeniería en Seguridad Laboral e Higiene Ambiental. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: taraya@itcr.ac.cr.  
 <https://orcid.org/0000-0001-9465-1530>
- 2 Máster Gestión de Proyectos, Escuela de Ingeniería en Seguridad Laboral e Higiene Ambiental. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: avillalobos@itcr.ac.cr.  
 <https://orcid.org/0000-0003-3340-8136>

## Palabras clave

Vibraciones; agricultura; trabajadores agrícolas; vibraciones cuerpo entero; ruido; maquinaria agrícola.

## Resumen

Como parte de las actividades que se realizan en el sector agrícola se hace uso de vehículos, por lo que se tiene contacto con diferentes agentes físicos como el ruido y las vibraciones de cuerpo entero, debido a esto el objetivo de este proyecto fue determinar la exposición ocupacional a estos agentes durante el uso del tractor, específicamente en labores realizadas en la Zona Norte de Cartago, Costa Rica. Para alcanzar dicho objetivo, se efectuó un estudio exploratorio en 13 fincas, en las cuales se cuantificaron los valores de exposición a ambos agentes, haciendo uso de un vibrómetro y audiodosímetros. Como resultado, se obtuvo que los niveles de exposición diaria a vibraciones se encuentran sobre el valor de acción en el 53,8% de los casos, y los resultados del nivel sonoro continuo equivalente (NSCE) se ubican entre los 54,8dB(A) a 75,4 dB(A), por lo que no sobrepasan el nivel de exposición ocupacional. Además, se identificaron los factores de riesgo relacionados con estos agentes, la antigüedad de la maquinaria y dispositivos colocados en el vehículo, así como los factores personales que pueden influir en la aparición de dolencias, relacionadas con la actividad laboral. Existen otros factores de riesgo en la población en estudio, asociados a las posturas adoptadas y al índice de masa corporal de los colaboradores. Se concluye que la exposición a las vibraciones en cuerpo entero, podría llegar a generar efectos a la salud a largo plazo, además, el dispositivo de acople y modelo se convierten en factores que pueden influir en la exposición.

## Keywords

Tractor; occupational exposure; whole body vibration; noise.

## Abstract

The use of tractor in the agricultural sector is very common, the physical agents associated with it use are noise and vibrations of the whole body; the objective of this project was to determine occupational exposure to these agents during the use of the tractor in 13 small companies of the northern zone of Cartago, Costa Rica. The exposure were measurement with the ISO 2631-1: 2001 and noise dosimeter. As a result, it was obtained that daily vibration exposure levels are above the action level in 53,8% of cases, and the noise level is between 54,8dB(A) a 75,4 dB(A), below occupational level exposure. The risks factors identified were related to the model and devices used in the equipment, postures and body mass index. The main conclusion is that the exposure to whole body vibration may cause health problems in the term, the model and devices used in the equipment are a risk factor of the exposure.

## Introducción

La agricultura es uno de los sectores que presenta más peligros [1], generándose gran cantidad de lesiones y enfermedades relacionadas con pesticidas, problemas respiratorios, trastornos musculo esqueléticos, entre otros [2]. Las actividades que se realizan en este sector demandan una carga física muy alta, razón por la cual en los últimos años se ha aumentado la mecanización de la agricultura [3]. Sin embargo, la exposición a la maquinaria agrícola trae consigo otra serie de riesgos como las vibraciones de todo el cuerpo [4], así como el ruido [5], que si se llegan a convertir en excesivos pueden conducir a efectos crónicos y agudos en la salud [6].

Los diferentes implementos adaptados en la maquinaria para las labores de agricultura, generan variaciones en la exposición de las vibraciones de cuerpo entero [7]; además, la irregularidad del terreno y la velocidad del vehículo son factores importantes a considerar durante las evaluaciones [8].

El desarrollo de la tecnología en los procesos de mecanización agrícola ocasiona afectación en el entorno de trabajo para los usuarios; equipos como los tractores son de las fuentes más importantes de ruido [9]; además, factores como el manejo del equipo y el tipo de superficie perjudican la eficiencia de los operadores y por lo tanto el desempeño de los mismos [10].

Las vibraciones y el ruido se caracterizan porque se generan de la misma manera [11]; y ambos agentes se encuentran relacionados con los sistemas de transporte, pudiendo llegar a afectar la salud de muchas personas, por lo que el impacto en la calidad de vida puede ser importante [12].

El ruido puede definirse como un sonido no deseado [13] y es reconocido como una de las principales formas de contaminación, que causa diferentes daños como los auditivos, [14], siendo la pérdida de la audición una lesión común en los trabajadores agrícolas [15]; ocupación que se clasifica entre las primeras tres con mayor riesgo, debido al ruido excesivo durante las actividades laborales [16]. Además de la pérdida auditiva, otros de los efectos conocidos producto del ruido, son los efectos cardiovasculares [17], afectación en el sistema digestivo, respiratorio y en el metabolismo [18].

Por su parte, las vibraciones corresponden a oscilaciones de partículas alrededor de una posición de equilibrio que pueden generar desde falta de confort hasta fatiga [19], específicamente en las vibraciones de cuerpo entero la masa corporal se encuentra expuesta a vibraciones mecánicas, como las producidas por el asiento del tractor [20], ocasionando enfermedades cardiovasculares, respiratorias, afectación en el sistema endocrino, [21], siendo uno de los principales riesgos los trastornos musculo esqueléticos [22], que tienen efectos en la columna vertebral [23]; [24].

En la Unión Europea, un 23% de los trabajadores agrícolas sufren dolores relacionados con el sistema musculo esquelético [1]. Específicamente en las actividades de conducción de vehículos, la edad, la amplitud de la vibración [21] y la carga postural, pueden contribuir a los trastornos relacionados con la espalda baja como las lumbalgias [25], [26].

El dolor lumbar es un importante problema de salud pública [27], encontrándose entre los que más costos generan para la sociedad en general [28]; la magnitud y la duración de la exposición a la vibración [29], son algunos de los factores que ocasionan esos dolores [30], por lo que los conductores de equipos como los tractores, que son utilizados durante muchas horas al día por los agricultores [31], se exponen a ese tipo de daño.

En general las actividades agrícolas presentan muchas limitaciones [32] que afectan la salud y seguridad de los empleados, por lo tanto es fundamental identificar los factores de riesgo, para luego desarrollar medidas adecuadas que permitan la gestión de las fuentes que los originan [33].

Por lo citado anteriormente y debido a que en Costa Rica no existen datos sobre la exposición a vibraciones y ruido en el sector agrícola, el objetivo de este proyecto fue determinar la exposición ocupacional a ruido y vibraciones en cuerpo entero durante el uso del tractor en agricultores de la zona norte de Cartago, Costa Rica, así como identificar si la antigüedad de la maquinaria, terreno, dispositivos de arrastre y velocidad, son factores que pueden influir en la exposición y si las posturas, edad, jornadas, y peso, son variables que pueden influir en la aparición de dolencias con el fin de iniciar investigaciones que mejoren las condiciones en este sector.

## Materiales y métodos

La investigación fue exploratoria, debido a que no se contaba con datos en el país sobre niveles de exposición a vibraciones en cuerpo entero y ruido durante el uso de tractores. La población de operarios de tractor en Tierra Blanca es un número que no se encuentra definido, por tanto, la selección de la muestra fue no representativa y a conveniencia. Se contactaron dueños de diferentes fincas ubicadas en la Zona Norte de Cartago pertenecientes a la Asociación de Horticultores del Irazú (AHSORI), como respuesta se obtuvo la participación de 13 fincas y 10 hombres adultos, debido a que uno de ellos prestó servicios de arado en tres diferentes fincas.

*Vibraciones:* Se siguió la metodología sugerida en la norma ISO 2631:2001: Exposición a vibraciones en cuerpo entero, para obtener los niveles de vibración a los que se exponen los trabajadores, utilizando el equipo HAV PRO, marca Quest Technologies tipo 1, serie número 07111, el cual cumple con los estándares ISO:8041:1990 y 1:1999(t), y se encontraba calibrado bajo condiciones de laboratorio. El sensor se colocó sobre el asiento del conductor respetando el sistema de coordenadas (X, Y, Z). Las mediciones se realizaron durante un tiempo aproximado de una hora, en cada caso evaluado, con una ponderación de exposición por minuto, por tanto, se generaron 60 datos por cada medición, las cuales fueron promediadas a un dato por cada 20 min. Las escalas de ponderación utilizadas fueron las establecidas para la evaluación de los efectos sobre la salud que se indican en la norma, con sus respectivos factores de multiplicación: Eje x: Wd, k=1.4; Eje y: Wd, k=1.4; Eje z: Wk, k=1.

Con los resultados obtenidos se calculó el factor cresta: rms/pico [34] para cada tractor. En los casos donde el factor cresta fue mayor a 9 se utilizó el método básico y el método alternativo Valor dosis de la vibración (VDV), que es más sensible a los picos de aceleración. Para cada eje se calculó el valor de exposición diaria A(8) y el valor de dosis según las siguientes ecuaciones [34]:

$$A_{x_i}(8) = 1,4 * a_{w_{wx}} \sqrt{\frac{T_{exp}}{T_0}}, \quad A_{y_i}(8) = 1,4 * a_{w_{wy}} \sqrt{\frac{T_{exp}}{T_0}}, \quad A_{z_i}(8) = 1,4 * a_{w_{wz}} \sqrt{\frac{T_{exp}}{T_0}}$$

$$VDV_{x_i}(8) = 1,4 * VDV_x (T_{exp}/T_{meas})^{1/4}, \quad VDV_{y_i}(8) = 1,4 * VDV_y (T_{exp}/T_{meas})^{1/4},$$

$$VDV_{z_i}(8) = VDV_z (T_{exp}/T_{meas})^{1/4}$$

Se tomó el eje crítico para realizar la evaluación del nivel de vibración. Además, los resultados se agruparon según el modelo del tractor. Para determinar la influencia de estos factores sobre la exposición diaria, se realizó una prueba de normalidad de los datos, usando el estadístico de prueba de Anderson-Darling, con un nivel de confianza del 95%, a partir del programa estadístico Minitab 19. Posteriormente se planteó si hay una diferencia significativa entre la aceleración producida con el mecanismo de acople y sin él, así como el modelo del tractor, pues son variables pueden influir en la exposición ocupacional a vibraciones.

Para la comparación con la norma, se utilizó la Directiva Europea 2002/44/EC (2002) sobre Vibración Mecánica, debido a que Costa Rica no cuenta con límites de exposición para vibraciones. En la misma se establece para la exposición diaria valores límite de 1,15 m/s<sup>2</sup> y 0,5m/s<sup>2</sup> de acción, y para el valor de dosis de la exposición 21m/s<sup>1.75</sup> como límite y 9,1 m/s<sup>1.75</sup> como nivel de acción.

*Ruido:* Se realizaron audiodosimetrías con un dosímetro marca 3M, modelo Edge 4, aplicable a las normas ANSI S1.25-1991, ponderación A, ISO-1999, BS6402:1983. Con el porcentaje de dosis obtenido, se calculó el nivel sonoro continuo equivalente (NCSE), el cual se obtiene por medio de la siguiente fórmula:

$$NSCE = [85 + 16,6 \log (\% \text{ dosis} / 12,5 * T)] \quad [35]$$



Para cada medición, posteriormente se comparó con el nivel máximo permitido de exposición a ruido de 85 dB(A) establecido en el Reglamento para el control de Ruido y Vibraciones de Costa Rica [36].

*Determinantes de exposición y factores de riesgo:* La identificación de factores de riesgo que pueden influir en la aparición de dolencias, se realizó, recopilando información a partir del Cuestionario para vigilancia de la Salud por Vibración de Cuerpo entero: EC Biomed II BMH4-CT98-3251\_[37] con respecto al tiempo de exposición, peso, edad, altura, dolencias percibidas en la espalda, cuello y hombros, así como su intensidad en los últimos 12 meses. Con el dato del peso y altura se procedió a calcular el índice de masa corporal (IMC), que se obtiene de la siguiente ecuación [38]:

$$\text{IMC} = \text{Peso (kg)} \div \text{altura (m}^2\text{)}$$

## Resultados

### Datos generales

El estudio exploratorio contó con la participación de un colaborador conductor de tractor, por cada una de las 13 fincas dedicadas a la agricultura, ubicadas en la Zona Norte de Cartago. La edad de los conductores se encuentra entre los 21 y 56 años, quienes tienen de 5 a 34 años de experiencia en el manejo de tractores. La jornada laboral varía entre 8 a 10 horas de trabajo. Las horas de exposición a las vibraciones y ruido son de 5 o 9 horas, dependiendo de la empresa y del tipo de trabajo que esté realizando.

#### A. Vibraciones

El sensor del vibrómetro se colocó en el asiento del conductor, respetando los ejes (x,y,z). Se calculó el factor cresta para cada uno de los datos recopilados; en todos los casos resultó por encima de nueve, por lo que se utilizaron tanto el método básico como el VDV, según lo establecido en la ISO 2631-1 [39].

En el cuadro 1 se muestran los datos obtenidos de aceleración en cada una de las mediciones realizadas. El terreno sobre el cual se trabajó era tierra.

Como se muestra en el cuadro 1, en el 31% de los casos predomina el eje X, el 62% el eje Y y en el 7% en el eje Z, lo que se podría indicar que los movimientos laterales y de frente hacia atrás son los más frecuentes, esto se puede deber a los movimientos producidos por las tareas a realizar, así como irregularidad del terreno o presencia de piedras en el mismo. Adicionalmente, en el 53,8% casos se sobrepasa el nivel de acción (0,5 m/s<sup>2</sup>), y en el 15% de los casos sobrepasa el límite recomendado (1,15 m/s<sup>2</sup>). El 68.8% de los colaboradores se encuentra en riesgo de presentar afecciones a la salud, producto de la exposición a vibraciones. Según una investigación realizada en campo [40] con tractores nuevos, prácticamente todos (~95%) excedieron el Valor de Acción de Exposición (EAV) durante un día de 8 horas.

El valor de dosis de la vibración se encontró entre 0,0314 m/s<sup>1/4</sup> y 573,0153 m/s<sup>1/4</sup>, los ejes predominantes son el X y Y, con un 38% de los datos cada uno, coincidiendo con los ejes predominantes del cuadro 1. Se estimó el valor diario de la exposición y se comparó con los valores límites, resultando que el 46% de todas las mediciones se encuentran sobre el valor de acción. Debido a los movimientos producidos durante el uso del implemento y las irregularidades en el terreno, en algunos casos como la medición 9,10 y 12 no se puede definir un eje predominante, debido a que los valores son muy similares.

**Cuadro 1.** Valores de aceleración promedio en  $m/s^2$ , de la exposición diaria A (8) promedio en  $m/s^2$ , obtenidos de cada una de las mediciones (n=13).

Nº medición	Aeq X ( $m/s^2$ )	Aeq Y ( $m/s^2$ )	Aeq Z ( $m/s^2$ )	A(8)x ( $m/s^2$ )	A(8)y ( $m/s^2$ )	A(8)z ( $m/s^2$ )
1*	0,5744	0,8338	0,5523	0,6357	0,9229	0,4367
2**	0,3645	0,4061	0,3294	0,5413	0,6030	0,3493
3**	0,0517	0,0882	1,2270	0,0767	0,1310	1,3014
4**	0,1493	0,4159	0,4788	0,2278	0,6345	0,5218
5**	0,0863	0,0978	0,0478	0,1281	0,1452	0,0507
6**	0,0020	0,0029	0,0067	0,0030	0,0043	0,0071
7**	0,3798	0,3355	0,3720	0,5318	0,4697	0,3792
8*	0,1910	0,1692	0,1929	0,2835	0,2512	0,2046
9*	1,1087	1,1310	0,4590	1,6463	1,6795	0,4869
10*	0,3819	0,4136	0,3177	0,5346	0,5790	0,3177
11*	0,4718	0,2590	0,2679	0,7005	0,3846	0,2842
12*	0,2240	0,2491	0,2055	0,3326	0,3699	0,2180
13**	0,4078	0,3867	0,2715	0,6056	0,5742	0,2879

Nota: Aeq X: aceleración equivalente en el eje X, Aeq Y: aceleración equivalente en el eje Y, Aeq Z: aceleración equivalente en el eje Z; A (8)x: aceleración de la exposición diaria en el eje x; A(8)y: aceleración de la exposición diaria en el eje y; A(8)z: aceleración de la exposición diaria en el eje z. \*acople con arado, \*\*acople con rotador.

Otras investigaciones reflejan que durante el uso del tractor es el eje Z el predominante [41], sin embargo, las condiciones del terreno fueron diferentes. También se reportaron como eje predominante el Y, con valores del VDV de  $16.6 m/s^{1/4}$ , sobrepasando el nivel de acción [42], coincidiendo así con lo calculado en el cuadro 2.

En el cuadro 3 se muestran los datos de aceleración agrupados por modelo.

Como se puede observar en el cuadro anterior, la exposición diaria en el 7% de los casos está por debajo del nivel de acción, específicamente para el modelo 2005, otro 62% está sobre el nivel de acción (modelos 2008, 2010, 2011, 2015), y el porcentaje restante 31% se encuentra sobre el valor límite de exposición diaria de  $1,15m/s^2$  (modelos 2007 y 2013). Por lo tanto, existe riesgo para la salud de los conductores.

En el caso del VDV, el 31% de los valores de exposición diaria, están por debajo del nivel de acción (modelos 2005, 2013 y 2015), el 54% sobre el valor de acción (modelos 2008, 2010, 2011) y el 14% (modelo 2007) por encima del nivel límite de exposición, esto se debe a que en ocasiones el arado de disco o rotador chocaba con piedras que se encontraban en el terreno.

**Cuadro 2.** Valores de aceleración, valor de dosis de la vibración promedio para cada eje, exposición diaria VDV (8) promedio en  $m/s^{1/4}$ , y valor de dosis diaria ( $m/s^{1/4}$ ) (n=13)

Nº medición	VDVx ( $m/s^{1/4}$ )	VDVy ( $m/s^{1/4}$ )	VDVz ( $m/s^{1/4}$ )	VDV (8)x ( $m/s^{1/4}$ )	VDV (8)y ( $m/s^{1/4}$ )	VDV (8)z ( $m/s^{1/4}$ )
1	4,5279	6,5356	5,8638	8,2415	11,8958	7,6237
2	3,3014	3,7336	6,0761	8,3787	9,4758	11,0150
3	1,2120	1,5128	36,8836	2,4713	3,0848	53,7201
4	1,2435	3,3956	3,4747	4,1299	11,2771	8,2426
5	1,6970	1,9410	0,8796	4,8935	5,5973	1,8118
6	0,0443	0,0512	0,0799	0,1415	0,1634	0,1821
7	3,0785	2,6133	2,9401	9,5395	8,0977	6,5076
8	1,5614	1,3322	1,5100	4,1902	3,5751	2,8944
9	3,5619	3,5824	3,3708	7,9642	8,0100	5,3835
10	3,0511	3,0327	2,5036	9,4543	9,3974	5,5415
11	2,2312	2,2956	4,6800	5,9874	6,1604	8,9707
12	2,0094	1,9746	2,1616	5,3922	5,2990	4,1434
13	3,6367	2,9741	2,9584	8,4852	6,9391	4,9303

Nota: VDVx: valor de dosis de la vibración en el eje x, VDVy: valor de dosis de la vibración en el eje y, VDVz: valor de dosis de la vibración en el eje z, VDV(8)x: valor de dosis de la vibración diaria en el eje x, VDV(8)y: valor de dosis de la vibración diaria en el eje y, VDV(8)z: valor de dosis de la vibración diaria en el eje z.

**Cuadro 3.** Valores de aceleración, valor de dosis de la vibración promedio para cada eje, exposición diaria A (8) promedio en  $m/s^2$ , y valor de dosis diaria ( $m/s^{1/4}$ ) agrupados por modelo del tractor (n=13).

Modelo (cantidad tractores)	A (8)x ( $m/s^2$ )	A (8)y ( $m/s^2$ )	A (8) z ( $m/s^2$ )	VDV (8)x ( $m/s^{1/4}$ )	VDV (8) y ( $m/s^{1/4}$ )	VDV (8)z ( $m/s^{1/4}$ )
2005 (1)	0,0030	0,0043	0,0071	0,1415	0,1634	0,1821
2007 (1)	0,0767	0,1310	1,3014	2,4713	3,0848	53,7201
2008 (2)	0,5186	0,7434	0,3476	7,4689	10,4423	6,2825
2010 (2)	0,4965	0,6075	0,3740	7,7718	9,7331	10,6189
2011 (3)	0,5318	0,4697	0,3792	9,5395	8,0977	6,5076
2013 (3)	1,0981	1,1142	0,3821	7,0988	6,9411	4,6949
2015 (1)	0,5581	0,4691	0,2683	6,9943	6,2941	5,7979

*A. 1. Influencia de dispositivo de acople y modelo del tractor en la exposición.*

Los dispositivos utilizados, como se mencionó anteriormente, fueron arados de disco y rotador; el terreno fue plano o inclinado; los modelos evaluados fueron 2005, 2007, 2008, 2010, 2011, 2013 y 2015; la velocidad fue un dato que no se pudo recolectar, debido a que variaba según el terreno.

Para determinar si el modelo del tractor y el dispositivo de acople influyen en la exposición a vibraciones, se realizó una ANOVA.

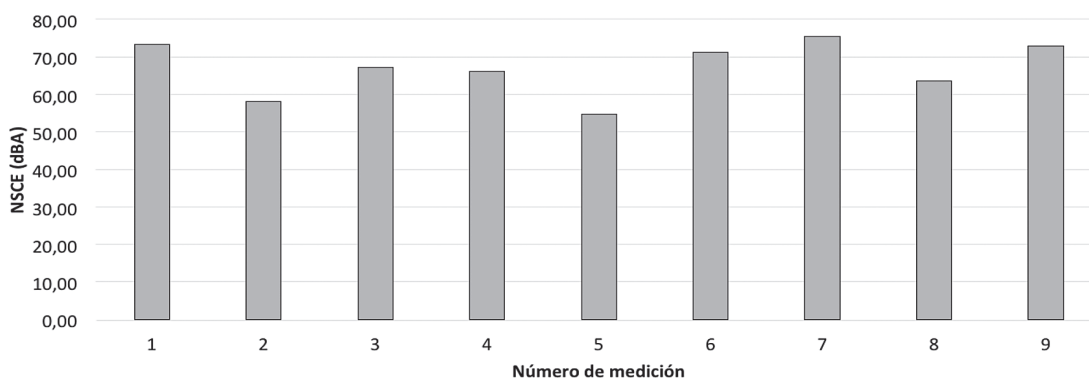
Como resultado se obtuvo que, en la comparación entre modelos, el valor de  $P=0.000$ , por lo tanto, si hay suficiente evidencia estadística para concluir que el modelo si influye en la exposición.

En cuanto al dispositivo de acople el valor de  $P=0.000$ , esto sugiere que hay suficientemente evidencia estadística para concluir que el acople influye en la exposición a la vibración.

### B. Ruido

Para el caso de ruido, se tomaron solo 9 muestras, ya que en cuatro ocasiones al realizarse la visita estaba lloviendo, por lo que no se pudo colocar el dosímetro. Una vez que se obtuvieron los valores de porcentaje de dosis, éstos se proyectaron a 8 horas, partiendo del supuesto de que el nivel de exposición es constante, basado en que las condiciones generadoras de ruido no cambian durante la jornada. Luego se realizó el cálculo del nivel sonoro continuo equivalente.

Los valores del NSCE se encuentran en entre los 54,8dB(A) a 75,4 dB(A), los mismos se muestran en la siguiente figura 1.



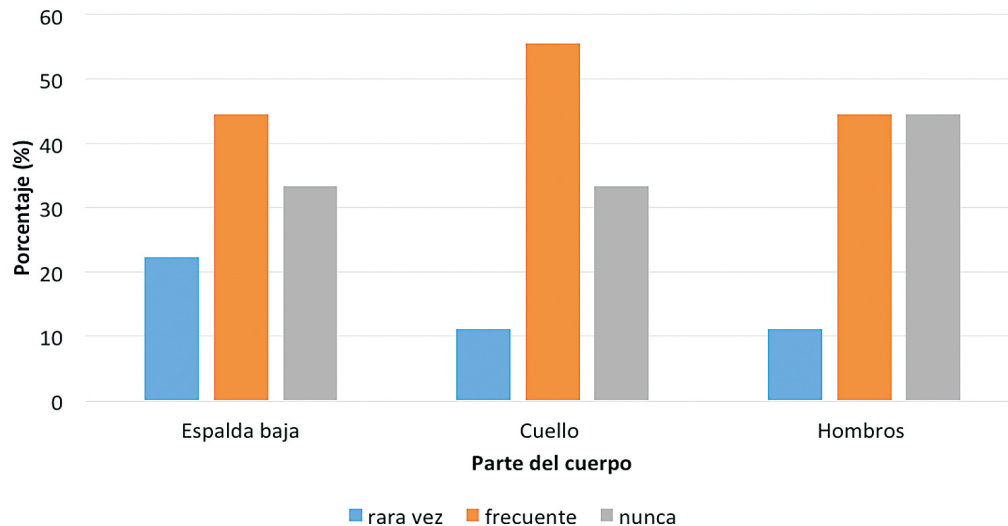
**Figura 1.** Nivel sonoro continuo equivalente, en dB(A), para cada medición realizada.

Como se puede observar en la figura anterior, ninguno de los datos sobrepasa el valor recomendado de 85dB(A), establecido en la legislación costarricense. De acuerdo con las investigaciones consultadas de otros países [43], durante el uso de los tractores en labores agrícolas se obtienen niveles entre 62,1 dB(A) a 87,4 dB(A) y promedios de 68,2 dB(A) a 83,8 dB(A).

### C. Determinantes de exposición y factores de riesgo

Se entrevistó a nueve colaboradores, debido a que una de las personas participantes se negó a brindar la información. Los participantes cuentan con experiencia entre los 5 y 34 años en conducción de tractores; adicionalmente, todos han laborado con maquinaria pesada o camiones; a ellos se les aplicó el Cuestionario para vigilancia de la salud por vibración de cuerpo entero: EC Biomed. Las posturas que se adoptan en las tareas es inclinada hacia adelante y retorcido (viendo hacia atrás).

A continuación, se muestra el porcentaje de las partes del cuerpo, asociadas a la actividad evaluada, donde se presenta mayor dolencia externada por los trabajadores, según la frecuencia:



**Figura 2.** Porcentaje de las partes del cuerpo donde se presentan dolencias.

La parte del cuerpo donde se presenta mayor porcentaje de dolencia es en el cuello; esto se puede deber a las posturas que se adoptan, debido a que tienen que estar volteando hacia atrás, para observar el dispositivo de arrastre colocado al tractor.

La intensidad del dolor en esta parte del cuerpo, es calificada por el 44% de los encuestados como muy significativa (nivel de 8, en escala de 10), para espalda y para hombros es de 8 en el 33% de los casos. Estas dolencias provocaron que 1 de los colaboradores se incapacitara por 7 días, en el último año.

Se han realizado encuestas en otros países donde los conductores de tractores manifiestan que el dolor de espalda es el más frecuente en su actividad laboral [4].

De acuerdo a la consulta efectuada sobre el peso de los trabajadores, se procedió a realizar el cálculo del índice de masa corporal (IMC), el cual en promedio es de 27; obteniéndose que la población en estudio se encuentra en condiciones de peso excesivo, muy cerca del valor de obesidad [38]; este trastorno puede ocasionar serias consecuencias para la salud, como lo es la aparición de varias enfermedades crónicas [44], como la hipertensión, diabetes, entre otras [45]. Siendo las enfermedades cardiovasculares la primera causa de muerte en Costa Rica, esto de acuerdo a un estudio realizado para la provincia de Cartago [46].

Además, otro factor que es importante considerar es la edad de los trabajadores, debido a que enfermedades como la presión arterial aumentada, tienen una mayor incidencia en personas de mayor edad [47]; en el caso específico de la población en estudio la edad promedio es de 39 años; sin embargo se debe considerar que uno de los trabajadores de mayor edad, era quien tenía uno de los IMC más altos, específicamente 31,1, catalogado por Mahan & Escott\_Stump (2009) como obeso; convirtiéndose en uno de los factores de riesgo para la salud [48].

## Conclusiones y/o recomendaciones

Existe riesgo a la salud de los colaboradores, puesto que tanto los niveles de exposición diaria a vibraciones como el valor de dosis de la vibración, se encuentran sobre el nivel de acción, esto en el 53,8% de los casos. En cuanto a la exposición a ruido, en todos los casos el NSCE se encuentra por debajo de los 85dB(A). Con los datos recopilados se concluye que hay evidencia estadística de que el dispositivo de acople y el modelo son factores que influyen en la

exposición a vibraciones. Las dolencias a nivel de cuello son las más frecuentes; relacionadas con las torsiones en el tronco y cuello del colaborador al realizar la tarea. El IMC promedio, evidencia que existe un factor de riesgo a la salud de los colaboradores. Se recomienda establecer relaciones con representantes de cámaras, para que se logre obtener mayor respuesta e impacto en la presentación de los resultados. Sería prudente incluir dentro del equipo de trabajo, a un especialista en fisioterapia, con el fin de que colabore en la detección de las afecciones a la salud, relacionadas con la actividad laboral; además que elabore una propuesta de ejercicios compensatorios, que mejoren las condiciones actuales de este sector. Para la generación de nuevas investigaciones se recomienda ampliar el número de muestra y el tiempo de observación, para determinar la evolución de las dolencias y poder relacionarlas con las vibraciones. También trabajar con otros sectores, factor que a largo plazo permita impactar en mayor medida a la población.

## Agradecimientos

A la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Tecnológico de Costa Rica, por el apoyo para la realización de este proyecto. A la Asociación de Horticultores del Irazú (AHSORI), quienes hicieron posible este proyecto con la oportunidad brindada. Adicionalmente se agradece a la asistente de la investigación la Señorita Geisel Segura.

## Referencias

- [1] C. Lunner Kolstrup, «Work-related musculoskeletal discomfort of dairy farmers and employed workers,» *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, pp. 1-9, 2012.
- [2] F. A. Fathallah, «Musculoskeletal disorders in labor-intensive agriculture,» *Applied Ergonomics*, pp. 738-743, 2010.
- [3] A. Papageorgiou, «Agricultural equipment in Greece: Farm machinery management in the era of economic crisis,» *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, pp. 198-202, 2015.
- [4] K. Walker Bone y K. Palmer, «Musculoskeletal disorders in farmers and farm workers,» *Occupational Medicine*, pp. 441-450, 2002.
- [5] M. Lashgaria y A. Maleki, «Evaluation of lawn tractor noise using acoustic and psychoacoustic descriptors,» *Engineering in Agriculture, Environment and Food*, pp. 116-122, 2016.
- [6] A. Verma, P. Guru y R. Naik, «Noise and Vibration Analysis of Power Tillers during Field Operations,» *International Journal of Bio-Resource & Stress Management*, pp. 288-293, 2014.
- [7] T. H. Langer , M. K. Ebbesen y . A. Kordestani, «Experimental analysis of occupational whole-body vibration exposure of agricultural tractor with large square baler,» *International Journal of Industrial Ergonomics*, pp. 79-83, 2015.
- [8] M. Cutini, . C. Costa y C. Bisaglia , «Development of a simplified method for evaluating agricultural tractor's operator whole body vibration,» *Journal of Terramechanics* , pp. 23-32, 2016.
- [9] B. Bilski, «Exposure to audible and infrasonic noise by modern agricultural tractors operators,» *Applied Ergonomics*, pp. 2010-2014, 2013.
- [10] A. Aybek , H. A. Kamer y S. Arslan, «Personal noise exposures of operators of agricultural tractors,» *Applied Ergonomics*, pp. 274-281, 2010.
- [11] M. Rikondo Iriondo, «Vibraciones mecánicas. Qué son y cómo se evalúa el riesgo?,» *Seguridad Industrial*, pp. 499-506, 2007.
- [12] M. Kutz, *Handbook of Transportation Engineering, Volume II: Applications and Technologies*, New York: McGraw-Hill Education, 2011.
- [13] K. B. Zandin, *Maynard's Industrial Engineering Handbook, Fifth Edition*, New York: McGRAW-HILL, 2001.
- [14] R. A. Corbitt, *Standard Handbook of Environmental Engineering*, New York: McGRAW-HILL, 1999.
- [15] W. Williams, S. Brumby, A. Calvano, T. Hatherell, H. Mason, C. Mercer-Grant y A. Hogan, «Farmers' work-day noise exposure,» *Australian Journal of Rural Health*, pp. 67-73, 2015.

- [16] J. J. Ehlers y P. S. Graydon, «Noise-induced hearing loss in agriculture: Creating partnerships to overcome barriers and educate the community on prevention,» *Noise & Health*, pp. 142-146, 2011.
- [17] G. Tomei, A. Sancini, F. Tomei, A. Vitarelli, G. Androozzi, . G. Rinaldi, V. Di Giorgio, . I. Samperi, M. Fiaschet, Z. Tasciotti, C. Cetica, . A. Capozzella, . M. Ciarrocca y T. Caciari, «Prevalence of Systemic Arterial Hypertension, Electrocardiogram Abnormalities, and Noise-Induced Hearing Loss in Agricultural Workers,» *Archives of Environmental & Occupational Health*, pp. 196-202, 2013.
- [18] J. M. Cortés Díaz, Seguridad e Higiene del Trabajo, Madrid: TÉBAR, 2012.
- [19] R. Fernández García, «Las vibraciones. Una amenaza silenciosa para su salud,» *Gestión práctica de riesgos laborales*, pp. 7-12, 2015.
- [20] J. V. Grimaldi y R. H. Simonds, La seguridad industrial, su administración, 16 ed., México: Alfaomega, 2009.
- [21] R. Wolfgang y R. Burgess-Limerick, «Whole-body vibration exposure of haul truck drivers at a surface coal,» *Applied Ergonomics*, pp. 1700-1704, 2014.
- [22] F. Caffaro , M. Micheletti Cremasco , . C. Preti y E. Cavallo , «Ergonomic analysis of the effects of a telehandler's active suspended cab on whole body vibration level and operator comfort,» *International Journal of Industrial Ergonomics*, pp. 19-26, 2016.
- [23] F. d. C. Acuña Vidal, y A. Dosil Caamaño, «Evaluación por estimación del riesgo de exposición a vibraciones mecánicas: Caso práctico,» *Gestión práctica de riesgos laborales*, pp. 24-31, 2015.
- [24] X. Zhao y C. Schindler, «Evaluation of whole-body vibration exposure experienced by operators of a compact wheel loader according to ISO 2631-1:1997 and ISO 2631-5:2004,» *International Journal of Industrial Ergonomics*, pp. 840-850, 2014.
- [25] Health & Safety Executive, «Whole-body vibration and shock: A literature review,» 2001.
- [26] M. Bovenzi, I. Pinto y N. Stacchini, «Low back pain in port machinery operators.,» *Journal of sound and vibration*, 253 (1), pp. 3-20, 2002.
- [27] K. M. Black, . A. Lis y M. Nordin, «Association Between Sitting and Occupational Low Back Pain (LBP),» *Ação Ergonômica*, pp. 73-86.
- [28] C. Hulshof, J. Verbeek, I. Braam, M. Bovenzi y F. van Dijk, «Evaluation of an occupational health intervention programme on whole-body vibration in forklift truck drivers: a controlled trial,» *Occupational & Environmental Medicine*, pp. 461-468, 2006.
- [29] L. Solecki , «Low back pain among farmers exposed to whole body vibration: a literature review,» *Medycyna pracy*, pp. 187-202, 2011.
- [30] S. A. Adam y N. A. Abdul Jalil, «Vertical Suspension Seat Transmissibility and SEAT Values for Seated Person Exposed to Whole-body Vibration in Agricultural Tractor Preliminary Study,» *Procedia Engineering*, pp. 435-442, 2017.
- [31] R. Deboli , A. Calvo y C. Preti, «Whole-body vibration: Measurement of horizontal and vertical,» *International Journal of Industrial Ergonomics*, pp. 69-78, 2017.
- [32] C. Chisholma, D. Bottoms, M. Dwyer, J. Lines y R. Whyte, «Safety, health and hygiene in agriculture,» *Safety Science*, pp. 225-248, 1992.
- [33] M. Cecchini, R. Bedini, D. Mosetti, S. Marino y S. Stasi, «Safety Knowledge and Changing Behavior in Agricultural Workers: an Assessment Model Applied in Central Italy,» *Safety and Health at Work*, pp. 1-8, 2017.
- [34] ISO, «Mechanical vibration and shock-Evaluation of exposure to whole body vibration. Part 1:General Requeriments. ISO2631-1:1997.,» 1997.
- [35] F. Henao Robledo, Riesgos físicos I: Ruido, vibraciones y presiones anormales, Bogotá: ECOE Ediciones, 2008.
- [36] MTSS, *Reglamento para el Control de Ruidos y Vibraciones. Decreto No. 10541-TSS*, San José, 1997.
- [37] Vibration Injurie Network, «Guidelines and Questionnaires for Whole-Body Vibration Health Surveillance. Appendix W1A to Final Report,» 2001.
- [38] L. K. Mahan y S. Escott-Stump, Krause Dietoterapia, Barcelona: ELSEVIER MASSON, 2009.
- [39] International Standard Organization, *Mechanical vibration and shock- Evaluation of exposure to whole body vibration. Part 1: General Requirements. ISO 2631-1:1997.,* 1997.
- [40] A. Scarlett, D. Semple, J. Price y R. Stayner, «Whole-body vibration on agricultural vehicles: evaluation of emission and estimated exposure levels,» *Journal of terramechanics*, 44(1), pp. 65-73., 2005.

- [41] M. Raoufat, S. Hassanian y D. Vahid, «Whole-body vibrations, evaluation of emissions and exposure levels arising from a medium hp farm tractor.,» *Tarim Makinalari Bilimi Dergisi*, 7(2), 2011.
- [42] S. Milosavljevic, F. Bergman, B. Rehn y A. Carman, «All-terrein vehicule use in agriculture: Exposure to whole body vibration and mechanical shock.,» *Applied ergonomic*, 41(4), pp. 530-535, 2010.
- [43] B. BILSKI, «AUDIBLE AND INFRASONIC NOISE LEVELS IN THE CABINS OF MODERN AGRICULTURAL TRACTORS – DOES THE RISK OF ADVERSE, EXPOSURE-DEPENDENT EFFECTS STILL EXIST?,» *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, pp. 488-493, 2013.
- [44] C. H. Daza, «La obesidad: un desorden metabólico de alto riesgo para la salud,» *Colombia Médica*, vol. 33, nº 2, pp. 72-80, 2002.
- [45] A. Zugasti Murillo y B. Moreno Esteban, «Obesidad como factor de riesgo cardiovascular,» *Hipertensión y riesgo vascular*, vol. 22, nº 1, pp. 32-36, 2005.
- [46] W. I. Hernández Montoya, «Factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en una población obrera industrial de la provincia de Cartago,» *Revista Costarricense de Salud Pública*, vol. 9, nº 16, pp. 1409-1429, 2000.
- [47] I. Palomo G, G. Icaza N, V. Mujica E, L. Núñez F, E. Leiva M, M. Vásquez R, M. Alarcón L y E. Moyano D, «Prevalencia de factores de riesgo cardiovascular clásicos en población adulta de Talca, Chile, 2005,» *Revista médica de Chile*, vol. 135, nº 7, pp. 904-912, 2007.
- [48] G. M. Moreno, «Definición y clasificación de la obesidad.,» *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(2), pp. 124-128., 2012.



# Evaluation of agro-industrial residues produced in Costa Rica for a low-cost culture medium using *Bacillus subtilis* 168




## Evaluación de residuos agroindustriales producidos en Costa Rica para la formulación de un medio de cultivo de bajo costo utilizando *Bacillus subtilis* 168

Sofía Miranda-Durán<sup>1</sup>, Luis Porrás-Reyes<sup>2</sup>, Alexander Schmidt-Durán<sup>3</sup>

Fecha de recepción: 28 de octubre de 2019  
Fecha de aprobación: 3 de febrero de 2020

Miranda-Durán, S; Porrás-Reyes, L; Schmidt-Durán, A. Evaluation of agro-industrial residues produced in Costa Rica for a low-cost culture medium using *Bacillus subtilis* 168. *Tecnología en Marcha*. Vol. 33-4. Octubre-Diciembre 2020. Pág 15-25.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v33i4.4807>

- 1 Ingeniera en Biotecnología. Agencia Universitaria para la Gestión del emprendimiento, Universidad de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: sofia.miranda@augeucr.com.  
 <https://orcid.org/0000-0002-4139-390X>
- 2 Ingeniero en Biotecnología. Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot-CeNAT), Consejo Nacional de Rectores. Centro en Investigaciones Agronómicas (CIA), Universidad de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: luis.porrasreyes@ucr.ac.cr.  
 <https://orcid.org/0000-0001-8219-5320>
- 3 Ingeniero en Biotecnología. Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: aschmidt@tec.ac.cr.  
 <https://orcid.org/0000-0002-1061-6840>



## Keywords

Agro-industrial residues; biomass; growth optimization; *Bacillus subtilis* 168; circular economy.

## Abstract

Agro-industrial residues correspond to all the materials generated from activities that involve the transformation of both crops and livestock to obtain processed or semi-finished products. In Costa Rica, the primary sector of economy generates more than 6.3 trillion tons of organic residues per year. The daily generation of these residues pose environmental and economic problems. In recent years, biotechnological-based alternatives have emerged with the purpose of taking advantage of the high nutritional content of these residues to cultivate microorganisms capable of producing compounds with high demand at a commercial level. The present study evaluates six agro-industrial residues produced in Costa Rica, in order to grow *Bacillus subtilis* 168. An optimization of the culture medium was carried out under a complete factorial design  $2^3$ , where the variables evaluated were carbon, nitrogen and phosphorus sources. Molasses at 10% m/v, wheat bran at 0.5% m/v, and  $K_2HPO_4$  m/v at 0.01%, as a carbon, nitrogen, and phosphorus sources, respectively, were identified as optimal for the growth of *Bacillus subtilis* 168.

## Palabras clave

Residuos agroindustriales; biomasa; optimización del crecimiento; *Bacillus subtilis* 168; economía circular.

## Resumen

Los residuos agroindustriales corresponden a todos aquellos subproductos que son generados a partir de las actividades que involucran una transformación de materias, tanto agrícolas como ganaderas. En Costa Rica se generan más de 6,3 billones de toneladas de residuos orgánicos solo en el sector económico primario. Estos residuos suponen una problemática tanto ambiental como económica. En los últimos años, han surgido alternativas de base biotecnológicas en busca de la valorización de residuos agroindustriales que permitan aprovechar su contenido nutricional para cultivar microorganismos capaces de producir compuestos con alta demanda a nivel comercial. Bajo esta premisa, el presente estudio evaluó seis residuos agroindustriales producidos en Costa Rica para el crecimiento de *Bacillus subtilis* 168. Además, se llevó a cabo una optimización del medio de cultivo bajo un diseño factorial completo  $2^3$ , donde las variables evaluadas fueron fuente de carbono, nitrógeno y fósforo. Melaza al 10% m/v, salvado de trigo al 0,5% m/v y  $K_2HPO_4$  al 0,01% como fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo, respectivamente, fueron los parámetros óptimos para el crecimiento de *Bacillus subtilis* 168.

## Introduction

Agro-industrial production processes for the generation of food or semi-processed raw materials are a source of solid and liquid wastes or agro-industrial byproducts [1]. The daily generation of high volumes of wastes and by-products carry several problems with serious environmental damages. This problem has increased the interest of producers, industries, and technologists to find alternatives to exploit these wastes and by-products in order to transform them into value-added products [2].

In recent years, the development of technologies concerning the use of industrial wastes has been growing. For example, wastes and byproducts from the agro-industrial processing of corn, wheat, rice, sugar, beet, potato and tapioca crops stands out, in order to obtain products such as enzymes, a wide range of solvents, food additives, agrochemicals and biofuels [3] [4] [5] [6]. This transformation processes are mediated, in part, by yeasts, bacteria, fungi, and microalgae whose metabolic characteristics make them suitable for the synthesis of high value-added molecules from agro-industrial residues (AR) [7] [8].

In this context, the use of AR not only has benefits to environmental issues but also implies potential economic benefits. Therefore, currently there is an increasing number of industries using biomass wastes to generate high-value products by adopting biotechnological methodologies in their processes [9].

*Bacillus subtilis* is widely used in fermentation processes based on AR as substrates [10]. This fact is largely due to the ability of this microorganism to metabolize a wide group of sugars present in AR. In addition, it can produce up to eight proteases classified into two large groups: serine proteases and metalloproteases that collaborate in the degradation of complex sugars [11]. This Gram-positive bacterium is a model microorganism, playing a crucial role in academic and industrial research [12]. The strain *Bacillus subtilis* 168, single tryptophan requiring auxotroph, is considered a highly transformable strain used for basic research and as an industrial workhorse [10]. Therefore, this study refers to the use of agro-industrial sources to develop a low-cost culture medium used for *Bacillus subtilis* 168 biomass production. Besides, this research is part of a project that seeks to produce commercially attractive levels of small metabolites by using recombinant *Bacillus subtilis* 168 strains.

## Material and methods

### Microorganism and culture conditions

The present project was carried out in the laboratories of the Bioprocesses Unit of the National Center for Biotechnological Innovations (CENAT-CENIBiot), located in Pavas, San José, Costa Rica. The strain used for the development of this research was *Bacillus subtilis* 168 (GBSC code 1A771) obtained from Bacillus Genetic Stock Center, Ohio, United States of North America. Subcultures of this bacterium were carried out using Lysogeny agar medium (Miller) and incubated at 37 °C for 24 hours. The strain was stored at -80 °C in 15% v/v glycerol stocks [13].

### Culture media preparation

The selection criteria were based on nutritional content [14] [15] [16], local availability, management and cost (table 1). PM, LM, WB, CP and BG were prepared in 10% m/v solutions using osmosis water. The solutions were centrifuged at 4000 x g during 15 min (Hettich, Model Roto Silenta 630RS) in order to eliminate suspended solids. For CE, the effluent was used directly as the culture medium. The sucrose content in all media was carried out in triplicates using the biochemical analyzer (YSI, Model 2700). When necessary, up to 23 g/L of sucrose was supplemented in the substrate prior to sterilization. Each substrate was adjusted to a pH value of 7.2. Finally, each substrate was sterilized in autoclave for 20 min at 121 °C. For the BG culture medium, it was necessary to decant the solids after the sterilization process.

### Preliminary tests

Preliminary tests were carried out in order to determine key sampling points and selection of the most appropriate AR.

A 15mL microbial inoculum (50 mL Falcon tube) with LB medium was prepared with one full loop colony (3-4 mm of diameter). It was left overnight at 37 °C and 150 rpm. Experiment flasks with 60 mL (in 250 mL flasks) of the corresponding AR medium (inoculated with 10% v/v inoculum) were incubated during 48h, at 37°C, and 150 rpm. For the CE and WB media, the sampling time was extended up to 52 hours. Cell viability was determined by the decimal serial dilution method. Standard plate count agar was used for the estimation of CFU.

**Table 1.** Costs associated to agriculture residues used in this study.

Agriculture residue	Cost
Powder molasses (PM)	\$3/Kg
Liquid molasses (LM)	\$1.5/L
Corn wet mill effluents (CE)	Free
Wheat bran (WB)	\$0.15/Kg
Brewers' spent grain (BG)	Free
Coffee pulp (CP)	Free

### AR selection for biomass production

According to preliminary tests, two agro-industrial residues, PM and CP, were discarded due to their low biomass production yields (data not shown). For the others AR, assays were carried out in 60 mL of medium (in 250 mL flasks) during 48 h, at 37 °C, and 200 rpm. These cultures were inoculated with a 10 % v/v inoculum prepared overnight at 37°C and 200 rpm. Assays were done in triplicates. Sampling was carried out at 0, 8, 24 and 48 hours. Cell viability was determined by the decimal serial dilution method. Standard plate count agar was used for the estimation of CFU.

The selection of the culture medium was carried out through a one-way ANOVA test with 95% confidence, using cell viability data (transformed to  $\text{Log}_{10}$ ) taken after 24 hours of fermentation. A Tukey multiple comparison test was performed with 95% confidence using Minitab® statistical program [17].

### Selection of nitrogen source

The LM was used as the base AR to evaluate three different nitrogen sources: ammonium nitrate ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) (AN) as an inorganic nitrogen source, wheat bran (WB) and yeast extract (YE) as organic nitrogen sources. The statistical analysis to select the nitrogen source was carried out by one-way ANOVA test with 95% confidence. The cell viability data (transformed to  $\text{Log}_{10}$ ) was collected after 24 hours of fermentation. A Tukey multiple comparison test was performed with 95% confidence.

### Culture medium optimization: Factorial design 2<sup>3</sup>.

A full factorial design 2<sup>3</sup> was carried out to determine significant factors of AR, nitrogen and phosphorus sources for *Bacillus subtilis* 168 biomass production (table 2). The selection of the most suitable inorganic source of phosphorus was based on the literature [7]. A confirmation of the model was performed in triplicates based in the defined optimal conditions. This confirmation was also tested against a control treatment using Lysogenyc Broth (LB) culture medium. The cell viability data (transformed to Log<sub>10</sub>) obtained were analyzed through a one-way ANOVA analysis.

**Table 2.** Factorial design 2<sup>3</sup> for carbon, nitrogen and phosphorus sources in the culture media.

Factor	Code	Level (% m/v)		
		-1	0	+1
AR (LM)	C	5	7.5	10
Nitrogen source (WB)	N	0.5	0.75	1
Phosphorus source (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	P	0.01	0.15	0.3

## Results and discussion

According to the preliminary tests, microorganism growing in the agro-industrial residues PM and CP evidenced the lowest cell concentration values, after 32 hours of fermentation with  $2.5 \times 10^3$  CFU/mL and  $3.0 \times 10^3$  CFU/mL respectively. Meanwhile, the media elaborated with LM and WB presented the best results in this stage of preliminary test with  $7.3 \times 10^8$  and  $7.4 \times 10^8$  CFU/mL. Finally, for CE and BG after 32 hours of fermentation presented  $5.7 \times 10^7$  and  $4.9 \times 10^7$  CFU/mL respectively.

CP has high contents of carbohydrates, proteins, and minerals that has made this substrate a raw material frequently used in bioprocess [18]. However, the growth of *Bacillus subtilis* 168 during the preliminary trials was not optimal considering the objective of biomass production as it maintained a cell viability between  $1.5 \times 10^3$  and  $3.0 \times 10^3$  CFU/mL. Even though coffee pulp is rich in carbohydrates (21-32%), protein (7.5-15.0%) and fat (2.0-7.0%), it also presents antiphysiological and antinutritional factors like tannins, polyphenols and caffeine [19], which could be limiting the microbial growth. Similar results, in terms of cell growth deficiency, is observed for culture medium PM, as the cell growth remained between  $5.0 \times 10^2$  and  $2.5 \times 10^3$  CFU/mL.

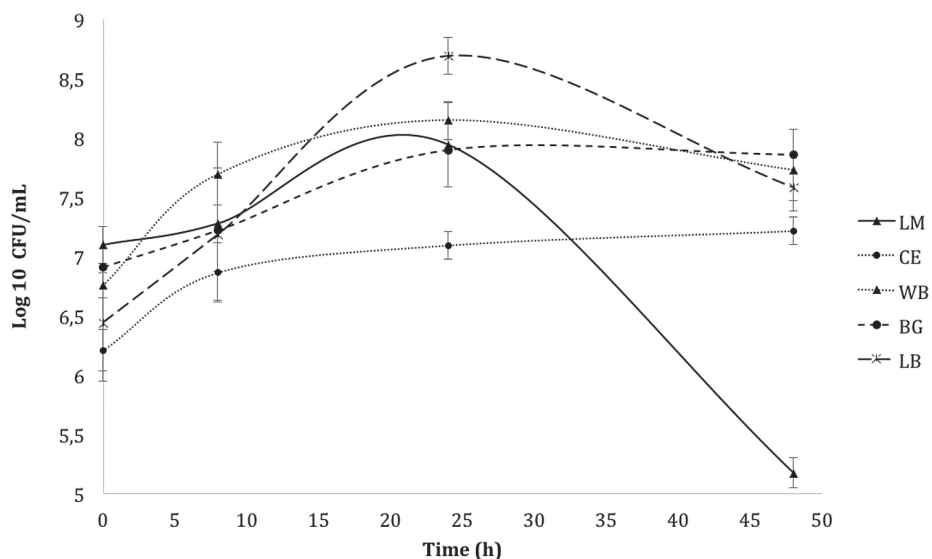
On the other hand, the LM culture medium reached one of the highest cell growth values during the preliminary trials, with a concentration that reached  $7.2 \times 10^8$  CFU/mL after 20 hours of fermentation. Even though both culture media were prepared at 10% m/v with AR molasses, the nutritional contents could vary between the two types of molasses used in this work. One of the factors that can cause nutritional heterogeneity among molasses is related to the source of the materials and the transformation processes they are submitted to during industrial activities [20].

In order to produce more than  $1.0 \times 10^7$  CFU/mL cell concentration; it was decided to discard PM and CP as an AR for *Bacillus subtilis* 168 medium and to continue trials with LM, CE, WB and GB.

According to the one-way ANOVA analysis, the null hypothesis was rejected with a p-value of 0.032. According to the Tukey test, the best results in terms of cell viability corresponds to WB, which reached a cell concentration of  $1.4 \times 10^8$  at 8 hours of fermentation (figure 1). However, the Tukey analysis grouped this medium with LM, BG and LB (control), so there are no significant

differences in terms of cell growth. On the other hand, CE, which has the lowest cell viability, is grouped with LM, BG, and LB. This indicates that there is a significant difference between culture media CE and WB (table 3).

In the other hand, at 24 hours, the one-way ANOVA analysis determined that there are significant differences between treatments, with a p-value = 0.000. The Tukey test determined that the LB culture medium was the one that obtained the highest biomass and presented significant differences with the rest of AR media (table 3).



**Figure 1.** *Bacillus subtilis* growth curve using four agro-industrial residues as a culture medium. The results are expressed as an average  $\pm$  SD of biological replicas.

In the absence of significant differences within WB, LM and BG at 8 and 24 hours, the selection of the AR was based in the next criteria for bioprocesses: availability and management. LM has been widely reported as a suitable substrate for biocompost production and microorganism's growth, including *B. subtilis* [21], as it is easy to use and is a low-cost material. In addition, since sugar is a product widely exploited in countries such as Brazil, India, United States and China [22] and this residue can be readily available in Costa Rica, the LM was the AR chosen.

**Table 3.** Cell viability at 8 and 24 h using different agro-industrial residues.

Culture media	CFU/mL average after 8 h*	CFU/mL average after 24 h*
WB	4.9x10 <sup>7</sup> a	1.4x10 <sup>8</sup> b
LM	1.9x10 <sup>7</sup> ab	8.7x10 <sup>7</sup> b
BG	1.7x10 <sup>7</sup> ab	7.8x10 <sup>7</sup> b
CE	7.3x10 <sup>6</sup> b	1.2x10 <sup>7</sup> b
LB**	1.5x10 <sup>7</sup> ab	4.9x10 <sup>8</sup> a

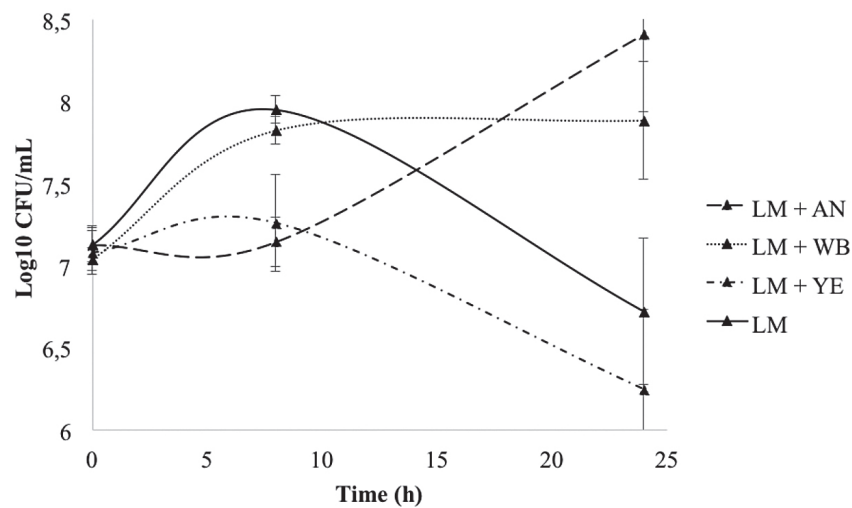
\* Averages that do not share a letter are significantly different with  $\alpha=0.05$  according to Tukey's statistical test.

\*\* Medium control (Lysogeny Broth)

### Culture medium Optimization

Based on the growth curves obtained and statistical analysis performed (figure 2 and table 4), a change in viability is observed for some treatments with respect to their cell growth at 8 and 24 hours of fermentation. At 8 hours of fermentation, two groups defined according to Tukey tests can be observed, where the best cell growth values are given for WB treatment and the control (LM), AN and YE treatments have the lowest cell viability results. After 24 hours of fermentation, the AN treatment shows a considerable improvement with the highest biomass production. AN treatment manages to be grouped within the best treatments according to the statistical test performed. Besides, the YE treatment and the control reached the death phase at this time. Tabbene and coworkers [23] mentioned that this effect may be due in part to the ability of organic sources to be used as a source for direct amino acids synthesis by the microbial metabolism, which would explain the result observed when using WB. WB is reported as a protein rich substrate [24].

Therefore, considering that the evaluated inorganic source can extend the fermentation process, and this could lead to an increase in process costs, treatment WB has been selected as the best source of nitrogen. Besides, there are no significant differences with the treatment AN and shows an adequate assimilation by *Bacillus subtilis* 168.



**Figure 2.** *Bacillus subtilis* 168 growth curve using LM (control) as supplemented with three sources of nitrogen: AN, WB and YE. The results are expressed as an average  $\pm$  SD of biological replicas

**Table 4.** Cell viability at 8 and 24 h using different nitrogen sources.

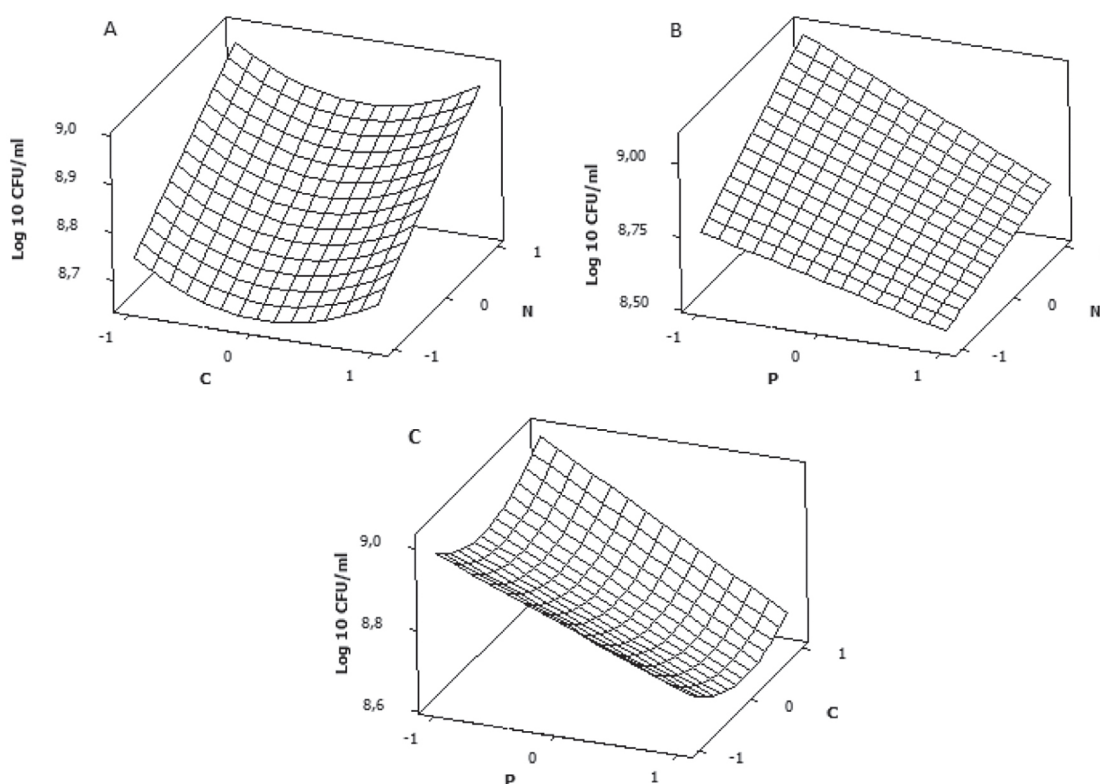
Nitrogen source treatment	CFU/mL average after 8 h*	CFU/mL average after 24 h*
AN	1.4x10 <sup>7</sup> b	2.5x10 <sup>8</sup> a
WB	6.6x10 <sup>7</sup> a	7.6x10 <sup>7</sup> a
YE	1.8x10 <sup>7</sup> b	1.4x10 <sup>5</sup> b
LM**	8.9x10 <sup>7</sup> a	6.0x10 <sup>6</sup> b

\* Averages that do not share a letter are significantly different with  $\alpha=0.05$  according to Tukey's statistical test.

\*\* Medium control

The statistical analysis shows that after analyzing each factor individually, the sources of nitrogen and phosphorus used are significant factors that affect the cellular growth of *Bacillus subtilis* ( $p = 0.001$  and  $p = 0.001$ , respectively). However, the carbon source alone does not have a significant effect ( $p = 0.075$ ). Interestingly, the carbon source has a significant effect when there is an interaction with nitrogen and phosphorus. Significant effect of all interactions between two factors on cell growth can be observed (figure 3). Due to the significant interaction between the carbon and nitrogen sources, a greater cell viability can be observed when the two variables reach the highest values, 5 g/L and 8 g/L, respectively.

On the other hand, when assessing the interaction of the carbon source and phosphorus source factors, it can be observed that for low phosphorus and high carbon values, the best cell growth is obtained. Finally, the interaction of the phosphorus source with the nitrogen source shows that at a low concentration of phosphorus and at a high nitrogen concentration, a higher cell growth is reached for high concentrations of carbon and nitrogen, compared to low concentrations of phosphorus, the best biomass production is obtained. The interaction of the three factors is significant ( $p = 0.003$ ) as the components of the culture medium. This implies that these three components are indispensable in shaping the culture medium by virtue of increased cell growth. The maximum cell viability according to the model is  $1.7 \times 10^9$  CFU/mL.



**Figure 3.** Cube plot for three factors with cell growth (CFU/mL) as a response variable. Carbon (C), nitrogen (N) and phosphorus (P).

The presence of carbon, nitrogen and phosphorus is essential for a microorganism to perform its main metabolic functions which allow it to survive. However, before a microorganism can use these nutrients, they must first be able to detect the type and amount of nutritional sources available in order to adjust their metabolism in their environmental conditions. Many of these



metabolic responses are due to the interaction of carbon and nitrogen metabolism products, for example phosphotransferase systems (PII), and other DNA binding factors [25]. This initial phase, known as lag phase, is an adaptation period in which the bacteria synthesizes a large amount of cell components such as RNA for the production of proteins, enzymes, polysaccharides, fatty acids among and others, in order to activate metabolic pathways with the goal of preparing the cell machinery to enter the exponential phase [26] [27].

As well as carbon and nitrogen, phosphorus also has a leading role in the activation of cell metabolism that allows adaptation to environmental fluctuations. In bacteria, the response to these environmental shifts are given by signal transduction mechanisms, where the anchoring of peptides with transmembrane proteins function under two-component systems, where the activation is mediated by phosphorylation and methylation to trigger the adaptation responses [28]. In *Bacillus subtilis*, there are three adaptation systems, mediated by two-component systems, which are involved in the nutrient's detection and cell motility toward them, [29]. For example, under limiting phosphate concentrations, the PhoR-PhoB two-component system starts operating [32]. The aspartic residue of the kinase sensor is phosphorylated, which subsequently will activate the response regulator and will bind to DNA sequences known as "PHO boxes", in order to regulate the repression or activation of the PHO regulon [33].

Likewise, phosphorus is necessary for other bacteria genetic regulation responses in the activation of adaptation systems due to nutritional stress conditions. For instance, the activation of the sigma factor B ( $\sigma_B$ ), one of the RNA polymerase subunits, contributes to the expression of more than 200 genes involved in the metabolic responses to this stress [30].

Phosphorus has a global regulation mechanism responsible for handling inorganic phosphorus in the bacterial cell. This mechanism is composed of extracellular enzymes responsible for obtaining inorganic phosphorus and transform it into organic phosphorus, which is favored by the presence of carbon and nitrogen in the environment [31].

The influence of carbon sources in the phosphorus regulation systems has been reported [32]. For this study, it was observed that the high concentration of phosphorus and glucose have a negative effect on cell growth. The effect was described by [34], who observed that it was the low concentration of phosphorus that had a positive effect on cell growth.

Based on regression coefficients and significance of factors calculated by the complete factorial design, the equation describing the linear model obtained with a value of  $R^2$  99.96% is presented below:

$$Y = 792500000 + 22500000 C + 237500000 N - 275000000 P + 42500000 C*N - 70000000 C*P - 145000000 N*P - 115000000 C*N*P - 205833333 \text{ Central Point}$$

Where Y represents the response variable (CFU/mL); C represents the concentration of carbon source; N represents the concentration of nitrogen source and P represents the concentration of phosphorus source.

Based on the obtained model, the optimal concentrations of the culture media components to reach the highest viable biomass production of *Bacillus subtilis* 168 are the following: 10 % m/v of carbon source (liquid molasses), 1 % m/v of nitrogen source (ammonium nitrate), and 0,01 % m/v of phosphorus source ( $K_2HPO_4$ ).

## Conclusions

Costa Rica generates AR that can be valued as a low-cost growth culture medium and which can eventually be transformed into high value products through biotechnological processes. Liquid molasses and wheat bran, as sources of carbon and nitrogen, respectively, show satisfactory results to produce viable bacterial biomass. For the elaboration of a liquid culture medium, the optimal concentrations to be used in the culture medium are 10% m/v for molasses as carbon source, 5% m/v for wheat bran as nitrogen source and 0.01%  $K_2HPO_4$  as source of phosphorus. For future experiments it is recommended to carry out chemical characterization of the substrates to be used in order to perform a better control and standardization of the bioprocess.

## References

- [1] S. Saval, "Aprovechamiento de residuos agroindustriales: Pasado, presente y futuro," *Bio-Tecnología*, vol. 16, no. 2, pp. 14-46, 2012.
- [2] L. H. Amaya, C. T. Serna, y C. V. Tovar, "Aprovechamiento de subproductos agropecuarios," Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Sogamoso, Colombia, Contenido Didáctico del Curso, 2011 [en línea]. Disponible en: <http://stadium.unad.edu.co/preview/UNAD.php?url=/bitstream/10596/8911/1/Aprovechamiento%20de%20Subproductos%20Agropecuarios.pdf>
- [3] X. Wu, J. McLaren, R. Madl, y D. Wang, "Biofuels from lignocellulosic biomass," en *Sustainable Biotechnology*, O. Singh, y S. Harvey, eds, Dordrecht, Holanda, pp. 19-41, 2010.
- [4] P.T. Vasudevan, M. D. Gagnon, y M. S. Briggs, "Environmentally sustainable biofuels—The case for biodiesel, biobutanol and cellulosic ethanol," en *Sustainable Biotechnology*, O. Singh, y S. Harvey, eds, Dordrecht, Holanda, pp. 43-62, 2010.
- [5] A. K. Chandel, O. V. Singh, y L. V. Rao, "Biotechnological applications of hemicellulosic derived sugars: state-of-the-art," en *Sustainable Biotechnology*, O. Singh, y S. Harvey, eds, Dordrecht, Holanda, pp. 63-81, 2010.
- [6] V. Ferreira-Leitão, L. M. Gottschalk, M. A. Ferrara, A. L. Nepomuceno, H. B. Molinari, y E. P. Bon, "Biomass residues in Brazil: availability and potential uses," *Waste and Biomass Valorization*, vo. 1, no. 1, pp. 65-76, 2010.
- [7] A. L. Demain, "The business of biotechnology," *Industrial Biotechnol*, vol. 3, no. 1, pp. 269–283, 2007.
- [8] E. J. Vandamme, "Microbial gems: Microorganisms without frontiers," *SIM-News*, vol. 57, no. 3, pp. 81-91, 2007.
- [9] P. Gallezot, "Conversion of biomass to selected chemical products," *Chemical Society Reviews*, vol. 41, no. 4, pp. 1538-1558, 2012.
- [10] D. R. Zeigler, Z. Prágai, S. Rodriguez, B. Chevreux, A. Muffler, T. Albert, ... y J. B. Perkins, "The origins of 168, W23, and other *Bacillus subtilis* legacy strains," *Journal of Bacteriology*, vol. 190, no. 21, pp. 6983-6995, 2008.
- [11] K. Stephenson, y C. R. Harwood, "Influence of a cell-wall-associated protease on production of alpha-amylase by *Bacillus subtilis*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 64, pp. 2875–2881, 1998.
- [12] V. Barbe, S. Cruveiller, F. Kunst, P. Lenoble, G. Meurice, A. Sekowska, y A. Danchin, "From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later," *Microbiology*, vo. 155, no. 6, pp. 1758-1775, 2009.
- [13] G. A. Plaza, P. Pacwa, Z. Piotrowska, K. Jangid, y K. A. Wilk, "Agroindustrial wastes as unconventional substrates for growing of *Bacillus* strains and production of biosurfactant," *Environ Prot Eng*, vol. 37, no. 1, pp. 63-71, 2011.
- [14] D. Ghribi, y S. Ellouze-Chaabouni. "Enhancement of *Bacillus subtilis* lipopeptide biosurfactants production through optimization of medium composition and adequate control of aeration". *Biotechnology Research International*. Vol. 2011. pp- 1-6, 2011.
- [15] F.F. Cavalcante, A.P. Resende, C.J. de Andrade, G.M. Pastore. "Production of Enzymes from Agroindustrial Wastes by Biosurfactant-Producing Strains of *Bacillus subtilis*". *Biotechnology Research International*. vol. 2013, pp. 1-9, 2013.
- [16] M.A. Younis, F.F. Hezayen, M.A. Nour-Eldein, y M.S. Shabeb. "Optimization of cultivation medium and growth conditions for *Bacillus subtilis* KO strain isolated from sugar cane molasses". *Am Eurasian J Agric Environ Sci*. vol. 7, no. 1, pp. 31-37, 2010.

- [17] Minitab Inc, Versión 16, Estados Unidos, 2015.
- [18] P. S. Murthy, y M. M. Naidu, "Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review," *Resources, Conservation and Recycling*, vol. 66, pp. 45–58, 2012.
- [19] P. Esquivel, y V. M. Jiménez, "Functional properties of coffee and coffee by-products," *Food Research International*, vol. 46, no. 2, pp. 488-495, 2012.
- [20] J. Aguilar, M. Espinoza, J. Cabanillas, I. Ávila, A. García, J. Julca, y G. Linares, "Evaluación de la cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando un medio de cultivo a base de melaza de caña y suero lácteo," *Agroindustrial Science*, vol. 5, no. 1, pp. 37-47, 2015.
- [21] I. M. Banat, S. K. Satpute, S. S. Cameotra, R. Patil, y N. V. Nyayanit, "Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production," *Frontiers in microbiology*, vol. 697, no. 5, pp. 1-18, 2014.
- [22] J. D. J. S. Legazpi, y J. A. O. Fierro, "Análisis de la producción azucarera en el occidente de México: Caso: valle El Grullo-Autlán, Costa Sur de Jalisco," *CIBA Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, vol. 2, no. 3, pp. 1-23, 2014.
- [23] O. Tabbene, I. B. Slimene, K. Djebali, M. L. Mangoni, M. C. Urdaci, y F. Limam, "Optimization of medium composition for the production of antimicrobial activity by *Bacillus subtilis* B38," *Biotechnology progress*, vol. 25, no. 5, pp. 1267-1274, 2009.
- [24] C. López, R. Hernández, C. Suárez, y M. Borrero, "Evaluación del crecimiento y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca," *Universitas Scientiarum*, vol. 13, no. 2, pp. 128-137, 2008.
- [25] F. M. Commichau, K. Forchhammer, y J. Stülke, "Regulatory links between carbon and nitrogen metabolism," *Current Opinion in Microbiology*, vol. 9, no. 2, pp. 167–172, 2006.
- [26] E. C. Álvarez, y L. C. Sánchez, "Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus* sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp.," *Nova*, vol. 14, no. 26, pp. 53-62, 2016.
- [27] I. A. M. Swinnen, K. Bernaerts, E. J. Dens, A. H. Geeraerd, y J. F. Van Impe, "Predictive modelling of the microbial lag phase: a review," *International Journal of Food microbiology*, vol. 94, no. 2, pp. 137-159, 2004.
- [28] M. A. Zimmer, J. Tiu, M. A. Collins, y G. Ordal, "Selective Methylation Changes on the *Bacillus subtilis* Chemotaxis Receptor McpB Promote Adaptation," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 32, pp. 24264-24272, 2000.
- [29] C. V. Rao, G. D. Glekas, y G. W. Ordal, "The three adaptation systems of *Bacillus subtilis* chemotaxis," *Trends in Microbiology*, vol. 16, no. 10, pp. 480-487, 2008.
- [30] F. J. de Bruijn, "Stress and environmental regulation of gene expression and adaptation in bacteria: volume 2" New Jersey, Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc., 2016.
- [31] N. U. Maheswar, y G. Sathiyavani, "Solubilization of phosphate by *Bacillus* sp, from groundnut rhizosphere (*Arachis hypogaea* L)," *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, vol. 4, no. 8, pp. 4007-4011, 2012.
- [32] A. Puri-Taneja, S. Paul, Y. Chen, y F. M. Hulett, "CcpA causes repression of the *phoPR* promoter through a novel transcription start site, PA6," *Journal of Bacteriology*, vol 188, no. 4, pp. 1266-1278, 2006.
- [33] D. White, "The physiology and biochemistry of prokaryotes," Oxford University Press, Reino Unido, pp. 628, 2007.
- [34] J. A. Grahovac, Z. Z. Roncević, I. Ž. Tadijan, A. I. Jokić, y J. M. Dodić, "Optimization of media for antimicrobial compounds production by *Bacillus subtilis*," *Budapest Acta Alimentaria*, vol. 44, no. 3, pp. 427–435, 2015.

# Determinación de parámetros críticos y análisis exploratorio de datos del proceso de añejamiento de ron

## Critical parameters determination and data exploratory analysis of rum aging process

Beatriz García-Castellanos<sup>1</sup>, Osney Pérez-Ones<sup>2</sup>,  
Lourdes Zumalacárregui de Cárdenas<sup>3</sup>, Idania Blanco-Carvajal<sup>4</sup>,  
Luis Eduardo López de la Maza<sup>5</sup>

Fecha de recepción: 19 de setiembre de 2019  
Fecha de aprobación: 22 de enero de 2020

García-Castellanos, B; Pérez-Ones, O; Zumalacárregui de Cárdenas, L; Blanco-Carvajal, I; López de la Maza, L. Determinación de parámetros críticos y análisis exploratorio de datos del proceso de añejamiento de ron. *Tecnología en Marcha*. Vol. 33-4. Octubre-Diciembre 2020. Pág 26-36.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v33i4.4692>

- 1 Ingeniera Química, Centro de Referencia de Alcoholes y Bebidas (CERALBE), Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). La Habana, Cuba. Correo electrónico: beatriz.garcia@icidca.azcuba.cu.  
 <https://orcid.org/0000-0001-8101-0638>
- 2 Profesor Auxiliar, Decano, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Tecnológica de La Habana "José Antonio Echeverría". La Habana, Cuba. Correo electrónico: osney@quimica.cujae.edu.cu.  
 <https://orcid.org/0000-0002-0366-0317>
- 3 Profesor Titular, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Tecnológica de La Habana "José Antonio Echeverría". La Habana, Cuba. Correo electrónico: lourdes@quimica.cujae.edu.cu.  
 <https://orcid.org/0000-0001-6921-737X>
- 4 Jefe de Producción, Centro de Referencia de Alcoholes y Bebidas (CERALBE), Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). La Habana, Cuba. Correo electrónico: idania.blanco@icidca.azcuba.cu.  
 <https://orcid.org/0000-0003-1281-3722>
- 5 Profesor Instructor, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Tecnológica de La Habana "José Antonio Echeverría". La Habana, Cuba. Correo electrónico: llopezm@quimica.cujae.edu.cu.  
 <https://orcid.org/0000-0002-7009-4415>



## Palabras clave

Añejamiento de rones; validación de procesos; parámetros críticos; atributos críticos; análisis de componentes principales.

## Resumen

El proceso de añejamiento de ron experimenta pérdidas de volumen, denominadas mermas. Como parte de la validación continuada del proceso se empleó el programa Statgraphics Centurion v17.2 para el Análisis de Pareto determinándose los parámetros críticos: tiempo de añejamiento, volumen, concentración de dióxígeno; temperatura y humedad. El buen funcionamiento del proceso está influenciado entre otros factores, por las variables de operación, las cuales se registran en bases de datos. El análisis de componentes principales (ACP) a partir de dichas bases de datos, permitió obtener conocimiento del comportamiento de las variables más influyentes en el añejamiento usando la herramienta The Unscrambler v10.4. Con el ACP quedaron definidas las variables que se miden más importantes en el proceso: temperatura, humedad, tiempo de añejamiento, grado alcohólico y volumen. Se redujo la dimensionalidad a tres componentes principales que explican el 89,11 % de la varianza total de los datos e incluyen las cinco variables. Se calcularon las mermas en bodega durante los 13 meses de estudio, que resultaron ser 763,43 L, lo cual equivale a un 10,5 % del volumen inicial existente; superando el 6 % permitido en la norma de la República Dominicana, considerada como referencia en este trabajo. Esta merma representa una pérdida de \$32 718. Se determinó que el 6 % de mermas con respecto al volumen inicial de la solera es 434,72 L, equivalentes a pérdidas de \$18 631 y a una disminución de \$14 087 con respecto a las existentes actualmente.

## Keywords

Rum aging; process validation; critical parameters; critical attributes; principal component analysis.

## Abstract

Volume losses, known as wastage are presented during the rum aging process. As part of the continuous validation of the process Pareto Analysis is applied to determine the critical parameters that affect it. They are: aging time, volume, dioxygen concentration; temperature and humidity. The proper functioning of the process is influenced, among other factors, by the operation variables, which are recorded in databases. In this work, the databases were used to carry out a principal component analysis (PCA). The behavior of the main variables that affect the aging was understood, applying PCA, using the software The Unscrambler v10.4. With the ACP, the more important variables of the process were defined. The dimensionality was reduced to three main components that explain 89,11 % of the total variance of the data, including the five variables. Wastages during 13 months were calculated (763.43 L). This value represents 10.5 % of the initial volume, higher than the 6 % recommended by the Dominican Republic Regulation, considered as a reference in this research. This wastage represents losses equivalent to \$32 718. Losses that correspond to the 6 % of the initial volume were calculated (\$18 631). If the process fulfils the Dominican regulation, \$14 087 could be saved.

## Introducción

En el ron fresco, como en la mayoría de las bebidas alcohólicas destiladas, el aroma recuerda a la materia prima utilizada. Este varía cuando se deja en reposo en recipientes de roble por un tiempo determinado, es decir durante el proceso de permanencia de los aguardientes en barriles de roble y al cual se le conoce comúnmente como “envejecimiento” o tiempo de añejamiento. Este tiempo permite que las bebidas sufran una evolución que repercute decisivamente en la mejoría de sus características y propiedades organolépticas [1].

Durante el proceso de añejamiento del ron se producen pérdidas de producto. El añejamiento del ron no cambia ni transforma la bebida, sino que desarrolla y sublima sus cualidades latentes. Es por ello que, en el contexto de excelencia en que compiten estas bebidas, surge el interés por estudiar la merma en el volumen de ron durante su añejamiento en relación a las condiciones ambientales existentes en la solera.

En el mundo el valor medio de pérdidas anuales que se considera para toneles de 180 litros es de 10 % del volumen almacenado. Sin embargo, la literatura señala para los países del Caribe 13 % de pérdidas anuales [2]. En un trabajo realizado en las soleras de la ronera de Cárdenas, en los años 1985-1986, se corroboró una pérdida de 10,5 % anual. No se han encontrado reportes recientes del valor de estas pérdidas en Cuba. En Jamaica se reporta un 6% de pérdidas [3].

La tecnología existente en las bodegas permitió llevar a cabo un estudio del comportamiento de las mermas durante 13 meses de añejamiento. Se realizaron mediciones del nivel del líquido de los toneles, grado alcohólico, temperatura y humedad. Toda esta memoria almacenada constituye una valiosa fuente de información que puede ser útil en la comprensión del presente y en la predicción del futuro [4]. Se tienen así, cálculos desactualizados y altos porcentajes de mermas en volumen de las bases en solera con desconocimiento de los factores que influyen.

## Materiales y métodos

### Verificación continuada de procesos

Desde hace varias décadas la validación ha sido uno de los aspectos de mayor escrutinio dentro de las buenas prácticas de fabricación como vía principal para el aseguramiento de los procesos. En el enfoque actual la validación del proceso consiste en: “recolectar y evaluar información del proceso desde su etapa de diseño hasta la producción, que establece evidencia científica de que el mismo es capaz de entregar un producto de calidad de forma consistente” [5].

El ciclo de vida de validación cuenta con tres etapas: diseño del proceso, calificación del proceso y verificación continuada [5]. La verificación continuada del proceso es la tercera y última etapa dentro del ciclo de vida de validación. Es una alternativa al enfoque tradicional de validación de procesos, donde una vez concluida la calificación del proceso productivo, se monitorea y evalúa sistemáticamente su mantenimiento del estado de control. En el desarrollo de un nuevo producto o de uno ya existente es necesario dominar el proceso conociendo cómo los materiales, procesos y controles afectan el producto final, ya que se puede identificar los factores críticos de entrada al proceso. La variación en las respuestas del proceso debe ser entendida y controlada. Desde una perspectiva de fabricación, las materias primas y los parámetros del proceso afectan en mayor o menor medida los atributos críticos de calidad.

Para conocer cuáles parámetros del proceso son críticos y cuáles claves, conocer en qué dirección y magnitud estos parámetros afectan los atributos críticos de calidad es fundamental para la excelencia de fabricación. Esta comprensión puede ser utilizada para desarrollar procesos más robustos o añadir medidas de control adecuadas para ajustar los procesos y así obtener el producto objetivo [6].

## Procedimiento de cálculo de mermas en toneles de añejamiento de ron

Para la realización de este estudio se instaló un dispositivo de medición de temperatura y humedad relativa ambiente marca HOB0, modelo H08-003-02 con registrador de datos en una solera. Estas variables físicas se midieron ininterrumpidamente durante catorce meses.

Los toneles se hallan almacenados en cinco ramblas que poseen una distribución vertical de cinco niveles cada una; en ellas se observa la identificación numérica de cada tonel.

Se escogieron tres puntos de la solera (centro y extremos) y se midieron los toneles del primer, tercer y quinto nivel, para evaluar las pérdidas en relación a la posición y la altura de los mismos. Se escogieron 45 toneles los cuales tienen almacenados diferentes bases.

El dispositivo de medición se instaló sobre las duelas de uno de los barriles del nivel más elevado de la rambla, en las cercanías del tapón utilizado para el llenado/vaciado de la barrica y del techo de la solera.

Los toneles contienen cinco (cinco) productos con diferentes concentraciones de etanol (formulaciones) y se encuentran distribuidos aleatoriamente en la solera; denominados: B Vi, B Va, B A, Ag, V V [7].

## Análisis de Pareto

El diagrama de Pareto es una herramienta estadística que permite organizar por orden de relevancia los problemas o las causas que los generan. La utilización de este diagrama permite que cuando se quiera mejorar un proceso o atender sus problemas se establezcan prioridades y se enfoquen los esfuerzos donde puedan tener mayor impacto.

El viejo adagio dice que el 80 % de los problemas reportados se asocia con el 20 % de las diversas causas esenciales. Concentrando los esfuerzos en corregir este 20 %, se puede tener el mayor impacto inmediato en la calidad del producto. En esta investigación fue elaborado utilizando la herramienta Statgraphics Centurion v17.2.

## Análisis de componentes principales (ACP)

El ACP es una técnica que facilita el análisis exploratorio de datos al explicar las fuentes de variabilidad, reducir dimensionalidad, eliminar datos discrepantes y extraer la información importante. En el trabajo se utilizó el software The Unscrambler X v10.4, que es una herramienta integral de análisis de datos para estadística exploratoria, análisis multivariado, clasificación, predicción y diseño de experimentos [4].

## Resultados

### Determinación de los atributos críticos de calidad

Se clasificaron los atributos críticos de calidad de acuerdo al impacto sobre la calidad del producto final y el riesgo potencial sobre la aceptación del lote. Para ello se empleó el cuadro 1 de asignación de índices, obteniéndose los resultados que se muestran en el cuadro 2 [6], [8].

Para la determinación de los parámetros críticos se formó una comisión de seis expertos, integrada por másteres y profesionales en las especialidades de ciencia y tecnología de los procesos biotecnológicos, ingeniería de alimentos y química analítica; y se analizó un conjunto de variables que, según la experiencia de trabajo y el conocimiento del proceso, tenían mayor o menor influencia en los atributos de salida del producto final. Se tuvo en cuenta en este análisis solo la etapa de añejamiento.

**Cuadro 1.** Asignación de índices para los atributos críticos de calidad

Elementos de valoración	Nivel de criticidad	Índice
El atributo tiene impacto potencial sobre el desempeño de los procesos posteriores e incluso puede reflejarse negativamente en la calidad del producto final sin capacidad de ser detectado.	Muy alto	9
El atributo tiene impacto potencial sobre el desempeño de los procesos posteriores e incluso puede reflejarse negativamente en la calidad del producto final, aunque con capacidad de ser detectado.	Alto	7
El atributo tiene impacto potencial sobre el desempeño de los procesos posteriores, aunque sin repercusión negativa en la calidad del producto final.	Moderado	5
El atributo no tiene impacto significativo sobre el desempeño de los procesos posteriores.	Bajo	3
El atributo no tiene impacto sobre el desempeño de los procesos posteriores.	Muy bajo	1

**Cuadro 2.** Resultados de asignación de índice para cada atributo crítico de calidad del ron

Atributos críticos de calidad	Método	Criterio de aceptación	Nivel de criticidad	Argumentación y observaciones
Grado alcohólico (% v/v a 20°C)	Densimetría digital	39,5-40,5 (Añejo) 39,4-40,6 (Reserva)	7	Se determina y ajusta para la etapa de formulación
Acidez total (g de ácido acético/100 L de etanol 100°GL)	Valoración con sosa	70-130 (Añejo) 80-150 (Reserva)	5	Se determina y ajusta para la etapa de formulación
Componentes mayoritarios (g/100 L de etanol 100°GL)	Cromatografía de gases	30-60 (Acetato de etilo) 70-100 (Alcoholes superiores) 5-15 (Acetaldehído)	3	Se debe tener definido y cumplir con el intervalo establecido
Color(expresado en unidades de densidad óptica)	Espectrofotometría	0,7-1,1 (Añejo y Reserva)	3	Debe presentar color ámbar. Ser brillante, limpio y transparente. Se ajusta con el color caramelo
Composición organoléptica	Técnica IIIA (Instituto de Investigaciones de la Industria Alimentaria)	Debe cumplir con las características predefinidas del ron añejo	9	Aroma propio de un ron añejo ligero, típico de los rones oscuros bien añejados, seco. Integración clara de los rones oscuros bien añejados que participan. Correcta evolución de los aromas provenientes de la destilación con marcada preponderancia de los del añejamiento.
Presencia de metales	Fotómetro de llamas	Ausencia	9	Se realiza para determinar la presencia de metales que puedan precipitar.

### Determinación de los parámetros críticos de calidad



En la valoración numérica para cada parámetro de proceso se empleó el cuadro 3 de asignación de índices y con los valores de criticidad asignados a cada atributo crítico de calidad se determinó la suma de los productos por cada parámetro en la fila de la matriz correspondiente y su porcentaje respecto al gran total.

**Cuadro 3.** Asignación de índices para los parámetros críticos de calidad

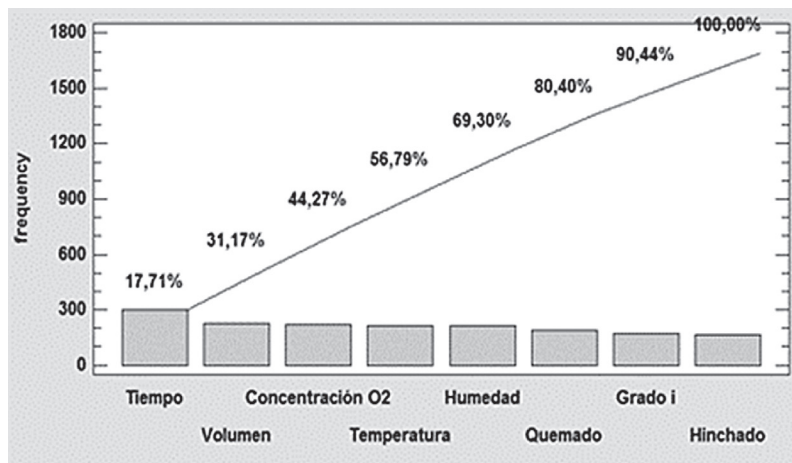
Elementos de valoración	Nivel de impacto	Índice
La variabilidad incide directamente sobre el atributo crítico de calidad, incluso sobrepasando etapas intermedias del proceso donde no ocurren transformaciones asociadas al parámetro y/o variable en cuestión. Existen evidencias y/o experiencia de que existe una alta correlación.	Muy alto	9
La variabilidad incide indirectamente sobre el atributo crítico de calidad, dado que puede afectar etapas intermedias del proceso cuyo desempeño influye de forma apreciable sobre dicho atributo. Existen evidencias y/o experiencia de que existe una correlación aún significativa.	Alto	7
La variabilidad incide en el desempeño de etapas del proceso, aunque con menor incidencia sobre el atributo crítico de calidad. Existen evidencias y/o experiencia de que la correlación moderada.	Moderado	5
La variabilidad incide en el desempeño de etapas del proceso, aunque con poca o ninguna incidencia sobre el atributo crítico de calidad. Existen evidencias y/o experiencia de que la correlación es baja.	Bajo	3
La variabilidad incide poco en el desempeño de etapas de proceso sin afectar ningún atributo crítico de calidad. Existen evidencias y/o experiencia de que no existe correlación alguna.	Muy bajo	1

En el cuadro 4 se muestra la matriz de valoración de los resultados obtenidos.

**Cuadro 4.** Matriz de valoración

Parámetros de operación / Atributos de calidad		Grado alcohólico	Acidez total	Componentes mayoritarios	Color	Composición organoléptica	Presencia de metales	Índice de valoración	% total
Id	Nivel de criticidad	7	5	3	3	9	9	-	-
1	Humedad	9	7	7	1	7	3	300	12,51
2	Temperatura	9	7	7	1	7	3	228	12,51
3	Tiempo de añejamiento	5	9	9	7	7	9	222	17,71
4	Grado alcohólico inicial	9	9	9	3	3	3	212	10,04
5	Volumen	9	9	9	7	5	3	212	13,46
6	Concentración de O <sub>2</sub>	9	9	9	5	5	3	188	13,11
7	Quemado del barril (confección)	3	7	7	7	7	3	170	11,10
8	Hinchado del tonel (con agua)	3	3	3	3	3	9	162	9,56
Gran total								1694	100

En la figura 1 se muestra el Diagrama de Pareto, representando además la línea ascendente del porcentaje acumulativo para cada parámetro.



**Figura 1.** Diagrama de Pareto

En la figura 1 se observan las variables que tienen mayor influencia en los atributos críticos de calidad del producto final. Esto se justifica a partir del criterio de Pareto 80-20%, donde estas variables representan los parámetros que necesitan de un control estricto para así garantizar que los atributos críticos de calidad del ron, se mantengan en las especificaciones establecidas (los que las tengan). Estos son los llamados parámetros críticos del proceso (CPP), y son: tiempo de añejamiento, volumen, concentración de dióxígeno; temperatura y humedad. Las variables: grado alcohólico inicial, quemado e hinchado del tonel son los parámetros claves del proceso (KPP), ya que influirán de cierta forma en el desempeño del proceso, pero no en los atributos críticos de calidad.

En este estudio queda recogida la mayor parte de la información teórica y las experiencias productivas de los especialistas y operarios del área. Para el estudio posterior se decidió excluir la variable concentración de dióxígeno debido a que no se cuenta con la tecnología apropiada para medirla. Además, se agregó al análisis la variable grado alcohólico inicial ya que su valoración se realizó teniendo en consideración que puede ser ajustado para las especificaciones finales del proceso y no por el impacto específico a lo largo de este.

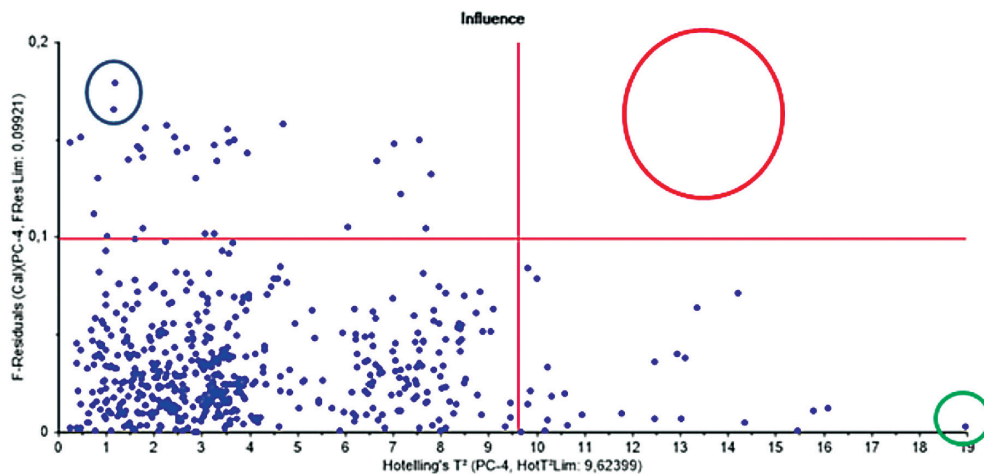
#### Determinación de ruido, limpieza y selección de los datos que se utilizaron

Se contó con un conjunto de datos integrado por 900 instancias y diez variables, de ellas cinco cualitativas: producto, rambla, fecha y posiciones horizontal y vertical; mientras que las restantes: tiempo de añejamiento, volumen, temperatura, humedad y grado alcohólico inicial tienen carácter cuantitativo. La matriz inicial de datos se redujo a 546 valores ya que presentaba mediciones incompletas con respecto a tres toneles (19, 21 y 159) y al período de tiempo que comprende de febrero a septiembre de 2014.

#### Análisis estadístico y transformación de los datos

El hecho de que todas las variables se hayan registrado por su propia naturaleza justifica que se hayan escalado por el rango y centrado por la media. El ACP se realizó partiendo de un fichero de datos con las variables producto, rambla, posiciones horizontal y vertical, fecha, volumen, grado alcohólico, temperatura, humedad y tiempo de añejamiento.

El gráfico de la influencia para este ACP se puede observar en la figura 2.



**Figura 2.** Gráfico de la influencia resultado del ACP al fichero con 10 variables y 546 instancias

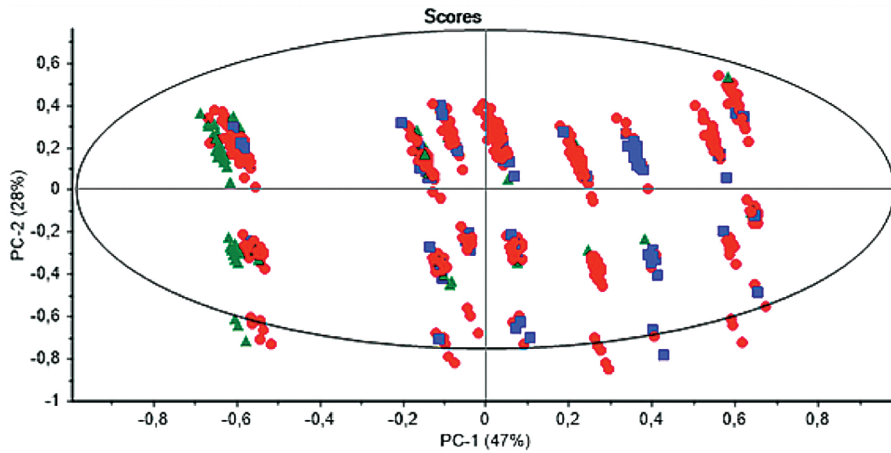
Se puede observar que no existen muestras que constituyan puntos discrepantes peligrosos, los que de existir aparecerían en el espacio representado por el círculo rojo ubicado en la sección superior derecha del gráfico.

En el gráfico anterior se puede observar que las muestras 209 y 210 (enmarcadas por el círculo azul) tienen alto valor residual por lo que constituyen puntos discrepantes pero no son peligrosos y pudieran contener información valiosa. Además, este punto se encuentra dentro de la elipse de Hotelling mostrada más abajo en la figura 3; por tanto, esta muestra no fue eliminada del análisis.

La muestra 390 (enmarcada por el círculo verde) presenta un elevado valor de distanciamiento por lo que constituyen un punto discrepante influyente, pero contiene información valiosa y por tanto no fue eliminada del análisis.

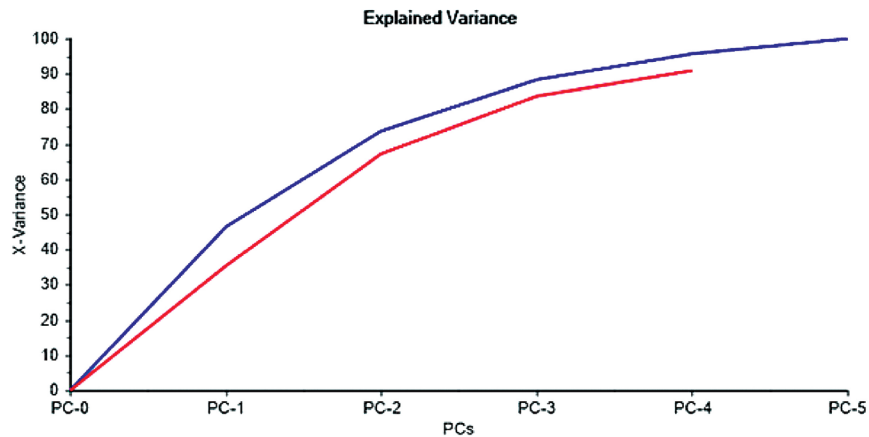
Para complementar el análisis de los puntos discrepantes y descubrir agrupamientos no perceptibles fácilmente se utilizó el gráfico de las puntuaciones con la elipse de Hotelling (figura 3). En este se puede observar cómo la mayoría de los puntos se encuentran dentro de la elipse, evidenciando que todos pertenecen al mismo proceso. Además, se muestra un agrupamiento fuera de la elipse; en la parte inferior. Estas puntuaciones discrepantes corresponden a muestras del producto Ag que presentan la mayor graduación alcohólica de la base de datos, que se encuentran ubicadas en la rambla tres y en la posición horizontal inferior (piso). Esto está directamente relacionado con los cambios abruptos experimentados, en estas instancias de tiempo, por la humedad ambiental, porque en la medida que esta sea mayor o menor se va a favorecer la evaporación de etanol o de agua.

Para analizar el comportamiento de la variable mermas de acuerdo al gráfico de las puntuaciones, se determinaron los valores de la media y la desviación estándar y se estableció que los valores de esta variable menores que el límite inferior eran ideales, los menores que la media eran normales y los mayores que el límite superior eran altos. De esta manera se pudo identificar la zona de mayores valores de mermas, ubicada a la izquierda del gráfico y en color verde, perteneciente al período más caluroso del año en especial a septiembre de 2015; alcanzándose valores extremos de temperatura para el proceso en el intervalo de (34-37) °C.



**Figura 3.** Gráfico de las puntuaciones con elipse de Hotelling resultado del ACP al fichero con 10 variables y 546 instancias

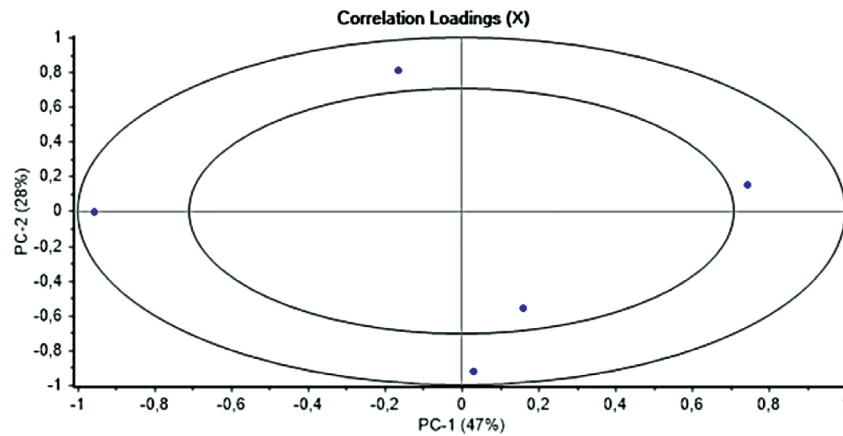
Tres componentes principales logran explicar el 88,32 % de la varianza de los datos iniciales. En la figura 4 se observa el gráfico de la varianza explicada. El primer componente explica el 46,43 % de la varianza el segundo el 27,34 % y el tercero el 14,55 %. Si se toma en consideración un mayor número de componentes se lograría explicar el 95,90 % de la varianza, pero el modelo sería más complejo.



**Figura 4.** Gráfico de la varianza explicada resultado del ACP al fichero con 10 variables y 546 instancias

El gráfico de los pesos correlacionados muestra una mejor visualización del comportamiento de las variables. En la figura 5 se presenta el gráfico de los pesos correlacionados.

Como se puede observar en la figura 5 con excepción del volumen, todas las variables se encuentran entre las dos elipses, por lo que todas son significativas ya que tienen un elevado aporte al primer y segundo componente que logran explicar el 74,64 % de la varianza total inicial. Este resultado justifica la inclusión de todas estas variables para la modelación posterior. La variable volumen al presentar el menor coeficiente variación (7,63 %) justifica que no se incluya entre las dos elipses que explican entre el 50 y 100 % de la varianza total de los datos.



**Figura 5.** Gráfico de los pesos correlacionados resultado del ACP al fichero con 10 variables y 546 instancias

Además, el gráfico explica el fenómeno físico que se esperaba encontrar, ya que la variable temperatura, ubicada a la izquierda a lo largo del componente principal 1 (PC1) se encuentra relacionada de manera inversa con la humedad; lo cual es lógico ya que este componente es el que mayor influencia tiene en la variable de salida que es el % de mermas en proceso. También se muestra la variable grado alcohólico que influye de manera negativa en el componente principal 2 (PC2), la cual tiene una relación inversa con la variable tiempo de añejamiento.

En el cuadro 5 se encuentran los pesos de cada una de las variables en los tres primeros componentes principales. Se subrayaron además las variables que mayor contribución tienen a cada componente principal; de esta manera el primer CP resultó estar relacionado a las variables medioambientales humedad y temperatura. El segundo CP se vincula al efecto del tiempo de añejamiento en el estudio y su repercusión en el grado alcohólico. Mientras que el tercer CP está mayormente influenciado por la humedad y el volumen, que son de cierta manera aleatorias en las muestras.

**Cuadro 5.** Pesos de las variables en cada componente principal

Variabes	CP1	Variabes	CP2	Variabes	CP3
Humedad (%)	<u>0,7440</u>	Tiempo de añejamiento (años)	<u>0,8125</u>	Volumen (L)	<u>0,3778</u>
Volumen (L)	0,1616	Humedad (%)	-0,1558	Tiempo de añejamiento (años)	-0,1620
Grado (°GL)	0,0326	Temperatura (°C)	-0,0068	Temperatura (°C)	-0,2670
Tiempo de añejamiento (años)	-0,1638	Volumen (L)	-0,5577	Grado (°GL)	-0,2869
Temperatura (°C)	-0,9551	Grado (°GL)	-0,9194	Humedad (%)	-0,6167

### Análisis económico

Para la evaluación económica de los beneficios de este trabajo se calculan los porcentajes de pérdidas por mermas y se comparan con el 6 % admisible en la Norma General No. 03-2012 de República Dominicana [9] ya que no existe una norma cubana aprobada.

Los porcentajes de mermas se determinan teniendo en cuenta la diferencia entre los volúmenes final e inicial de los 45 toneles que se estudian. El precio de venta de ron es de 30 \$/botella y cada botella contiene 700 mL, quedando determinadas las pérdidas monetarias por concepto de merma en bodegas.

Las mermas en bodega durante los 13 meses de estudio fueron 763,43 L, lo cual equivale a un 10,5 % del volumen inicial existente, que en comparación con lo establecido en la norma dominicana [9], para períodos de envejecimiento entre dos y cinco años (lo cual se ajusta a la mayoría de los datos existentes), supera el 6 % permitido. Además, representa una pérdida de \$32 718.

El valor de mermas admisible correspondiente al 6 % establecido en la norma dominicana para la bodega, en este período de tiempo, es 434,72 L, que representa unas pérdidas monetarias de \$18 631 y difiere del valor de pérdidas reales \$14 087.

## Conclusiones

Se determinaron cinco parámetros críticos que influyen en la calidad del proceso de añejamiento mediante un modelo de riesgo basado en matriz de entradas y salidas, estos fueron: humedad, temperatura, tiempo de añejamiento, concentración de dióxigeno disuelto y volumen medido.

Se realizó un análisis exploratorio de los datos que se miden en CERALBE, permitiendo reducir la dimensionalidad de los datos a tres componentes principales que explican el 89,11 % de la varianza, seleccionando las variables temperatura, humedad, tiempo de añejamiento, grado alcohólico y volumen para la modelación posterior.

Se calcularon las mermas en bodega durante los 13 meses de estudio, que resultaron ser 763,43 L, lo cual equivale a un 10,5 % del volumen inicial existente; superando el 6 % permitido en la norma de República Dominicana y que representa una pérdida de \$32 718. Se determinó que el 6 % de mermas con respecto al volumen inicial de la solera es 434,72 L, que representa unas pérdidas de \$18 631.

## Referencias

- [1] J. Pérez and R. Delgado, *Bebidas alcohólicas destiladas y añejadas*. [CD-ROM]. La Habana: IIIA, 2007.
- [2] M. Boscolo, B. S. Lima-Neto, and D. W. Franco, "Envelhecimento de aguardente de cana-de-açúcar em tonéis de madeira", *Engarrafador Moderno*, vol. 6, no. 41, pp. 30-33, 1995.
- [3] J. Marcano, (2019, Septiembre 15). *El ron. Tradición en Las Antillas* [Online]. Available: <https://mipais.jmarcano.com/economia/ron.html>
- [4] L. E. López, L. Zumalacárregui, O. Pérez, "Análisis de componentes principales aplicado a la fermentación alcohólica", *Revista Científica de la UCSA*, vol. 6, no. 2, pp. 11-19, 2019.
- [5] Desiree, G. (2019, Septiembre 8). *Conoce las etapas de validación de procesos* [Online]. Available: <https://www.qbd.lat/blog/conoce-las-etapas-de-validacion-de-procesos>
- [6] K. Canter, "Utilizing RM in a submission for developing critical process parameters and critical to quality attributes", presented at FDA/Industry Statistics Workshop, Washington, D. C, 2006.
- [7] M. D. González, M. A. Vázquez, D. Redondo, "Estudio comparativo de rones y aguardientes añejados en barriles de roble y por el proceso acelerado", *ICIDCA*, vol. XL, no. 3, pp. 12-19, 2006.
- [8] L. Mesa, O. Gozá, M. Uranga, A. Toledo, and Y. Gálvez, "Aplicación del análisis de componentes principales en el proceso de fermentación de un anticuerpo monoclonal", *Vaccimonitor*, vol. 27, no. 1, pp. 8-15, 2018.
- [9] DGII (Dirección General de Impuestos Internos). (2019, Febrero 20). *Norma general sobre el manejo del alcohol en las licorerías. No. 03-2012* [Online]. Available: <https://www.dgii.gov.do/legislacion/normas/Documents/03-2012.pdf>

# Efecto de la mezcla de aceites de *Anacardium occidentale*/ *Cocos nucifera* en gasoil sobre la velocidad de corrosión de acero al carbono en solución salina

## Effect of the mixture of *Anacardium occidentale* / *Cocos nucifera* oils in diesel on the corrosion rate of carbon steel in saline

Tomás Darío Marín-Velásquez<sup>1</sup>, Dany Day Josefina Arriojas-Tocuyo<sup>2</sup>

Fecha de recepción: 27 de setiembre de 2019  
Fecha de aprobación: 8 de enero de 2020

Marín-Velásquez, T; Arriojas-Tocuyo, D. Efecto de la mezcla de aceites de *Anacardium occidentale* / *Cocos nucifera* en gasoil sobre la velocidad de corrosión de acero al carbono en solución salina. *Tecnología en Marcha*. Vol. 33-4. Octubre-Diciembre 2020. Pág 37-46.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v33i4.4484>



- 1 Ingeniero Químico, Magíster en Gestión y Auditorías Ambientales. Departamento de Proyectos, Innova Scientific SAC, Lima, Perú. Correo electrónico: [tmarin@innovascientific.com](mailto:tmarin@innovascientific.com)  
 <https://orcid.org/0000-0002-3334-5895>
- 2 Ingeniero de Petróleo, MBA in Oil Industry Management. Departamento Innova Tesis, Innova Scientific SAC, Lima, Perú. Correo electrónico: [darriojas@innovascientific.com](mailto:darriojas@innovascientific.com)  
 <https://orcid.org/0000-0002-8192-9641>

## Palabras clave

Corrosión; pérdida de peso; acero al carbono; *Anacardium occidentale*; *Cocos nucifera*.

## Resumen

En la investigación se evaluó el efecto de mezclas de aceite de *Anacardium occidentale* y *Cocos nucifera* diluidas en gasoil, como recubrimiento anticorrosivo aplicados a acero al carbono, sometido solución salina. Se utilizaron piezas de barras de acero al carbono utilizadas como refuerzos en construcción, las cuales fueron tratadas con una mezcla 50:50 de los aceites, diluidas en concentraciones de 10, 20, 30 y 50% en gasoil. Las piezas de acero, se sumergieron en una solución salina al 10% NaCl por 360 días a una temperatura constante de 50 °C. Además se utilizó una muestra control sin tratamiento, sometida también al medio salino y una muestra tratada solo con gasoil. Se realizaron tres réplicas por tratamiento y se analizaron los resultados de velocidad de corrosión por pérdida de peso, mediante análisis de varianza no paramétrica de Kruskal-Wallis, con el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI.I. Los tratamientos con las mezclas de aceites en gasoil, lograron la reducción de la velocidad de corrosión con eficiencias entre 96.59 y 98.30%, con resultados estadísticamente significativos, donde destaca la mezcla al 50% con diferencia significativa respecto a las otras con 95% de nivel de confianza.

## Keywords

Corrosion; weight loss; carbon steel; *Anacardium occidentale*; *Cocos nucifera*.

## Abstract

In the research, the effect of mixtures of *Anacardium occidentale* oil and *Cocos nucifera* diluted in diesel oil was evaluated, as an anticorrosive coating applied to carbon steel, in saline solution. Pieces of carbon steel bars used as reinforcements in construction were used, which were treated with a 50:50 mixture of the oils, diluted in concentrations of 10, 20, 30 and 50% in diesel. The steel pieces were immersed in a 10% NaCl saline solution for 360 days at a constant temperature of 50 °C. In addition, a control sample without treatment was also subjected to the saline medium and another sample treated only with diesel oil. Three replications were made per treatment and the results of corrosion rate by weight loss were analyzed, by Kruskal-Wallis nonparametric variance analysis, with the statistical program Statgraphics Centurion XVI.I. The treatments with oil blends in diesel, achieved the reduction of the corrosion rate with efficiencies between 96.59 and 98.30%, with statistically significant results, where the 50% blend stands out with significant difference compared to the others with 95% level of trust.

## Introducción

La corrosión puede ser definida como la destrucción o deterioro de un material por efecto de la reacción con su entorno [1]. Se puede decir que la corrosión es un proceso de metalurgia inversa, debido a que los metales, de forma natural se encuentran como óxidos, por ser éste su estado de menor energía y al ser purificados, se oxidan para regresar a su estado natural [2]. La corrosión ocasiona daños en la infraestructura de plantas de procesos e industrias y las máquinas que en ellas operan, que suelen ser costosas de reparar, en términos de pérdida o producto contaminado, en términos de daños ambientales y posiblemente en términos de seguridad humana [3].



La mayoría de los procesos corrosivos se producen mediante reacciones electroquímicas de reducción-oxidación y para que las mismas se desarrollen, es necesario que existan tres constituyentes: unos electrodos (un ánodo y un cátodo), un electrolito, como medio salino y una conexión eléctrica entre los electrodos [4]. Las estructuras metálicas sumergidas en agua salina, sobre todo las de acero al carbono, están sometidas a procesos oxidativos, que generan destrucción por corrosión electroquímica [5].

La prevención del deterioro de estructuras de acero al carbono por corrosión, incluye el uso de recubrimientos que impidan la transferencia de electrones del metal y el medio oxidante, lo que ha llevado a una mejora constante de las propiedades más importantes de los recubrimientos: la continuidad y la adherencia [6]. A pesar del uso generalizado de los recubrimientos anticorrosivos, su uso se ha venido reduciendo debido a que muchos compuestos químicos utilizados en sus formulaciones han sido sujeto de regulaciones gubernamentales a nivel mundial por la creciente preocupación sobre aspectos de seguridad, salud y protección ambiental, lo que genera innovación tecnológica en el campo de los recubrimientos [7].

El uso de aceites vegetales y derivados de ellos como recubrimientos anticorrosivos ha sido sujeto de estudios en diversas investigaciones, entre ellas el aceite de la cáscara de la nuez de *Anacardium occidentale* [8], [9], [10] y el aceite de *Cocos nucifera* [11], [12], [13], [14]. En todas las investigaciones se ha demostrado la aplicabilidad de los aceites como anticorrosivos, sin embargo el uso de mezclas de ambos no ha sido estudiado, ni tampoco su uso en acero de refuerzo de construcción. Por lo anterior se realizó una investigación donde se evaluó la mezcla de los aceites de cáscaras de *Anacardium occidentale* y *Cocos nucifera* con gasoil como anticorrosivos aplicado a barras de acero de refuerzo de construcción sometidas a un medio acuoso salino.

## Metodología

En la investigación se utilizaron 18 piezas de barra de acero al carbono de construcción lisa, según especificaciones de la Norma Técnica Peruana NTP 341.031 [15], de 9.5 mm de diámetro y 100 mm longitud (figura 1). La solución salina se preparó al 10% de NaCl (99%) en agua destilada, para luego ser caracterizada a partir de ensayos normalizados de laboratorio, donde se determinaron las siguientes propiedades: densidad [16], pH [17] y Conductividad eléctrica [18].



**Figura 1.** Muestra de pieza de acero al carbono utilizada.

## Obtención de los aceites

Para la obtención del aceite de *Anacardium occidentale*, se recolectaron las cáscaras, se les extrajo la nuez, se cortaron en pedazos de aproximadamente 1 cm y se secaron en estufa a 105 °C por 24 horas. Las cáscaras fueron sometidas a un proceso de extracción sólido-líquido,

mediante un equipo Soxhlet, utilizando como solvente n-hexano al 98% de pureza. La mezcla de aceite y solvente fue sometida a un proceso de destilación simple, con la finalidad de extraer el solvente, obteniendo un aceite con el mayor grado de pureza posible.

El aceite de *Cocos nucifera* se obtuvo mediante la técnica de hidroextracción, para la cual se siguió el procedimiento descrito por [19], en el que se especifica la forma de obtener el aceite de forma tradicional por hidroextracción.

Los aceites fueron mezclados en proporción 50:50, envasados en frascos de vidrio y almacenados a temperatura ambiente para ser utilizados posteriormente en los ensayos de corrosión.

### Preparación de las piezas de acero al carbono

Las piezas de acero al carbono provenientes de barras de refuerzo para construcción, fueron limpiadas mecánicamente de forma manual con lija n° 100 para eliminar cualquier imperfección en la superficie, para luego ser limpiadas químicamente con alcohol etílico al 70% ev volumen, secadas en estufa durante una hora a 100 °C y dejadas enfriar a temperatura ambiente (25 °C), para luego ser caracterizadas físicamente en cuanto a su densidad, área superficial y masa original. La masa se determinó a través de una balanza analítica marca SARTORIUS Modelo TE214S de capacidad 210 g y precisión de 0.1 mg, la densidad y el área superficial se determinaron matemáticamente considerando que cada pieza es un cilindro. Los valores se muestran en el cuadro 1.

**Cuadro 1.** Propiedades de las piezas de acero al carbono utilizadas

Pieza	Masa, g	Densidad, g/cm <sup>3</sup>	Área superficial, cm <sup>2</sup>
1	39.8639	5.62	31.26
2	39.9419	5.63	31.26
3	39.9243	5.63	31.26
4	39.9337	5.63	31.26
5	39.9400	5.63	31.26
6	39.8702	5.62	31.26
7	40.0047	5.64	31.26
8	39.7672	5.61	31.26
9	40.0262	5.65	31.26
10	39.8894	5.63	31.26
11	39.8725	5.63	31.26
12	39.6329	5.59	31.26
13	39.8819	5.63	31.26
14	39.9186	5.63	31.26
15	39.9987	5.64	31.26
16	39.8675	5.62	31.26
17	39.8665	5.62	31.26
18	39.9212	5.63	31.26

## Formulación de las mezclas de aceites y gasoil

Se formularon cuatro mezclas de los aceites en gasoil de acuerdo a lo que se muestra en el cuadro 2.

**Cuadro 2.** Mezclas de aceites de *Anacardium occidentale* / *Cocos nucifera* en gasoil

Mezcla	Aceites 50:50 (%)	Gasoil (%)
A	10	90
B	20	80
C	30	70
D	50	50

## Desarrollo experimental

Se impregnaron tres piezas de acero al carbono por cada una de las mezclas, cubriendo completamente la superficie de las mismas para un total de 12 piezas tratadas y adicionalmente tres piezas fueron impregnadas con gasoil puro con la finalidad de tomarlas como tratamiento blanco. Las tres piezas restantes se dejaron sin tratamiento para utilizarlas como muestra control. Las piezas impregnadas se secaron en estufa a una temperatura de 50 °C por 24 horas y luego se dejaron enfriar a temperatura ambiente (25 °C).

Se llenaron 18 frascos de vidrio con la solución salina y en ellos se sumergieron las piezas de acero al carbono, constituyendo un sistema de seis bloques con tres réplicas y se colocaron en la estufa a una temperatura de 50 °C por un tiempo de 360 horas (15 días), al cabo de los cuales se retiraron las piezas, se limpiaron químicamente con alcohol al 70% y se decaparon mecánicamente de forma manual con lija n° 100. Cada pieza fue pesada nuevamente para obtener la pérdida de peso del material debido a la corrosión uniforme. La velocidad de corrosión se obtuvo mediante la ecuación 1 [20].

$$V_{corr} = \frac{K * \Delta m}{A * \rho * t} \quad (1)$$

Dónde:  $\Delta m$  representa la diferencia entre la masa inicial y final de la pieza en gramos,  $A$  representa el área superficial en  $\text{cm}^2$ ,  $\rho$  representa la densidad del metal en  $\text{g/cm}^3$ ,  $t$  representa el tiempo de exposición en horas,  $K$  es una constante utilizada para conversión de unidades (87600) y  $V_{corr}$  representa la velocidad de corrosión en  $\text{mm/año}$

La eficiencia de los tratamientos anticorrosivos se determinó a partir de la ecuación 2 [21].

$$\%Ef = \frac{V_{corr_{Control}} - V_{corr_{Tratamiento}}}{V_{corr_{Control}}} * 100 \quad (2)$$

Dónde:  $V_{corr_{Control}}$  representa la velocidad de corrosión medida en el bloque control,  $V_{corr_{Tratamiento}}$  representa la velocidad de corrosión medida en cada bloque tratamiento y  $\%Ef$  es la eficiencia del tratamiento.

### Tratamiento estadístico de los resultados

El diseño experimental fue de bloques al azar con seis tratamientos y tres réplicas por bloque. Se aplicó inicialmente una prueba de normalidad de Shapiro-Wilks, para analizar el cumplimiento del supuesto de normalidad. En función al resultado de la prueba mencionada, se aplicó análisis de varianza, para establecer las posibles diferencias en los resultados obtenidos en cada uno de los bloques, comparando con el resultado obtenido en la muestra control. La significancia fue de 0.05, lo que representa un nivel de confianza estadística de 95%. Los análisis estadísticos y gráficos se realizaron con el programa Statgraphics Centurion XVI.I.

### Resultados y Discusión

La solución salina utilizada se preparó al 10% de NaCl, con la intención de someter las piezas de acero al carbono a condiciones de alta salinidad durante el tiempo de prueba. Esta salinidad es superior a la del agua de mar, la cual posee un valor aproximado de 35 ups (3.5%) [22], [23], también fue mayor a las utilizadas en otras investigaciones similares, las cuales utilizaron 1.1% [24] y 3.5% [25], lo que demuestra las condiciones extremas de salinidad a la que fueron sometidas las piezas de acero en la investigación. La densidad de la solución salina fue de 1.077 g/ml a una temperatura de 25 °C, que al ser comparada con la densidad del agua pura a esa misma temperatura de 0.997 g/ml [26], se observa un aumento en el valor debido a la presencia de las sales disueltas, valor que también fue superior al promedio del agua de mar, el cual es de 1.027 g/ml [27]. La conductividad eléctrica reportó un valor de 37.6 S/m el cual es superior al reportado para el agua de mar, cuyo rango es de 3 a 6 S/m [28], debido a la mayor cantidad de iones de sal disueltos en el agua salina preparada, ya que la misma posee mayor cantidad de sal. En cuanto al pH obtenido, fue de 8.0, valor que se encuentra entre el rango del agua de mar, medido entre 7.7 y 8.2 [29], lo que indica que esta propiedad no se ve afectada en gran medida por la salinidad.

Luego de realizar la fase experimental, se obtuvieron los resultados mostrados en el cuadro 3, referidos a las velocidades de corrosión determinadas a los 360 días de exposición de las piezas de acero al carbono al medio salino.

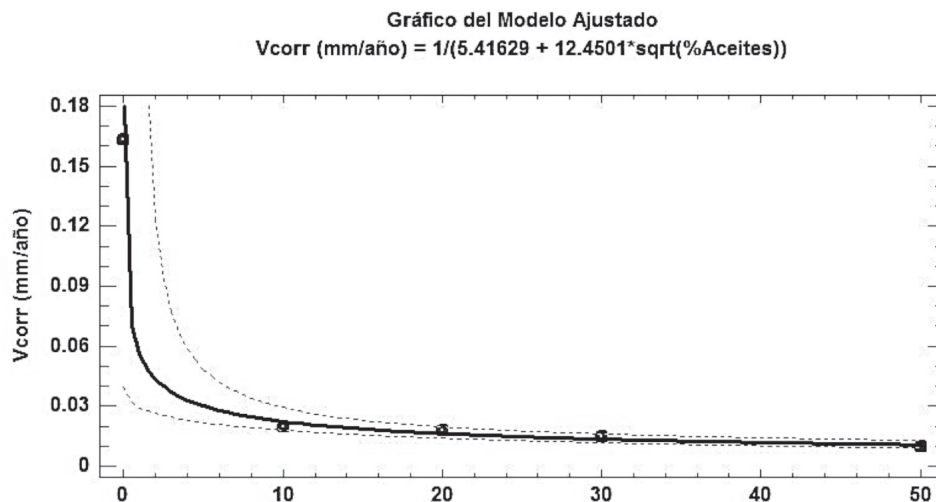
**Cuadro 3.** Resultados de velocidad de corrosión obtenidos a los 360 días

Tratamientos	Vcorr (mm/año)	Desviación estándar	%Ef
Control	0.563	0.007	----
Gasoil	0.163	0.028	72.48
A	0.020	0.012	96.59
B	0.018	0.008	96.95
C	0.015	0.001	97.48
D	0.010	0.002	98.30

En el cuadro 3 se observa que la velocidad de corrosión disminuye a medida que aumenta el porcentaje de los aceites en la mezcla y la tendencia gráfica puede observarse en la figura 2.

La Vcorr del acero al carbono utilizado tuvo un comportamiento decreciente respecto al porcentaje de los aceites en la mezcla, observándose como se produjo un efecto anticorrosivo al impregnar las piezas con los aceites. La Vcorr obtenida al sumergir las piezas de acero al carbono en la solución salina sin ningún tipo de protección fue muy superior a las obtenidas al impregnar las piezas tanto con el gasoil puro, como con cada una de las mezclas. El efecto

se observa más claramente en la figura 2, donde la  $V_{corr}$  disminuye de forma rápida entre las piezas impregnadas con gasoil y las que se cubrieron con las mezclas, lo que demuestra el efecto positivo de éstas. El efecto anticorrosivo del aceite de cáscaras de *Anacardium occidentale*, también fue observado, al ser aplicado como tratamiento de superficie de acero al carbono [9]. Así mismo, en otra investigación, se concluyó que el aceite de *Anacardium occidentale* es un potencial inhibidor de la corrosión para aceros al carbono en soluciones acuosas [8]. Este aceite también fue evaluado como anticorrosivo aplicado a acero al carbono en un medio ácido, llegando a obtenerse resultados satisfactorios [10].



**Figura 2.** Gráfica de velocidad de corrosión en función al porcentaje de aceites en la mezcla.  
 Fuente: programa estadístico Statgraphics Centurion XVI.I.

El aceite de *Cocos nucifera*, también ha sido utilizado en investigaciones como anticorrosivo para el tratamiento de acero al carbono, lográndose en todos los casos resultados que demuestran su aplicabilidad [12], [13], [30]. Los resultados de las investigaciones anteriores concuerdan con lo observado en la presente investigación y demuestran que ambos aceites al ser mezclados en proporciones iguales y diluidos en gasoil, mantienen las propiedades anticorrosivas que poseen por separado.

En el cuadro 3 también se muestran las eficiencias calculadas para cada tratamiento, con un máximo de 98.30% para el tratamiento D. Al comparar el resultado de eficiencia máxima con valores reportados para los aceites por separado, se observa que en el caso el aceite de cáscara de *Anacardium occidentale* se tienen valores mayores, en algunos casos de 100% [8] y menores de 86% [10]. Con el aceite de *Cocos nucifera*, también se obtuvieron valores menores de 97% [11] y 87% [12]. Las diferencias en las observadas respecto a la presente investigación, se deben a las diferentes condiciones experimentales, así como también a las diferencias en los tipos de acero utilizados en cada investigación.

Al aplicar la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, se obtuvo un estadístico de 0.61 con un p-valor de 0.000. Como el p-valor es menor a 0.05, se puede rechazar la idea de que  $V_{corr}$  proviene de una distribución normal con 95% de confianza. Al no cumplirse el supuesto de normalidad, se procede a realizar un análisis de varianza no paramétrica de Kruskal-Wallis, la cual arrojó un valor del estadístico de 13.32 y un p-valor de 0.02, lo que indica que existe

diferencia estadísticamente significativa de por lo menos un par de medianas de  $V_{corr}$  para los tratamientos aplicados. En el cuadro 4 se muestran los resultados del análisis de varianza realizado.

**Cuadro 4.** Resultados del análisis de varianza no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Tratamiento	Rango	Grupo homogéneo		
D	3.33	X		
C	7.00	X	X	
B	7.83	X	X	
A	7.83	X	X	
Gasoil	14.00		X	X
Control	17.00			X

Fuente: elaboración propia a partir de resultados del programa Statgraphics Centurion XVI.I.

Se observa que el tratamiento D mostró el menor valor de velocidad de corrosión, diferenciándose de los demás, de manera estadísticamente significativa con un nivel de confianza de 95%. El resto de los tratamientos no mostraron diferencias significativas, sin embargo se diferenciaron del tratamiento que solo contenía gasoil. Todos los tratamientos fueron estadísticamente diferentes al Control, el cual presentó el mayor valor de  $V_{corr}$ . Lo anterior corrobora el efecto anticorrosivo de los tratamientos aplicados, además al utilizar la mezcla de aceites entre 10 y 30% en gasoil, no se obtienen resultados diferentes, sin embargo la mezcla al 50% de los aceites en gasoil ejerció un efecto estadísticamente significativo, en la reducción de la  $V_{corr}$ , es decir que no solo presentó el mejor tratamiento anticorrosivo, sino que su efecto fue significativo. El análisis estadístico demuestra que con los tratamientos A, B y C, se obtienen eficiencias anticorrosivas cuyos valores, aun cuando presentan diferencias numéricas, no son significativas, siendo en los tres casos de aproximadamente 97%. El tratamiento D si causó un efecto significativo al aumentar su eficiencia anticorrosiva a un valor aproximado de 98%. La aplicación de análisis estadísticos a ensayos de corrosión del acero [31], mostró coincidencias con lo obtenido, aun cuando se utilizó en el caso citado, estadística paramétrica a criterio de los investigadores, sin analizar el supuesto de normalidad, lo que la diferencia de la presente investigación.

## Conclusiones

La mezcla de los aceites de *Anacardium occidentale* y *Cocos nucifera* en proporción 50:50, diluidos en gasoil, retardan la velocidad de corrosión uniforme de barras de acero al carbono utilizadas como refuerzos de construcción, de acuerdo a las condiciones a las que se le sometieron en la investigación, llegando a tener eficiencias como recubrimiento anticorrosivo entre 96.59 y 98.30%, lo que demuestra su potencial uso como aditivo para la protección de estructuras de acero sumergidas en aguas salinas.

Los resultados obtenidos demuestran el potencial de la mezcla de aceites como anticorrosivos, sin embargo se recomienda continuar evaluando los mismos con diferentes tipos de acero al carbono y sometiéndolos de atmósferas salinas con otros diseños experimentales, así como también mediante otras técnicas de medición de la velocidad de corrosión como métodos potenciométricos o por isotermas de absorción.

## Referencias

- [1] R. Pierre, *Handbook of corrosion engineering*. New York: McGraw-Hill, 2000.
- [2] Z. Ahmad, *Principles of corrosion engineering and corrosion control*. Oxford: Elsevier, 2006.
- [3] R. Pierre, *Corrosion inspection and monitoring*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2007.
- [4] J.A. Salazar-Jiménez, "Introducción al fenómeno de corrosión: tipos, factores que influyen y control para la protección de materiales (Nota técnica)", *Tecnología en Marcha*, vol. 28, n° 3, pp. 127-136, julio-septiembre 2015.
- [5] A.D.V. Moreno, T. Pérez y M. Martínez, *El fenómeno de la corrosión en estructuras de concreto reforzado*. Sanfandila, Querétaro, México: Instituto mexicano del transporte, 2001.
- [6] M.A. Castillo. (2016). Carrocería y pintura. Propiedades anticorrosivas de los recubrimientos [Online]. Disponible en: <http://www.centro-zaragoza.com>
- [7] NRF-004-PEMEX-2011, *Protección con recubrimientos anticorrosivos a instalaciones superficiales de ductos*. México DF: Comité de normalización de petróleos mexicanos y organismos subsidiarios, 2011.
- [8] K. Binte y T. Binte, "Cashew nut oil derivative: an alternative corrosion inhibitor for mild steel" in *International Conference on Chemical Engineering 2011*. Dhaka, Bangladesh.
- [9] P. García, L. Guerra, J. Quintero, D. Rodríguez, Y. Sosa y A. Tejedor, "Extracción del aceite de la cáscara de la nuez de la India (*Anacardium Occidentale*) para el tratamiento superficial de metales", *Revista de Iniciación Científica*, vol. 2, n° 2, pp. 103-107, diciembre 2016.
- [10] M. Hassan y S.B. Sobri, "Corrosion inhibition studies of cashew nut (*Anacardium occidentale*) on carbon steel in 1.0 M Hydrochloric Acid Environment", *Materials Letters*, vol. 229, pp. 82-84, octubre 2018.
- [11] S.A. Adzor y B.O. Udoye, "Corrosion inhibitive effects of coconut (*Cocos nucifera* linn) water for mild steel in acidic médium", *European Journal of Material Sciences*, vol.3, n°.2, pp.1-12, mayo 2016.
- [12] L.M. Rivera-Grau, M. Casales, I. Regla, D.M. Ortega-Toledo, D. Cuervo, J. Asencio, J.G. González-Rodríguez y L. Martín-Gómez, "Corrosion inhibition by a coconut oil modified imidazoline for carbon steel under the combined effect of CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>S", *Int. J. Electrochem. Sci.*, vol. 7, pp. 12610-12620, 2012.
- [13] S.A. Umoren, I.B. Obot, A.U. Israel, P.O. Asuquo, M.M. Solomon, U.M. Eduok y A.P. Udoh, "Inhibition of mild steel corrosion in acidic medium using coconut coir dust extracted from water and methanol as solvents", *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, vol. 20, n°. 5, pp. 3612-3622, septiembre 2014.
- [14] P.R. Vijayalakshmi, R. Rajalakshmi y S. Subhashini, "Corrosion Inhibition of Aqueous Extract of *Cocos nucifera* - Coconut Palm - Petiole Extract from Destructive Distillation for the Corrosion of Mild Steel in Acidic Medium", *Portugaliae Electrochimica Acta*, vol. 29, n°. 1, pp. 9-21, 2011.
- [15] NTP 341.031, *Hormigón (concreto). Barras de acero al carbono con resaltes y lisas para hormigón (concreto) armado. Especificaciones*. Lima, Perú: Comisión de reglamentos técnicos y comerciales – INDECOPI, 2008.
- [16] *Standard Test Methods for Specific Gravity, Apparent, of Liquid Industrial Chemicals*, ASTM D891, 2009.
- [17] *Standard Test Methods for pH of Water*, ASTM D1293, 2012.
- [18] *Standard Test Methods for Electrical Conductivity and Resistivity of Water*, ASTM D1125, 2014.
- [19] C.P. Dasilva, F.I. Restrepo, I.A. Peralta, M.M. Vásquez, M.L. Portura y Y.A. Portura, "Extracción de aceite de Coco (*Cocos nucifera*) como estrategias de aprovechamiento de los productos locales de Mitú", *Vaupés Innova*, vol. 1, pp. 82-89, febrero 2017.
- [20] L.L. Wong, S.I. Martin y R.B. Rebak, "Methods to Calculate Corrosion Rates for Alloy 22 from Polarization Resistance Experiments". In *2006 ASME Pressure Vessels and Piping Division Conference*. Vancouver, Canadá.
- [21] R.W. Revie y H.H. Uhlig, *Corrosion And Corrosion Control. An Introduction to Corrosion Science and Engineering*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2008.
- [22] T. Dioses, "Patrones de distribución y abundancia del jurel *Trachurus murphyi* en el Perú", *Rev. peru. biol.* número especial, vol. 20, pp. 067- 074, septiembre 2013.
- [23] F. Echeverría, N. Aguirre, J.G. Castaño, A.C. Valderrama, J.D. Peña y C. Giudice, "Caracterización fisicoquímica y biológica de la bahía de Cartagena en la zona de Mamonal para la evaluación de pinturas antiincrustantes en condiciones estáticas", *Revista Facultad de Ingeniería* n° 39, pp. 7-20, marzo 2007.
- [24] L. Gómez y Y.P. Villabona, "Determinación de la corrosión en probetas de hormigón sumergidas en solución salina", Tesis de licenciatura, Facultad de Ingeniería Programa de Ingeniería Química Cartagena de Indias, D.T y C, Universidad de Cartagena, 2012.

- [25] M.P. Holguín, J.L. Tristancho y D.Y. Peña, "Determinación de la resistencia a la corrosión de los biomateriales Ti6Al4V y 316L, mediante análisis gravimétrico", *Scientia et Technica*, vol. 20, n.º. 2, junio 2015.
- [26] O. Pérez, J. Díaz, L. Zumalacárregui y O. Gozá, "Evaluación de propiedades físicas de mezclas etanol-agua (II)", *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia*, n.º 52, pp. 62-74, marzo, 2010.
- [27] SurfaceSWDensity08, "Density of seawater at the sea surface", in *Railsback's Some Fundamentals of Mineralogy and Geochemistry* [Online]. Disponible en: <http://www.gly.uga.edu/railsback/Fundamentals/SurfaceSWDensity08.pdf>
- [28] C. Irrgang, J. Saynisch y M. Thomas, "Impact of variable seawater conductivity on motional induction simulated with an ocean general circulation model", *Ocean Science*, vol.12, n.º. 1, pp. 129-136, enero 2016.
- [29] Y. Nakano y Y.W. Watanabe, "Reconstruction of pH in the Surface Seawater over the North Pacific Basin for All Seasons Using Temperature and Chlorophyll-a", *Journal of Oceanography*, vol. 61, n.º. 4, pp. 673-680, agosto 2005
- [30] N.H. Jayadas y K. Prabhakaran, "Elucidation of the corrosion mechanism of vegetable oil based lubricants", in *STLE/ASME International Joint Tribology Conference*. San Antonio, TX, USA, octubre 2006.
- [31] E.M. Lluveras, J. Martínez, L.D.C. González y J.A. Fundora, "Aplicación de software estadísticos y modelos matemáticos para la evaluación de la velocidad de corrosión en el acero", *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.*, vol. 21, n.º.1, pp. 179-186, Enero-Junio 2018.



# Evaluación fisicoquímica y biológica en sistemas de tratamiento comerciales en Costa Rica

## Physical-chemical and biological evaluation in commercial treatment systems in Costa Rica

Guillermo Calvo-Brenes<sup>1</sup>, Diana Zambrano<sup>2</sup>, Sofía Picado-Valverde<sup>3</sup>

---

*Fecha de recepción: 6 de agosto de 2019*  
*Fecha de aprobación: 3 de diciembre de 2019*

Calvo-Brenes, G; Zambrano, D; Picado-Valverde, S. Evaluación fisicoquímica y biológica en sistemas de tratamiento comerciales en Costa Rica. *Tecnología en Marcha*. Vol. 33-4. Octubre-Diciembre 2020. Pág 47-61.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v33i4.4496>



- 1 Centro de Investigación en Protección Ambiental (CIPA), Escuela de Química, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: gcalvo@tec.ac.cr.
- 2 Centro de Investigación en Protección Ambiental (CIPA), Escuela de Química, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: dzambrano@tec.ac.cr.
- 3 Centro de Investigación en Vivienda y Construcción (CIVCO), Escuela de Ingeniería de la Construcción, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica. Correo electrónico: sapicado@tec.ac.cr.

## Palabras clave

Aguas residuales domésticas; sistemas de tratamiento; tanques sépticos; filtro anaerobio; evaluación físico-química; evaluación biológica; evaluación hidrodinámica.

## Resumen

En Costa Rica, el 70.9% de la población utiliza el tanque séptico como sistema de tratamiento individual a las aguas residuales domésticas. A pesar de que los tanques sépticos son la tecnología de tratamiento más utilizada en el país, no se cuenta con información detallada acerca de su funcionamiento y su eficiencia. Además, labores de mantenimiento, como lo es la remoción de lodos sépticos, son ejecutadas directamente por cada familia que usa este sistema y sin que exista un protocolo de limpieza unificado. La evaluación de estos sistemas se llevó a cabo en sistemas de tratamiento fabricados por una de las empresas privadas más importantes del país. Cada equipo evaluado consistía en un tanque séptico y un filtro anaerobio de flujo ascendente (FAFA) para el tratamiento de aguas residuales domésticas. La caracterización incluyó aspectos físicos, químicos y biológicos de la calidad y cantidad del agua residual producida en tres sistemas de tratamiento distintos, considerando variaciones horarias, así como la calidad y la cantidad de lodos acumulados en cada sistema. Los sistemas de tratamiento estaban instalados en dos edificios multifamiliares y una casa unifamiliar. Los resultados indicaron que los sistemas de tratamiento son muy sensibles en cuanto a cantidad y calidad del agua residual, presentando variaciones horarias significativas y además, afectadas por el tipo de uso de agua que se da en los hogares; lo cual está directamente relacionado al funcionamiento del tratamiento.

## Keywords

Domestic wastewater; treatment systems; septic tanks; anaerobic filter; physical-chemical evaluation; biological evaluation; hydrodynamic evaluation.

## Abstract

In Costa Rica, 70.9% of the population uses the septic tank as an individual treatment system for domestic wastewater. Although septic tanks are the most used treatment technology in the country, there is no detailed information about their operation and efficiency. The maintenance tasks, such as the removal of septic sludge, was carried out directly by each family that uses this system, using their own resources. The evaluation was carried out in treatment systems manufactured by one of the most important private companies in the country. Each equipment consists of a septic tank and an upflow anaerobic filter for the treatment of domestic wastewater. The evaluation included a physical, chemical and biological characterization of the quality and quantity of wastewater produced in three different treatment systems, considering hourly variations, as well as the characterization of the quality and quantity of sludge accumulated in each system. The treatment systems were installed in two multifamily buildings and a single-family house. The results indicated that the treatment systems are very sensitive in terms of quantity and quality of wastewater, presenting significant hourly variations and also affected by the type of water use that occurs in homes; which is directly related to the operation of the treatment.

## Introducción

En Costa Rica, el 70,9% de la población utiliza el tanque séptico como sistema de tratamiento para sus aguas residuales domésticas. El tanque séptico es un sistema anaerobio capaz de tratar aguas residuales domésticas, institucionales y en algunos casos industriales; a partir de un proceso físico, químico y biológico [1]. Sin embargo, existen grandes deficiencias y aspectos que no se han evaluado tanto en diseño como en operación, mantenimiento y función de estos sistemas de tratamiento [2]. Las labores de mantenimiento, como lo es la remoción de lodos sépticos, son ejecutadas directamente por cada familia que usa tanque séptico, convirtiéndose en un servicio privado y no regulado por ningún ente estatal. Además, la regulación y gestión legal en el país es desactualizada y limitada, lo cual implica un manejo que no es totalmente adecuado, impactando los cuerpos de agua superficial e incrementando el riesgo de contaminación de las aguas subterráneas.

La caracterización del agua residual es indispensable en el diseño de un sistema de depuración de contaminantes, por lo que saber la calidad de los parámetros físicos y químicos es uno de los primeros pasos al tratar con aguas residuales [3]. La temperatura y el pH son dos variables físicas muy importantes, ya que afectan directamente el crecimiento de microorganismos y por lo tanto, el adecuado funcionamiento biológico del sistema. Otra característica importante, son los sólidos suspendidos totales (SST), que corresponde a aquellas partículas flotantes en el agua y que pueden ser separados del medio líquido a partir de tratamientos físicos sencillos o por medios mecánicos. La naturaleza de los sólidos suspendidos totales es principalmente orgánica [4]. Uno de los indicadores de materia orgánica más importantes es la Demanda Bioquímica de Oxígeno ( $DBO_5$ ) que corresponde a la determinación de la cantidad de oxígeno disuelto que consumen los microorganismos en el proceso de oxidación de materia orgánica biodegradable en un lapso de tiempo de cinco días a  $20^{\circ}C$  [5].

Se reporta en la literatura valores de entrada al sistema en SST que van desde los 100 hasta los 400 mg/L y en el caso del  $DBO_5$  este puede variar de 250 mg/L hasta los 800 [6]. Los parámetros varían según el lugar o la comunidad de la que prevengan, por lo que los valores de un país desarrollado son diferentes a los de uno subdesarrollado, especialmente por la cantidad y la calidad del agua que se usa en estos sistemas. Productos de limpieza, higiene y hasta la dieta en las personas modifican la carga de las aguas residuales. En Estados Unidos, donde el consumo es entre 350-400 L/persona-día, la  $DBO_5$  oscila entre 200-250 mg/L; mientras que en países tropicales subdesarrollados donde el consumo es la mitad o un cuarto de esa dotación la  $DBO_5$  es de 300-700mg/L [7]. El porcentaje de remoción en sólidos suspendidos podría estar aproximadamente en un rango entre 60 y 70%.

Se considera que en países tropicales la remoción es mejor por la estabilidad en las temperaturas, las cuales son de 20 a  $30^{\circ}C$ . Se ha reportado valores muy bajos en sistemas anaerobios como son los tanques sépticos y con temperaturas por debajo de los  $10^{\circ}C$ ; ascendiendo a un porcentaje entre 40-60% cuando las temperaturas son alrededor de los  $20^{\circ}C$ . Una mejor eficiencia ocurre cuando las temperaturas del agua son mayores a los  $25^{\circ}C$  donde pueden obtenerse porcentajes de remoción de  $DBO_5$  hasta de 80%. [8].

La estructura del tanque séptico es fundamental para un adecuado funcionamiento en la depuración de las aguas residuales. Desde la entrada hasta la salida, existen detalles que marcan la diferencia en la eficiencia del sistema. Teóricamente, se ha establecido que se puede utilizar la compartimentalización para tanques con volúmenes mayores a los 5 metros cúbicos, con un máximo de cuatro divisiones cada una de ellas con un largo mínimo de 0,60m. En el primer compartimento se llevaría a cabo el mayor porcentaje de sedimentación y digestión representando entre un 50-60% de volumen de partículas sedimentada, dando lugar a la digestión más favorecida [9]. Debido a los procesos llevados a cabo por un reactor

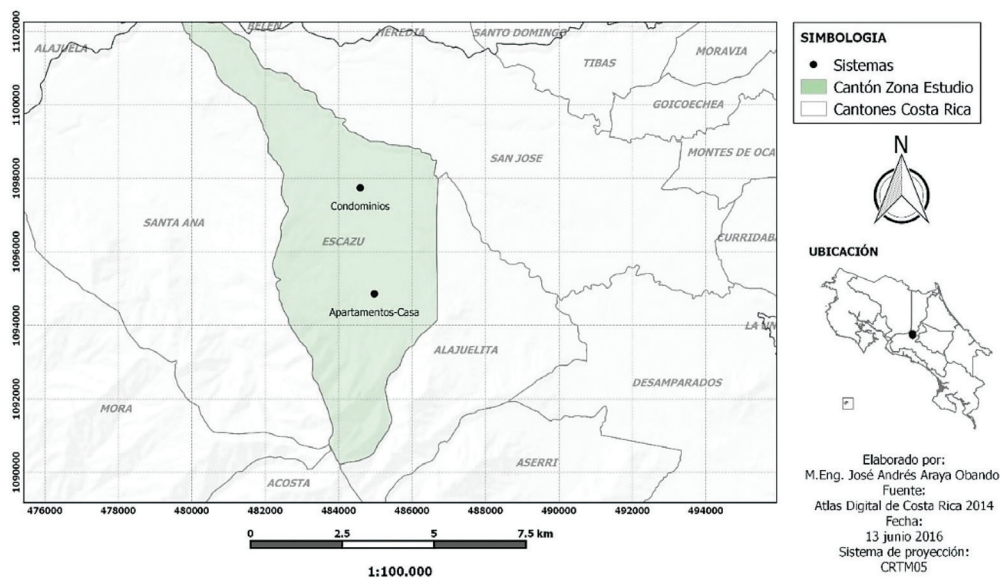
anaerobio, dentro del tanque séptico se da un almacenamiento de lodos en la parte inferior de la estructura; por la descomposición anaerobia y facultativa, el cual es hábitat para una gran cantidad de bacterias y microorganismos; las cuales tienen importancia ambiental por el efecto que podrían causar tanto dentro como fuera del tanque séptico [8].

Se han llevado a cabo diversas investigaciones con relación al uso de sistemas de tratamiento complementarios al del tanque séptico para mejorar la calidad del efluente. Una de estas alternativas es el uso de filtros anaerobios de flujo ascendente (FAFA) colocado a la salida del tanque séptico [10]. Este filtro está constituido por un tanque que contiene material de relleno de materia inerte que forma un lecho fijo y por lo general, son piedras en diferentes granulometrías que dan soporte a ese lecho. En ese relleno se lleva a cabo una fijación de microorganismos y los compuestos orgánicos solubles que no fueron removidos en la etapa de tratamiento anterior; estos compuestos son digeridos y convertidos en productos finales; en su mayoría gaseosos, como el metano o el dióxido de carbono [11]. Estudios llevados a cabo en Brasil por Busato y Palowsky [10] muestran los comportamientos y eficiencias de sistemas integrados en términos de materia orgánica y velocidades de remoción. Estos investigadores observaron que tanto el pH como la temperatura se mantienen constantes, mientras que la  $DBO_5$  presentó una remoción de la carga orgánica del 78%, aproximadamente en todo el sistema compuesto, teniendo el mayor porcentaje de remoción en el reactor anaerobio (69%) y en el caso de SST, se obtuvo una remoción general de un 73%.

## Materiales y métodos

### Descripción de las áreas de estudio

El estudio se llevó a cabo en tres lugares: dos en edificios multifamiliares denominados en esta investigación como “Apartamentos” y otro llamado “Condominios”. El tercero es una casa de habitación unifamiliar denominada como “Casa”. La ubicación de los sitios de estudio se presenta en la figura 1 los cuales forman parte del cantón de Escazú ubicados en el Gran Área Metropolitana de Costa Rica.



**Figura 1.** Ubicación de los sitios de estudio: Apartamentos, Condominios y Casa

Los Apartamentos están compuestos por 4 unidades de vivienda, de nivel socioeconómico medio-alto, donde residen 10 personas en total. Durante el día son pocas las personas con permanencia en las residencias, ya que salen a sus actividades cotidianas, saliendo generalmente antes de las 9 de la mañana y regresando después de las 4 de la tarde. Las aguas residuales, están compuestas por la mezcla de aguas pardas y aguas grises. Las instalaciones hidrosanitarias de cada apartamento constan de 2 servicios sanitarios, 1 ducha, 2 lavatorios, un lavaplatos y una pila.

Los Condominios están conformados por 9 unidades de vivienda, de nivel socioeconómico alto y una casetilla de seguridad. En cada apartamento viven entre 1 ó 2 personas, teniendo actualmente un total de 14 residentes. La mayoría de las personas pasan fuera del condominio durante el día; por lo que aproximadamente sólo 6 ó 7 personas son las que permanecen en el edificio. Las aguas residuales, están compuestas por la mezcla de aguas pardas y aguas grises. Los aparatos hidrosanitarios por cada apartamento son, 2 servicios sanitarios, 2 lavatorios, 1 ducha, un lavaplatos, y una pila.

Por otra parte, el sitio Casa consta de una casa de habitación donde residen 6 personas y en la mañana, antes de las 7:00 a.m., la familia realiza las actividades rutinarias de aseo personal antes de salir a las ocupaciones cotidianas. Después, sólo se encuentra 1 persona dentro del hogar realizando las labores domésticas y durante la tarde se incorporan 3 personas más. Es decir, la casa está con su ocupación completa antes de las 7 de la mañana y después de las 5 de la tarde. Las aguas residuales generadas en el hogar son separadas respectivamente en sus tuberías, por lo que se analizaron únicamente las aguas pardas.

### Caracterización de las aguas residuales

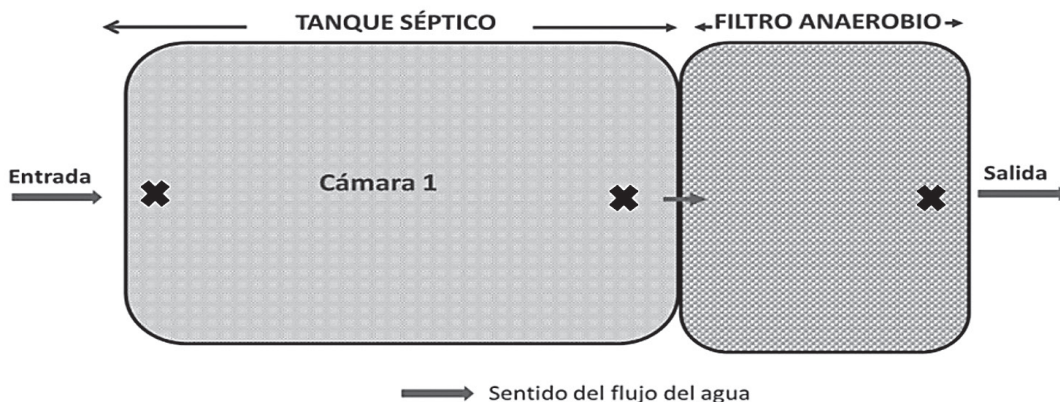
El levantamiento de los usos del agua y las características de las áreas de estudio se efectuó a partir de entrevistas a los encargados de cada uno de los lugares de estudio. La cuantificación de las de aguas residuales en los dos multifamiliares, se llevó a cabo a través de la medición del caudal por métodos volumétricos a lo largo de un día en lapsos de 15 a 30 minutos o cuando se presenciara un cambio en el flujo. En el sistema unifamiliar, no se levantaron caudales ya que estos están asociados con las descargas de los inodoros.

La caracterización en términos de calidad se realizó a partir de muestreos puntuales cada dos horas, entre el periodo de las 7:00 a.m. a 4:00 p.m. con una frecuencia mensual, durante 4 meses, los cuales se realizaban en la cámara de entrada de los respectivos sistemas de tratamiento. Tanto el pH como la temperatura se midieron en el sitio de ubicación de estos sistemas, mientras que los SST y la  $DBO_5$  se efectuaron en un laboratorio de análisis químico. Todos estos parámetros de calidad se evaluaron siguiendo la metodología establecida en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater [12].

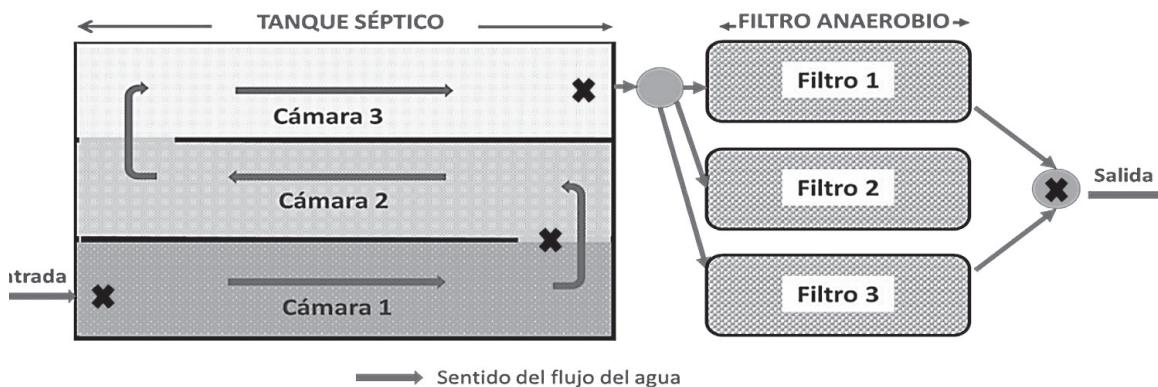
### Evaluación del desempeño de los sistemas de tratamiento

En el tanque séptico de Apartamentos, se tomaron 3 puntos como referencia para los muestreos: uno en la entrada al tanque séptico, otro a la salida de éste y por último la salida del FAFA; tal y como se demarcan con equis en el diagrama de la figura 2.

En el sistema de tratamiento ubicado en los Condominios, se muestrearon 4 puntos: en la entrada del tanque séptico, en la salida de la cámara 1, salida de la cámara 3 y en la salida de los FAFA's; como se muestra en la figura 3.

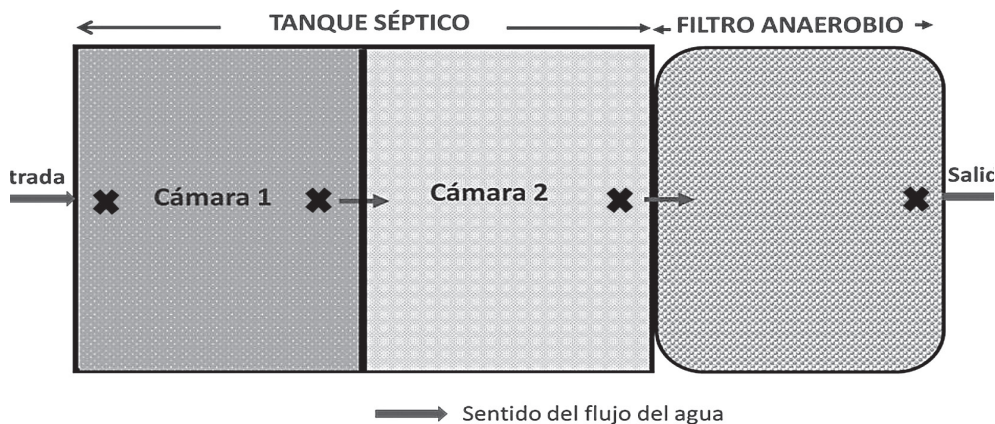


**Figura 2.** Puntos de muestreo del tanque séptico de los Apartamentos.



**Figura 3.** Puntos de muestreo del sistema de tratamiento del Condominios.

En el sistema de tratamiento de la Casa fueron seleccionados 4 diferentes sitios para la caracterización del agua residual, uno en la entrada del tanque séptico, otros dos en las salidas de cada cámara y por último, en la salida del FAFA (figura 4).

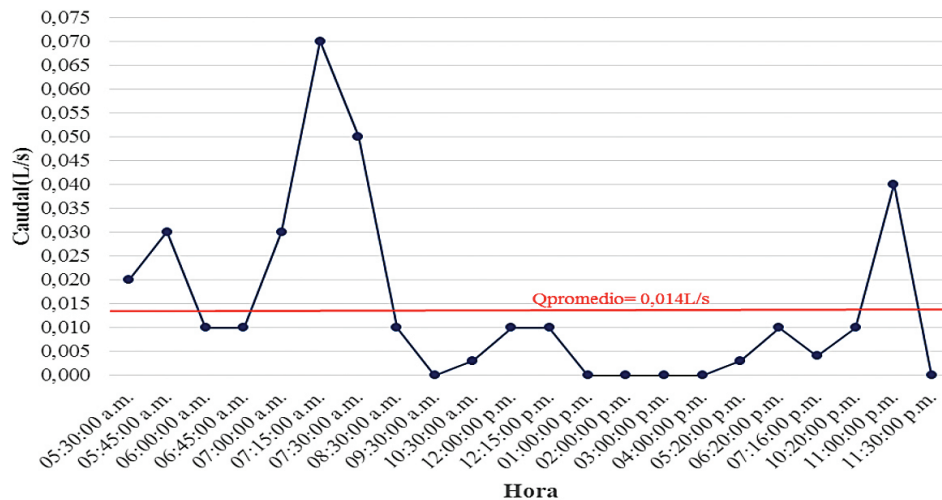


**Figura 4.** Puntos de muestreo del sistema de tratamiento de la Casa de Escazú.

## Resultados y Discusión

### Aguas residuales de Apartamentos

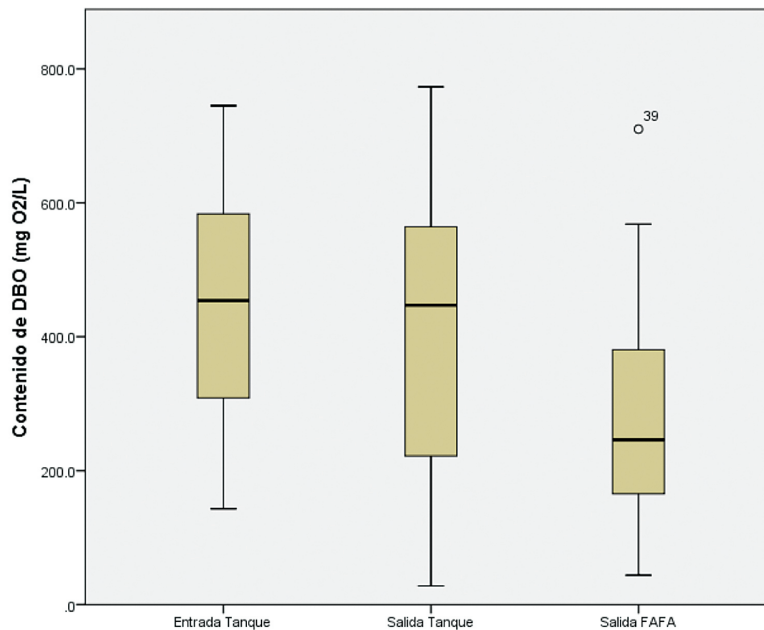
La figura 5 muestra las variaciones de caudal a lo largo de un día entre semana (25 de noviembre 2015) bajo condiciones normales de rutina de los habitantes. Se presentó un incremento en el caudal entre las 6:45 a.m. y las 9:00 a.m. siendo la hora pico las 7:15 a.m., teniendo como punto máximo un caudal de 0.07 L/s. Se presentó un leve incremento en horas del medio día; mientras en periodos entre la 1:00 p.m. y las 5:00 p.m. no hubo generación de aguas residuales. En este último período los habitantes probablemente estuvieron en actividades que no implican el uso del agua o están fuera de la residencia y cuyo retorno ocurrió después de las 5:30 p.m.; retomándose la producción de aguas residuales la cual usualmente se extiende hasta las 11:30 p.m. Las actividades de lavandería se registran en su mayoría, en horas de la noche ya que la calidad del afluente presenta mayor cantidad de espuma o agua jabonosa.



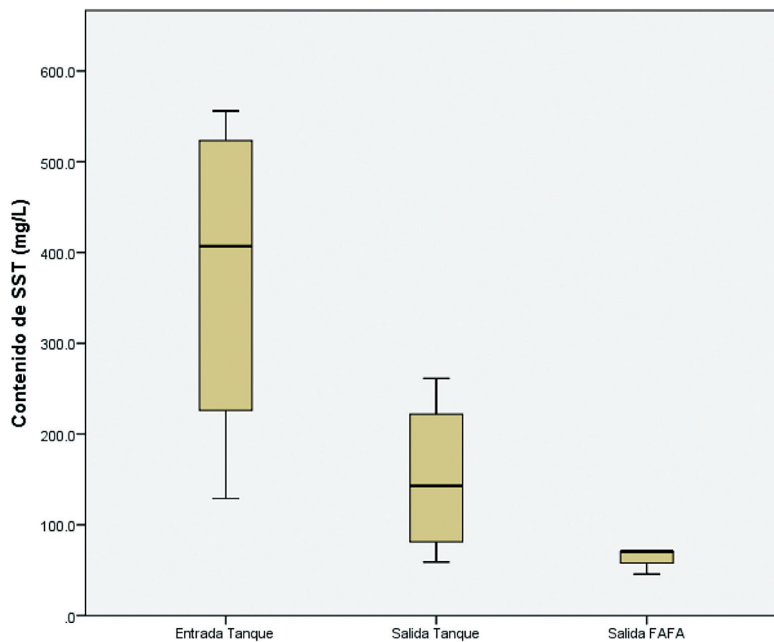
**Figura 5.** Producción de aguas residuales en Apartamentos.

El caudal promedio fue de 0.014L/s con una desviación estándar de 0.019 y que varían en un rango entre un mínimo de 0.000L/s y un máximo de 0.070L/s. El pH del agua residual varió entre 6.66 y 7.28 con un promedio de  $7.01 \pm 0.24$ ; las temperaturas se mantuvieron en un rango entre 21.3 °C y 25.7 °C con un promedio de  $(24.0 \pm 1.0)$  °C. La figura 6 muestra la variación del contenido de  $DBO_5$  en cada una de las etapas de un tanque séptico instalado en los Apartamentos. Durante el período de estudio, el valor promedio de  $DBO_5$  medido en la entrada al tanque séptico fue de 451 mg de  $O_2$ /L, mientras que el valor a la salida del tanque fue de 403 mg/L. Esta diferencia corresponde a un 10,7% de remoción de la materia orgánica. Por otra parte, el contenido de  $DBO_5$  a la salida del FAFA fue de 285 mg de  $O_2$ /L. La reducción de materia orgánica dentro del FAFA correspondió a un 29,3% y la disminución total considerando ambas etapas fue de un 36,9%.

En el caso de los SST, los niveles de remoción fueron mayores; el contenido promedio de SST a la entrada del tanque fue 375 mg/L y a la salida del tanque fue de 152 mg/L, lo que representa una remoción de un 59,6%. Los niveles de SST a la salida del FAFA fueron de 64 mg/L, que corresponde a una disminución de un 57,5% en esta etapa. Si se consideran ambos procesos, entonces la reducción total fue de un 82,8% (figura 7).



**Figura 6.** Variación del contenido de DBO<sub>5</sub> en cada etapa del tanque séptico.



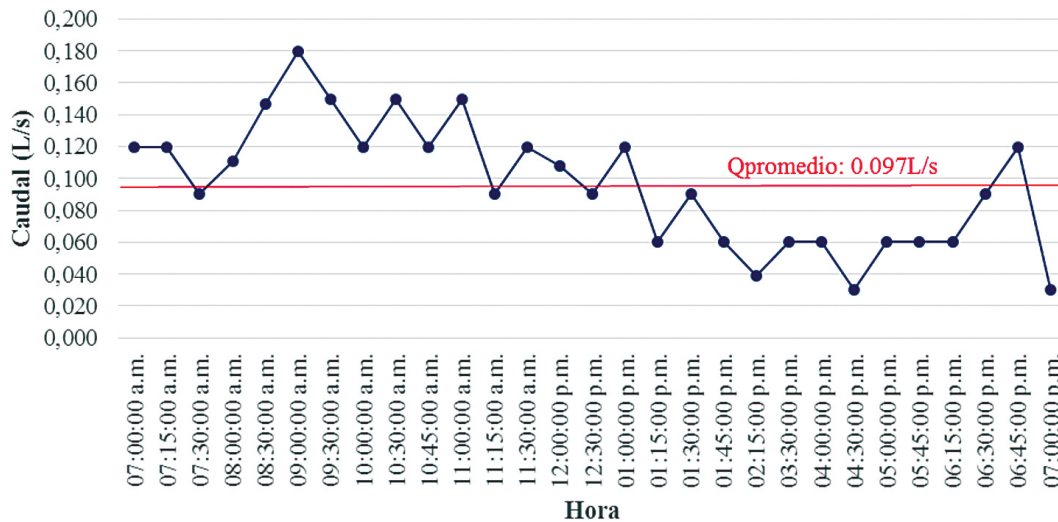
**Figura 7.** Variación del contenido de SST en cada etapa del tanque séptico

En términos generales los parámetros DBO<sub>5</sub> y SST de las aguas residuales son muy variables y sensibles a los cambios de las actividades domésticas y no guardan relación directa con la hora del día o el día de muestreo (figuras 6 y 7). A pesar de las fluctuaciones en la calidad del agua residual, los parámetros de pH y temperatura sí muestran valores muy estables alrededor de 7.01 y 24.0 °C, respectivamente.



### Aguas residuales de Condominios

La figura 8 presenta el comportamiento de la producción de aguas residuales en el Condominios a lo largo de un día entre semana (10 de diciembre 2015) bajo condiciones normales de rutina de los habitantes del Condominios. El comportamiento es variable con valores más altos durante la mañana mostrando los valores mayores entre las 8:30 a.m. y las 10:30 a.m.; por otra parte, el caudal más alto de 0.180 L/s se registró a las 9:00 a.m. Durante el transcurso de la tarde (de 1:30 p.m. hasta las 6:00 p.m.) se observaron caudales de entrada muy bajos; esto debido a que la actividad de limpieza disminuyó y por lo general, son realizadas por un personal externo durante las horas de la mañana y hasta el mediodía. La mayoría de los habitantes de cada apartamento regresa después de las 6:00 de la tarde y no se evidenció producción de aguas residuales a partir de las 7 pm.

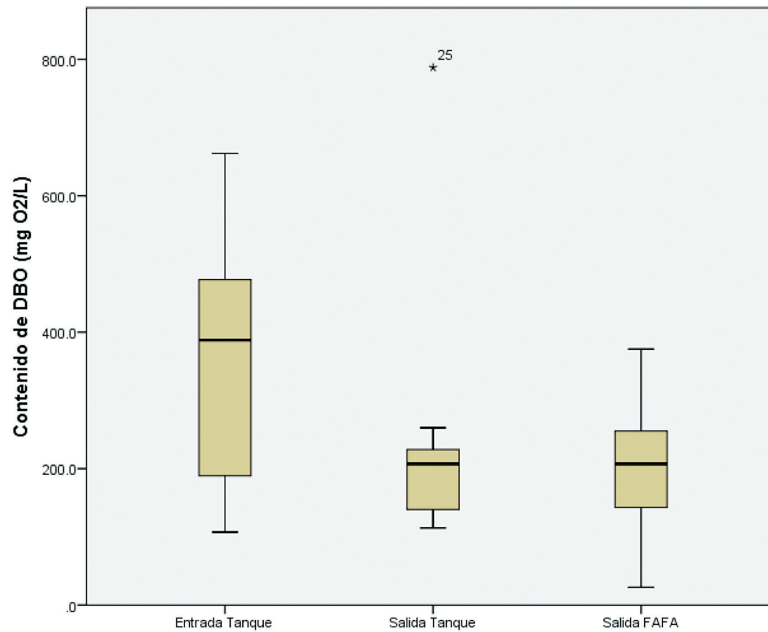


**Figura 8.** Producción de aguas residuales en Condominios.

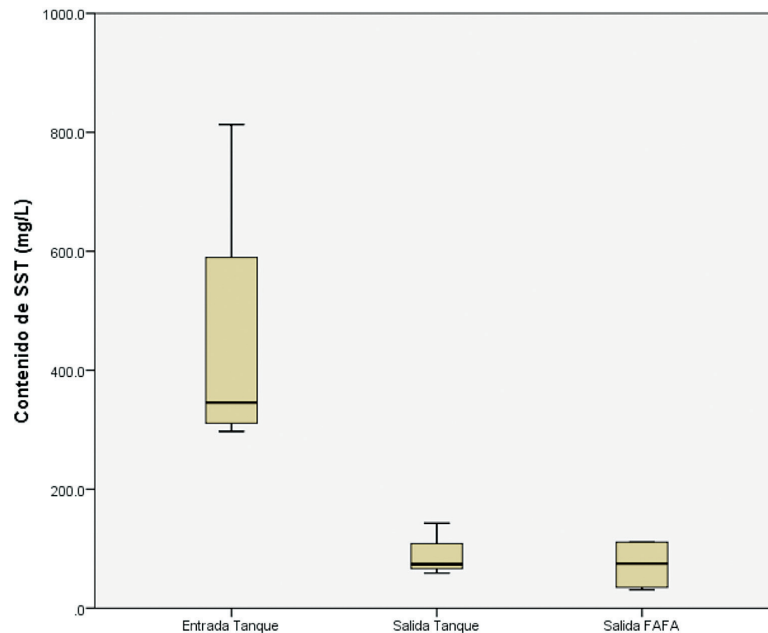
El caudal promedio obtenido fue de 0.097 L/s con una desviación de 0.040 y varió entre un rango mínimo de 0.030 L/s hasta un máximo de 0.180 L/s. La temperatura del agua residual osciló en un rango entre 25.4°C y 27.2°C con un valor promedio de (26.0 ±0.5), mientras que el pH varió entre (6.80-7.50) con un promedio de (7.19 ±0.25).

La figura 9 muestra las variaciones del DBO<sub>5</sub> medidas en cada etapa del sistema de tratamiento instalado en los Condominios. El valor promedio de DBO<sub>5</sub> de entrada fue de 357 mg de O<sub>2</sub>/L y a la salida del tanque séptico fue de 226, lo que representa una remoción de 36,5%. Por otra parte, el valor promedio de salida del FAFA fue de 191 mg de O<sub>2</sub>/L, lo que corresponde a una remoción de 15,7 en esta segunda etapa. Si se considera la remoción global desde la entrada al tanque hasta la salida del FAFA, la remoción fue de 46,5%.

El caso de los SST en los condominios se muestra en la figura 10 donde el valor promedio de entrada de SST fue de 450 mg/L y el de salida en el tanque fue de 88 mg/L, lo que representa una remoción de un 80,6%. El valor promedio de salida del FAFA fue de 73 mg/L, lo que corresponde a una remoción de un 16,6% si se considera el valor de ingreso dentro del FAFA. Por otra parte, si evaluamos este valor de salida del FAFA con respecto al valor de entrada al tanque, la remoción correspondió a un 83,8%.



**Figura 9.** Variación del contenido de DBO<sub>5</sub> en cada etapa en el multifamiliar Condominios.



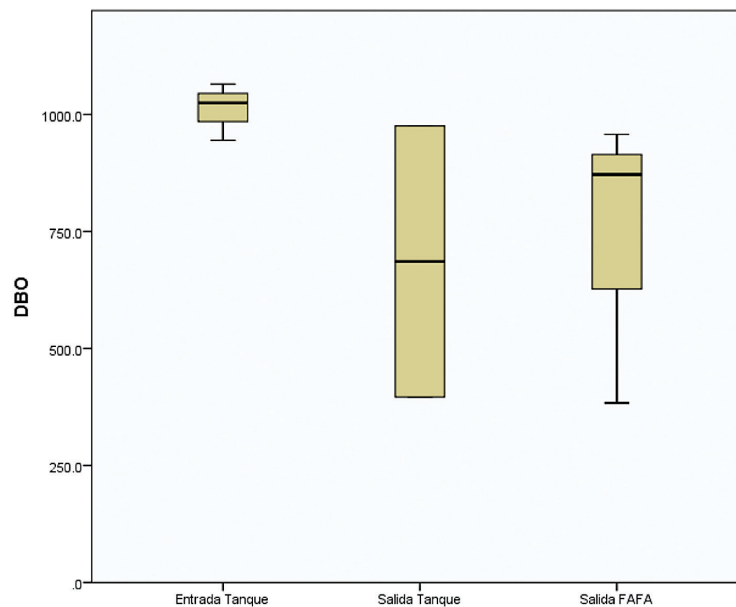
**Figura 10.** Variación del contenido de SST en cada etapa en el multifamiliar Condominios.

No se pudo establecer una relación entre la concentración de la DBO<sub>5</sub> y los SST ya que en todos los muestreos el comportamiento de los resultados fue muy variable, tanto a lo largo del día como entre los días de muestreo. Solamente los SST a las 2:00 p.m. tienen una desviación estándar baja mientras que para los demás resultados tanto en DBO<sub>5</sub> como en SST, existen desviaciones estándar altas. En ambos parámetros también puede observarse que los valores máximos se alcanzan entre las 8:00 a.m. y las 10:00 a.m. y disminuyen en el transcurso del día, mostrando el punto más bajo a las 2:00 p.m.

## Aguas residuales de Casa

La Casa se caracterizó por pasar desocupada la mayor parte del día lo que imposibilitó llevar a cabo un análisis de caudal en forma horaria. Por lo tanto, los muestreos realizados fueron puntuales con una frecuencia mensual en las primeras horas de la mañana las cuales fueron las consideradas como las horas pico en la generación de aguas residuales.

La temperatura para el agua residual varió entre 21.4 °C y 22.4 °C, con un promedio de 22.0°C  $\pm$ 0.6°C, mientras que el pH tuvo un rango entre 7.48 y 8.14 y un promedio de 7.76  $\pm$  0.34. La figura 11 muestra las variaciones de DBO<sub>5</sub> en distintas etapas del tanque séptico instalado en la Casa. El valor promedio de entrada fue de 1012 mg de O<sub>2</sub>/L y el de salida del tanque fue de 686, lo que representa una remoción de un 32,2%. El valor promedio de salida del FAFA fue de 738 mg de O<sub>2</sub>/L. Si se compara este valor con el de salida del tanque, corresponde a una remoción negativa indicando que este proceso fue ineficiente. Al comparar el valor promedio de entrada al tanque con el de salida del FAFA se obtuvo una remoción de un 27,1%.



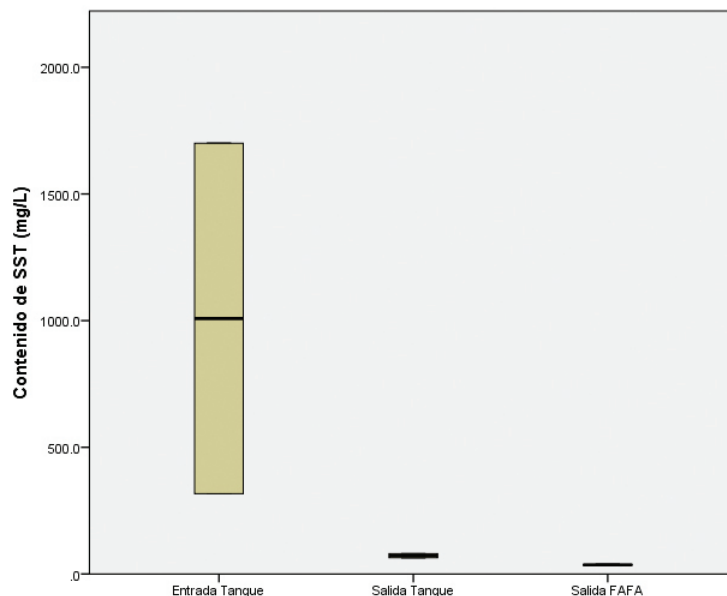
**Figura 11.** Variación del contenido de DBO<sub>5</sub> en cada del sistema de tratamiento en Casas.

El contenido promedio de SST a la entrada del tanque en la Casa fue 1009 mg/L y a la salida del tanque fue de 72 mg/L, lo que representa una remoción de un 92,9%. Los niveles de SST a la salida del FAFA fueron de 36 mg/L, que corresponde a una disminución de un 50,0% en esta etapa. Si se consideran ambos procesos, entonces la reducción total fue de un 96,4% (figura 12).

La calidad del agua residual en Casa es muy cambiante en las concentraciones en los parámetros DBO<sub>5</sub> y SST ya que, al tener caudales de entrada tan pequeños, una descarga que se haga puede marcar la diferencia [13].

En el caso de los valores de aguas residuales domésticas en Apartamentos y Condominios, los parámetros de pH, temperatura, DBO<sub>5</sub> y SST se encuentran entre los rangos teóricos. En el caso de la Casa el valor en las concentraciones de DBO<sub>5</sub> y de SST son mayores, dado que el agua residual de entrada no se encuentra diluida, por recibir solamente aguas de los inodoros; mientras que en los otros dos sitios, se encuentran mezcladas las aguas pardas con

las aguas grises; provenientes de los diferentes usos de duchas, servicios sanitarios, lavadoras, lavaplatos y otros generadores de aguas residuales. Además, el flujo de entrada al sistema de la casa es menor comparado con los otros dos sistemas en estudio.



**Figura 12.** Variación del contenido de SST en cada etapa en la vivienda unifamiliar Casa.

Respecto a la temperatura, no se tiene un rango claramente establecido para las aguas residuales, ya que éste varía según la temperatura ambiente de cada lugar. Los resultados obtenidos para todos los sistemas de tratamiento son similares, y se acoplan a temperaturas de la zona en la que están ubicados; donde según el Instituto Meteorológico Nacional, la temperatura ambiente promedio anual es de 20.8°C en la zona de Escazú. Las temperaturas del agua residual obtenidas son propias de afluentes en países tropicales las cuales tienen ventajas en el funcionamiento por su estabilidad climática, lo cual permite un crecimiento y proliferación estable de la vida microbiana; facilitando el proceso de las reacciones químicas y manteniendo normales las velocidades de reacción [8]. Los valores de pH son igualmente beneficiosos para el desarrollo de los procesos biológicos; por lo que no requieren ningún tipo de mecanismo de neutralización de pH para desempeñar adecuadamente la depuración de aguas residuales por parte de los microorganismos [14].

Al considerar todos los parámetros físicos, químicos y biológicos evaluados, se puede confirmarse la teoría de Méndez et al. [13], donde se menciona que la calidad de agua residual de una sistema de tratamiento individual en aguas domésticas es muy variante respecto al tiempo, por presentar caudales pequeños los cuales cambian también horariamente y según al uso del agua dentro de los hogares, en particular para viviendas unifamiliares o multifamiliares de pocas unidades de vivienda, donde no hay amortiguación o regulación de las cargas.

### Evaluación de los sistemas tanque séptico-y filtro anaerobio

En el lugar Apartamentos, tanto los SST como la DBO5 tienden a disminuir después de cada etapa de tratamiento, aunque el valor de la variable a la salida no es un valor constante pues parece estar asociada a cambios en carga contaminante de entrada, variaciones en los caudales y los tiempos de retención de la masa de agua en función del tiempo. En términos de SST, hay

una disminución notable en el tanque séptico y menos marcada en el FAFA, lo cual destaca la labor efectuada por el tanque séptico en la remoción de los SST. Caso contrario ocurre con la  $DBO_5$  ya que se da una baja remoción en el tanque séptico mientras que es más significativa en el FAFA. Por otra parte, el sistema se encuentra limitado debido a las altas concentraciones de  $DBO_5$  y no genera efluentes que cumplan la normatividad de Costa Rica que es 50 mg/L tanto para  $DBO_5$  como SST, en el caso de que estos efluentes sean descargados a un cuerpo receptor.

En el caso de Condominios, la principal remoción de SST se da en la cámara 1 haciéndose menos notoria en el paso de cada una de las cámaras. La remoción en el  $DBO_5$  fue notoria en la cámara 1 aunque menor a la salida de la cámara 3, siguiendo con una remoción después del paso por el FAFA. En este sistema, la mayor reducción de  $DBO_5$  se llevó a cabo en la cámara 1 del tanque séptico. CEPIS [9] menciona que la compartimentalización de los tanques sépticos se favorece que en el primer compartimento se dé una mayor sedimentación y digestión de las partículas del agua residual.

Con respecto al desempeño del sistema en Casa, tanto las concentraciones de SST como de  $DBO_5$  disminuyen conforme van avanzando en el proceso presentando las diferencias más notorias en la primera cámara. Para ambos parámetros, no hay una baja significativa entre el efluente del tanque séptico y la salida del FAFA.

En general, se observó una remoción de la carga de SST y  $DBO_5$  en cada fase del tratamiento, siendo esta más notoria en la primera cámara del tanque séptico, debido a los procesos físicos y biológicos, propios de esta unidad, que propician tiempos de retención hidráulicos mayores para la sedimentación de los sólidos y el consumo de la materia orgánica por parte de los microorganismos [8]. En el tanque séptico se da una remoción significativa de SST y en menor escala de  $DBO_5$ , mientras en el FAFA la remoción de SST es más baja ya que el material particulado en su afluente es menor, propiciándose la remoción de  $DBO_5$  por la densidad microbiana que se da en la biopelícula formada en el lecho filtrante [10].

La variación de los caudales asociados a los diferentes usos del agua y dinámicas de los habitantes, afectan los tiempos de retención, teniendo en cuenta que hay masas de agua que se someten a largos tiempos de residencia dado los periodos donde no hay producción de aguas residuales como las tardes o las noches o tiempos de retención más cortos asociados a los picos de caudal como los que se presentan en la hora de la mañana o el medio día [13].

## Conclusiones

En los sitios evaluados, los parámetros  $DBO_5$  y SST, indicadores de calidad de agua residual doméstica en viviendas unifamiliares o multifamiliares con poca cantidad de unidades de vivienda, son muy fluctuantes en relación con la hora del día muestreado, así como el día de monitoreo. Se presentaron rangos amplios en sus comportamientos y desviaciones altas, lo cual está asociado con los diferentes caudales producidos como consecuencia de los diferentes usos y prácticas del agua que se dan en los hogares. Por lo tanto, no se puede definir una tendencia de comportamiento según la hora del día; sin embargo, los parámetros pH y temperatura son muy estables, tanto a lo largo del día como en los diferentes días.

Variaciones en las actividades domésticas en el tiempo generan a su vez, variaciones en los caudales y las calidades de aguas residuales. Dependiendo de la hora del día, se observan aguas residuales con características de variable carga tanto en  $DBO_5$  como SST.

La evaluación físicoquímica y biológica, indica que los sistemas compuestos por tanques sépticos son muy sensibles y dependientes de las concentraciones de contaminantes en la

entrada y los tiempos de retención variables que se presentan, las cuales van a estar asociados a las variaciones horarias; por lo cual no se puede definir adecuadamente porcentajes de eficiencia en la remoción de las cargas contaminantes.

El pH a lo largo del tren de tratamiento es muy estable, con una leve tendencia a la baja, debido a la digestión anaerobia de materia orgánica y por ende la producción de ácidos grasos volátiles, generados por los microorganismos del tanque séptico y el filtro anaerobio de flujo ascendente.

En el sistema de tratamiento de Apartamentos, el cual es un sistema integrado sin compartimentos; se obtiene que la mayor remoción de sólidos suspendidos totales se da en el tanque séptico, mientras que la mayor remoción de  $DBO_5$  tiene lugar al FAFA que actúa como tratamiento secundario.

En los sistemas de tratamiento compartimentalizados usados en Condominios y Casa, presenta la mayor remoción de SST y  $DBO_5$  en la primera cámara. En general, se presenta la disminución de los valores de estos parámetros conforme el flujo de agua avanza a lo largo del sistema, desde la entrada del tanque séptico hasta la salida del filtro anaerobio de flujo ascendente.

La acumulación de lodos se valoró en dos periodos mensuales diferentes, obteniendo resultados muy diferentes tanto en los diferentes compartimentos como a lo largo del tiempo; por lo que se concluye que la cantidad y calidad del lodo es variable a través del tiempo y dependiendo además de la calidad de uso del agua. Prácticas como la colocación del papel higiénico en el sanitario, genera un incremento notable en la producción de lodos.

## Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos al Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR). También, agradecemos 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] E. Rosales, Tanques sépticos. Conceptos teóricos base y aplicaciones. *Tecnología en Marcha* vol. 18, n.o 2, pp. 26-33, 2005. Recuperado de [http://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec\\_marcha/article/view/205](http://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/205)
- [2] F. Ruiz, *Gestión de las excretas y aguas residuales en Costa Rica: situación actual y perspectiva*. 2012. Recuperado de <https://www.aya.go.cr/centroDocumetacion/catalogoGeneral/Gesti%C3%B3n%20de%20las%20Excretas%20y%20Aguas%20Residuales%20en%20Costa%20Rica%20%20Situaci%C3%B3n%20Actual%20y%20Perspectiva.pdf>
- [3] S. Simón, *Determinación De La Concentración De Nitrógeno En Lodos Activados Para Su Uso Como Biofertilizante* (Tesis de ingeniería). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Torreón, México, 2015. Recuperado de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/7909>
- [4] E. López, J.G. Martínez, y J.L. García, *Determinación de Sólidos suspendidos totales y Sólidos Suspendidos Volátiles*. 2014. Recuperado de [http://www.academia.edu/9209870/Determinaci%C3%B3n\\_de\\_S%C3%B3lidos\\_Suspendidos\\_Totales\\_SST\\_y\\_S%C3%B3lidos\\_Suspendidos\\_Vol%C3%A1tiles\\_SSV\\_en\\_agua\\_tratada](http://www.academia.edu/9209870/Determinaci%C3%B3n_de_S%C3%B3lidos_Suspendidos_Totales_SST_y_S%C3%B3lidos_Suspendidos_Vol%C3%A1tiles_SSV_en_agua_tratada)
- [5] A. Pérez y P. Torres, Evaluación del comportamiento hidrodinámico como herramienta para optimización de reactores anaerobios de crecimiento en medio fijo. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia*, vol. 45, pp. 27-40, 2008. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/rfiua/n45/n45a03.pdf>
- [6] P. Torres, Perspectivas del Tratamiento Anaerobios de Aguas Residuales Domésticas en Países en Desarrollo. *Revista EIA*, vol. 18, pp. 115-129, 2012. Recolectado de <http://www.redalyc.org/html/1492/149225098009/>

- [7] D. Mara, *Domestic Wastewater Treatment in Developing Countries*. London, UK: Earthscan. 2003. Recuperado de [https://www.pseau.org/outils/ouvrages/earthscan\\_ltd\\_domestic\\_wastewater\\_treatment\\_in\\_developing\\_countries\\_2003.pdf](https://www.pseau.org/outils/ouvrages/earthscan_ltd_domestic_wastewater_treatment_in_developing_countries_2003.pdf)
- [8] D. Mara y G.S. Sinnatamby, Rational design of septic tanks in warm climates. *The Public Health Engineer*, vol. 14, no. 4, pp. 49-55, 1986.
- [9] Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente, *Guía para el diseño de tanques sépticos, tanques imhoff y lagunas de estabilización*. 2003. Recuperado de <http://www.bvsde.paho.org/tecapro/documentos/sanea/163esp-diseno-ti.pdf>
- [10] R. Busato y U. Palowsky, *Estudo Cinético De Remoção De Matéria Orgânica De Um Filtro Anaeróbio De Fluxo Ascendente Usado Como Tratamento De Efluente De Reator Uasb: Estudo De Caso Da Ete De Imbituva*. Curitiba, Brasil. 2005. Recuperado de <http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/4976>
- [11] T. Quiterio, *Tratamiento de Agua Residual Doméstica Mediante el Uso de un Filtro Anaerobio Empacado con Espuma de Poliuretano a Diferentes Tiempos de Retención Hidráulica* (Tesis de ingeniería). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Coahuila, México. 2014. Recuperado de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/6496>
- [12] A. D. Eaton, L.S. Clesceri, A. E. Greenberg y M.A.H. Franson, *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 22nd ed. Washington, DC: American Public Health Association. 2012.
- [13] R. Méndez, A. Guijón y C. Quintal, Determinación de la tasa de acumulación de lodos en fosas sépticas de la ciudad de Mérida, Yucatán. *Ingeniería*, vol. 11, no. 3, pp. 55-64, 2007. Recuperado de [http://www.revista.ingenieria.uady.mx/volumen11/determinacion\\_de\\_la\\_tasa.pdf](http://www.revista.ingenieria.uady.mx/volumen11/determinacion_de_la_tasa.pdf)
- [14] Metcalf & Eddy, Inc., Características de las aguas residuales. En: Autor (eds.). *Ingeniería de aguas residuales: Tratamiento, vertido y reutilización*, pp. 53-135, 1995. Madrid, España: McGraw Hill. Recuperado de [http://aulacidta5.usal.es/Bibliocidta/FMPro?-db=bibliocidta.fp3&-format=record\\_detail.htm&-lay=presenta1&Materia=Tratamiento%20de%20aguas&-max=20&-recid=33&-find](http://aulacidta5.usal.es/Bibliocidta/FMPro?-db=bibliocidta.fp3&-format=record_detail.htm&-lay=presenta1&Materia=Tratamiento%20de%20aguas&-max=20&-recid=33&-find) y <http://cidta.usal.es/cursos/ETAP/modulos/libros/Caracteristicas.PDF>

# A Communication Protocol Design aimed at a Multi-Agent System Framework for Miniaturized Satellite Systems

Diseño de un protocolo de comunicación para la plataforma de desarrollo software basado en agentes utilizados en sistemas satelitales miniaturizados<sup>1</sup>

Samantha Interiano-Valverde<sup>2</sup>, Davide Scazzoli<sup>3</sup>,  
Carmen Chan- Zheng<sup>4</sup>, Johan Carvajal-Godínez<sup>5</sup>, Maurizio Magarini<sup>6</sup>

*Fecha de recepción: 8 de agosto de 2019*  
*Fecha de aprobación: 27 de noviembre de 2019*

Interiano-Valverde, S; Scazzoli, D; Chang-Zheng, C; Carvajal-Godínez, J; Magarini, M. A Communication Protocol Design aimed at a Multi-Agent System Framework for Miniaturized Satellite Systems. *Tecnología en Marcha*. Vol. 33-4. Octubre-Diciembre 2020. Pág 62-76.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v33i4.4505>

1 Work based on the Thesis of [13]  
2 Politecnico di Milano, Milano, Italia. Correo electrónico: samantha.interiano@mail.polimi.it.  
3 Politecnico di Milano, Milano, Italia. Correo electrónico: davide.scazzoli@polimi.it.  
4 Universidad de Costa Rica. Puntarenas, Costa Rica. Correo electrónico: carmen.chan@ucr.ac.cr.  
5 Space Systems Laboratory. Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. Correo electrónico: johcarvajal@tec.ac.cr.  
6 Politecnico di Milano. Milano, Italia. Correo electrónico: maurizzio.magarini@polimi.it.





## Keywords

MAES framework; embedded systems; real-time; agent; inter-platform; I<sup>2</sup>C.

## Abstract

In recent years space-science and exploration have become more accessible due to the popularization of the concept of CubeSats. CubeSats are being used as a result of their convenient size and weight requirements, allowing for target missions to be designed, developed, and launched with a significant reduction of costs compared to traditional space missions. Furthermore, the development of target missions has become more intricate, forcing a shift in the traditional notion of using a centralized control architecture to a distributed architecture. A distributed architecture tackles the problem of a possible functionality loss over the control unit. This paper describes the extension of capabilities of the Multi-Agent Systems Framework for Embedded Systems (MAES). This extension provides MAES framework with the ability to perform inter-platform communication, so now the control unit architecture can be broadened allowing agents from different platforms to interact and perform cooperatively different routines designed by the developer, so it is not limited to the capabilities of just one platform. Moreover, this paper shows the results of the experimental setup showing the precision of inter-platform message exchange and the relationship between the delay of the exchange of inter-platform messages and the number of agents that are simultaneously running on each platform.

## Palabras clave

Marco MAES; sistemas embebidos; tiempo real; agente; interplataforma; I<sup>2</sup>C.

## Resumen

En los últimos años, la ciencia espacial y la exploración se han vuelto más accesibles debido a la popularización del concepto de CubeSats. Los CubeSats se está utilizando debido a sus convenientes requisitos de tamaño y peso, lo que permite que misiones específicas se diseñen, desarrollen y lancen con una reducción significativa de los costos en comparación con las misiones espaciales tradicionales. Además, el desarrollo de misiones específicas se ha vuelto más complejo, forzando un cambio en la noción tradicional de usar una arquitectura de control centralizada para una arquitectura distribuida. Una arquitectura distribuida resuelve el problema de una posible pérdida de funcionalidad en la unidad de control. Este documento describe la extensión de las capacidades del *framework* de sistemas multiagentes para sistemas embebidos (MAES). Esta extensión proporciona al *framework* MAES la capacidad de realizar comunicaciones entre plataformas, de modo que ahora la arquitectura de la unidad de control puede ampliarse, permitiendo a los agentes de diferentes plataformas interactuar y realizar de forma cooperativa diferentes rutinas diseñadas por el desarrollador, por lo que no se está limitado a las capacidades de solo una plataforma. Asimismo, este documento muestra los resultados de la configuración experimental que muestra la precisión del intercambio de mensajes entre plataformas y la relación entre el retraso del intercambio de mensajes entre plataformas y la cantidad de agentes que se ejecutan simultáneamente en cada plataforma.

## Introduction

Space science and exploration have become more accessible in recent years due to the popularization of the concept of CubeSats. Twenty years ago, CubeSats were developed as a concept model that intended to involve universities to participate in space missions [1]. It rapidly caught the attention of researchers, space agencies, governments, and companies because of the specifics on size and weight requirements meant that targeted missions could be designed, developed and launched with a significant reduction of costs. The development of more intricate target missions has forced a shift in the traditional notion of using a centralized control architecture to an architecture that is distributed since once the CubeSat is launched there is no way of providing maintenance to it. Hence, if the control unit is affected, then the entire system may lose functionality. One of the ways the space industry has been doing this shift is using multi-agent systems.

A Multi-Agent System (MAS) can be defined as a dynamic distributed system that envelops autonomous agents/nodes, who cohabit inside a society where they can work individually on a specific task, or they can interact with others and work together towards achieving a common goal [2]. The architecture of MAS is modular, making it scalable, therefore allowing agents to be linearly aggregated. The system as a whole is robust since the architecture allows the system to tolerate failures of one or more agents, as the responsibilities and control are shared between the agents. [3]

According to Coulouris *et al.* [4], the advantages of adopting a distributed architecture are given by the capacity of concurrency program executions, no need of centralized control, scalability, and independent failure, meaning that if a component of the system fails the other ones can still run independently, and they may never notice that another component has failed. As a result, the Multi-Agent Systems Framework for Embedded Systems (MAES) was developed to provide the developer with a tool to implement real-time MAS based applications in embedded environments. This capability is something that the market was lacking, especially for the development of real-time applications in the space industry using distributed architectures.

The design and implementation of the MAES framework were carried out by Chan-Zheng *et al.* [5]. The development started as a result of the need in the science community to have a tool that fills the gap between real-time operating systems and multi-agent systems used for satellite applications. Since MAES is still in the initial stage of development, for it to be released and used by developers in the design of future satellite applications the guidelines given by the Foundation for Intelligent Physical Agents (FIPA) are used. FIPA is a foundation that advocates for the standardization of distributed agent-based applications and services through collaboration with international companies, universities, and the IEEE Computer Society [6] [7].

MAES framework conveniently reduces the time and effort of developers to implement a MAS application because it already implements the services and the primitive communication structure with the intra-platform agents for a highly constraint embedded platform. This paper focuses on the description of the upgrade done to the MAES framework in order to allow for inter-platform communication. Thus, the control unit architecture can be enhanced to allow agents from different platforms to interact and perform cooperatively different routines designed by the developer, so it is not limited to the capabilities of just one platform.

The current state of MAES framework development so far complies with some FIPA specifications, which are the minimum requirements for intra-platform operation (see table 1).

One of the purposes of this work is to add more capabilities to MAES's framework so it can allow communication between an assortment of platforms, all running MAES in a given communication topology.

**Table 1.** Current minimum FIPA specifications implemented on MAES

FIPA component
Agent
Agent Platform
Agent Management Service
Message Transport Service (Intra-platform)

The outline of the paper is as follows. First the article describes the design of the inter-platform design, extending on the communication protocol selection, message strategy selection, and its implementation. Then is described the verification of the operation of inter-platform communication as to observe the implementation's operation. Finally, it draws the main conclusions and discusses future work developments.

### Inter-Platform Protocol Design

This Section presents the design choices for the communication protocol, following the FIPA guidelines for Multi-Agent Systems, which addresses the question: "What is the most efficient architecture that best manages the resources for communication applications in multi-platform systems running MAES?"

#### Communication Protocol Selection.

The communication protocol chosen for the implementation of the inter-platform message transport service of MAES is I<sup>2</sup>C (Inter-Integrated Circuit) because of its usage in previous research related to Cubesats design for the communication between the on-board computer (OBC) and peripheral devices [8] [9]. The small footprint and other advantages of I<sup>2</sup>C have contributed to its popularity that, in turn, has driven most microcontroller manufacturers to include I<sup>2</sup>C among the standard BUS interfaces provided [10].

#### Message Routing Strategy.

In order to extend the communication of agents and give them the ability to communicate between agents outside its platform, the inter-platform messages shall act in compliance with the FIPA specifications. FIPA specifications do not explicitly specify what protocol must be used when inter-platform communication is intended. FIPA specifications mention only how the packet must be composed in term of its contents.

In an abstract form, the message can be expressed in two parts: message envelope and message payload. The message envelope comprises a collection of parameters expressed as a key-value tuple (name/value pair). The envelope must contain at least the *to-from*, *date*, and *acl representation*. The message payload embodies the encoded Agent Communication Language (ACL) message. Therefore, this paper describes the design choices of a static approach.

The static approach begins with the assumption that the sender agent knows to whom it wants to communicate with, much as in other types of communication systems, the recipient is always known, the only thing that both approaches handle is how they deliver the messages. The message packet is comprised by the header (Sender I<sup>2</sup>C address, Receiver I<sup>2</sup>C address, and message type) and the payload (Sender AID, Receiver AID, message type and content).

### *Static Approach*

The static approach works as follows. At start-up, each platform knows the other platforms' ID, which then correlates to their I<sup>2</sup>C addresses, so all platforms have the information of each other before any message exchange is done. Afterward, when the *sender agent* sends a message to a *receiver agent*, the local Message Transport System (MTS) has first to check if the *receiver agent* is local. If it is, it proceeds as it is already implemented by *MAES Framework* on the contrary when the *receiver agent* is not registered to the same platform as the *sender agent* the next step is to search by the agents' AID. The agent AID is a concatenation of the platform's ID and its ID. So, when the search is done in the table previously shared, the MTS takes from the agent AID, the portion of the platform's ID and determines the I<sup>2</sup>C address of the platform. That enables the MTS to compose the data message's header and the payload (Packet), which is sent to the platform where the *receiver agent* is registered.

When the message is received at the destination platform, the MTS looks in the payload for the receiver's *agent AID* and confirms that the agent is registered to the Agent Management Service (AMS). So, if the case occurs where the agent is de-registered (killed) from its AMS, the receiver platform will send a NON-UNDERSTOOD message to the *sender agent*, and that packet is discarded.

The static approach fits best into the CubeSat environment because the setting is contained enough to consider it a small network. The advantage of using the static approach is that it demands less CPU/Memory overhead for storing each *foreign agent's* AID and corresponding I<sup>2</sup>C address of the platform it belongs to and does not add processing time for the inquire of the *foreign agent's* location. Furthermore, there is no bandwidth overhead because updates are not shared between the platforms, thus providing more control over the traffic that is routed.

### Inter-platform Communication Implementation

The hardware that was used for the experimental set-up is the *MSP432P401R SimpleLink Microcontroller LaunchPad*, which uses Texas Instruments proprietary real-time operating system called *TI RTOS SYS/BIOS*. In such operating system applications are organized by a collection of threads, meaning that each application's function is encapsulated in a stream of instructions that are executed by the processor. The real-time operating system supports four different types of threads: Hardware interrupts (Hwi), Software interrupts (Swi), tasks, and the idle thread. *MAES Framework* architecture is based on tasks, as each task have its stack, apart from Hwi and Swi that share the same stack (system stack). This mechanism allows the task to take over a resource, and it makes other tasks wait for the release of the resource (block). Tasks are executed based on their priority level. There are 16 priority levels where level 0 is the lowest priority, and 15 corresponds to the highest priority, while level -1 means that the task is inactive. The priority level is defined by the developer; thus, it gives the developer the flexibility to decide how the tasks are executed.

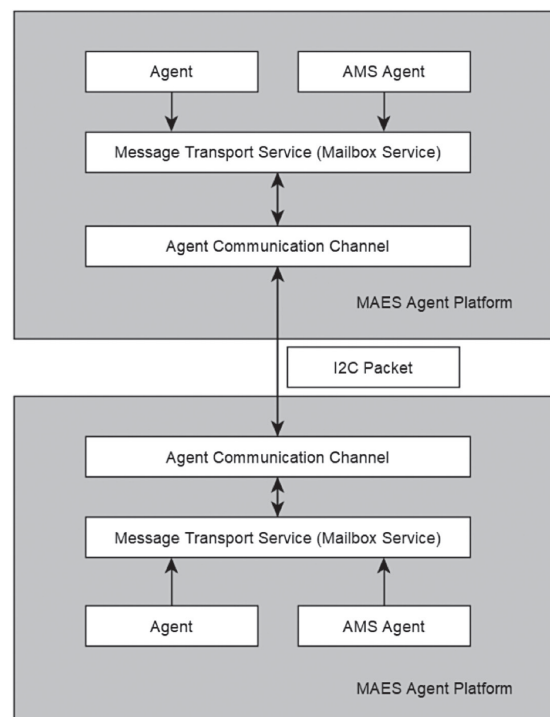
As discussed before, *MAES' framework* architecture is based on tasks, meaning that each agent is equivalent to a single task within the framework. Therefore, the agent that has the highest priority is the one who is going to be running first and can request actions to another agent.

Each interaction between agents is done through the exchange of messages. TI-RTOS has a set of modules that allow tasks to communicate with each other, which are: queues, events, semaphores, and mailboxes. *MAES Framework* MTS is mapped to the usage of mailboxes; each agent has its mailbox, so, for example, a *sender agent* can signal when a message is posted to the *receiver agent* (notifies of an incoming message), for which the *receiver agent's* mailbox prepares to receive the data from the sender.

### Agent Platform and Agent message classes extension

The base version of the *MAES Framework* contains four main classes: *Agent class*, *Agent Message class*, *Agent Platform class*, and *Behaviour-related classes*, as described by Chang-Zheng [5]. Thus, in order to bring out the capabilities of inter-platform agent communication, this section describes the extension of the Agent Message and Agent Platform classes, and it adds the *Communication class* to the already existing MAES library.

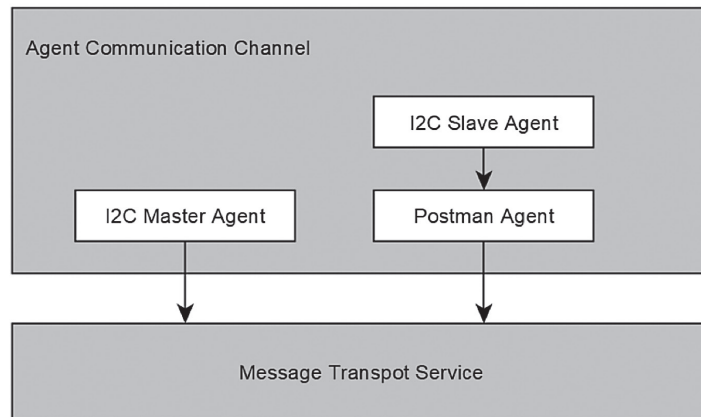
The extension of the *Agent Platform* class includes the methods needed to add the Agent Communication Channel (ACC). The ACC is the service on MAS who is in charge of determining if the messages are local or they need to be encapsulated into the payload of the ACL message to be delivered to a different platform (figure 1). The ACC is where the foreign messages arrive at the platform and where they are de-capsulated to be forwarded to the receiver agent.



**Figure 1.** Block description of the communication method used for MAES inter-platform communication.

On MAES the ACC is mapped as the I<sup>2</sup>C Master, Slave, and Postman agents, see figure 2. These new agents are all initialized like a regular agent when each method runs it creates its unique task and handle (Agent\_AID) and its corresponding mailbox and mailbox handle. Besides, when the intent is to use the inter-platform communication, the developer must know that for this case the agent priority allocation of MAES changes, which means is that the I<sup>2</sup>C Slave agent now becomes the agent with the highest priority. As a result, the incoming messages from the other platforms are addressed as soon as possible, since they are considered as an external interruption that must take precedence over local message addressing. Then, the I<sup>2</sup>C Slave's "Postman," who is the agent that oversees the unpacking of the packets received by the I<sup>2</sup>C Slave, becomes the agent with the second-highest priority. Next, the I<sup>2</sup>C Master agent, who is the agent that proceeds with the encapsulation of the message contents into the I2C Packet, gets the third-highest priority as a result of the possible immediate need to send a response

to an external message that arrived from a *foreign agent*. Lastly, the AMS agent becomes the agent with the fourth highest priority. The remaining *local agents* that are created follow the already established priority description from the base MAES Framework, which is defined by the developer.



**Figure 2.** Block description of the Agent Communication Channel

Regarding the Agent Message class, the extension takes advantage of the polymorphism of the functions, which allows for a member function to act differently according to the type of object that invokes it. This property is used for the *send* function (see figure 3), where depending on the intended recipient, the message is addressed to either the *local agent* or to a *foreign agent*, the distinction lies in how the receiver agent is called. That is an important distinction because when an agent is registered to a platform and therefore becomes a member of the platform's AMS, the agent is given a unique name inside the platform it belongs. That is called the *Agent\_ID*, and it is the name by which the other local agents refer to when they choose to send a message to it. Concerning the inter-platform communication, each agent has what can be called an "Alias" by which agents from different platforms can refer to it. The agent's "Alias" is an unsigned 16-bit integer (*uint16\_t*), that concatenates the eight most significant bits (MSB), the number of the Platform's (*uint8\_t*) identifier, and the eight least significant bits (LSB) the agent's (*uint8\_t*) identifier. The agent identifier is a unique integer from 1 to 62 defined by the developer. This range is a convention defined by the MAES framework, in which the maximum agents a platform can host is 62.

Each Agent Alias represents the global name by which the agent is referred to inside the whole MAES Framework. That means that even if the agent's identifier is the same on more than one platform, there will not be a conflict of Aliases because the identification of the platform ID is the distinction between the Aliases. Also, it is not possible that inside a platform there is more than one agent with the same agent identifier because during compilation an error will be prompted to the user warning that the agent identifier is already being used.

```
class Agent_Msg {
public:
    ERROR_CODE send(Agent_AID aid_receiver,int timeout);//LOCAL
    ERROR_CODE send(uint16_t receiver_name,int timeout);//INTER-PLATFORM
```

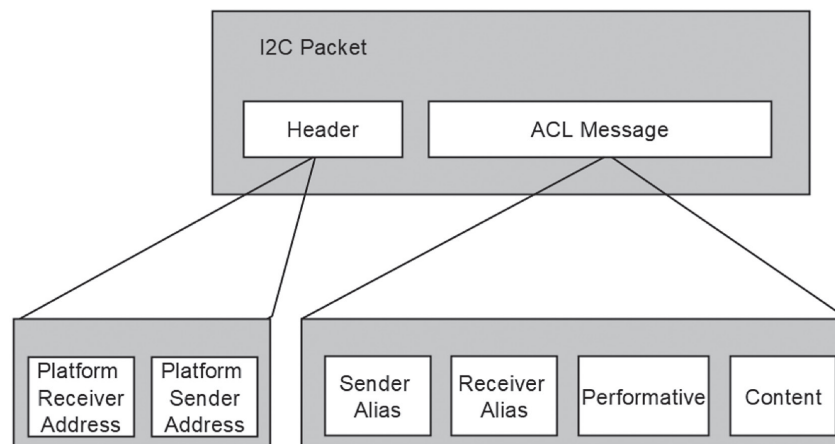
**Figure 3.** Snippet of class Agent\_Msg regarding the send function.

Now, both *send* functions construct the ACL message with the message parameters: *sender*, *receiver*, *performative*, and *content* and post the message to the mailbox of the intended recipient. So, what happens when the intended recipient belongs to another platform? Which mailbox does the message is posted? The answer is that the ACL message is posted into the I<sup>2</sup>C Master's mailbox, which is the agent that takes the recently posted ACL message (which is now considered the payload) and adds the envelope that contains the parameters: *to-from* and *acl-message*, which is described more in detail in the next subsection.

### Agent Communication Channel Class

The Communication class encases the usage of the I<sup>2</sup>C protocol, where each platform can act as an I<sup>2</sup>C Master when a *local agent* chooses to send a message to a *foreign agent*, or act as Slave when an incoming message arrives with the destination of a *local agent*. The Master and Slave each have their task (each of them is an individual agent) and consequently their stack allowing for incoming and outgoing messages to be allocated in different queues. Therefore, there are no conflicts on the utilization of the I<sup>2</sup>C channel, which means that the Master and Slave each use one out of the four *MSP432P401R Launchpad* modules.

After a message about the intention of a *local agent* to communicate with a *foreign agent* is posted in the I<sup>2</sup>C Master's mailbox. The I<sup>2</sup>C Master agent receives the message and proceeds with the encapsulation of the contents into the I<sup>2</sup>C Packet. The ACL message with the *sender Alias*, *receiver Alias*, *performative*, and *content* are added to the payload structure of the packet. Finally, the *Platform receiver address* and, *Platform sender address* are placed in the header structure of the packet, as shown in figure 4.



**Figure 4.** I<sup>2</sup>C Packet encapsulation of the inter-platform message exchange

The I<sup>2</sup>C Master determines the *Platform receiver address* looking at the *receiver Alias* field and correlates the MSB 8bits of the agent's (uint16t) Alias with the table of I<sup>2</sup>C platform addresses that are already registered at start-up. When the 8\_bit I<sup>2</sup>C address is determined, it is placed in the *Platform receiver address* field. The *Platform sender address* parameter is filled by copying the local platform's I<sup>2</sup>C address.

The I<sup>2</sup>C packet refers to a uint8 variable that encapsulates the header and the ACL message, that is passed by value to the I<sup>2</sup>C Master driver API, where a parameter is a uint8 variable previously mentioned. Other filled parameters are the 8\_bit I<sup>2</sup>C receiver address, the packet size and the intention of writing information to the I<sup>2</sup>C Slave of the receiver platform.

During the reception process, the I<sup>2</sup>C Slave agent receives the I<sup>2</sup>C packet and forwards it to the “Postman,” who first checks the *receiver Alias* field and compares the 8 MSB with the platform’s ID to determine that the message is intended for the said platform. Then, the 8 LSB of the *receiver Alias* are compared to find the match. The “Postman” does an inquiry to the platform’s AMS using the *receiver Alias* and asks for the Agent’s\_AID. Once the “Postman” has the Agent’s\_AID, it proceeds to post the ACL message to the newfound *local agent’s* mailbox. After the *local agent* receives the message, it proceeds with the instructions given by the *performative* and *content* of the ACL message that was already defined by MAES intra-platform methods. In case there is no correspondence between the platform address or the agent “Alias,” the “Postman” constructs an I<sup>2</sup>C packet with a message reply to the *sender Alias* with the *performative* NOT\_UNDERSTOOD.

### Multi-Agent System Inter-Platform Communication Implementation and Testing

This section is devoted to the operating performance of the inter-platform communication. For these experiments, three applications are used to show the verification of the inter-platform communication protocol execution, the precision of the message round trip time and the relation between the delay and the number of agents accessing simultaneously to the I<sup>2</sup>C bus.

#### Hardware Setup

The hardware setup used to perform measurements is described in what follows. The Launchpad used is the Texas Instruments MSP432P401R SimpleLink Microcontroller LaunchPad, who features 64KB RAM, 256KB Flash memory, a low power ARM 32-bit Cortex-M4F microcontroller (MCU), up to 48 MHz system clock. Additionally, it has an onboard probe for programming and debugging, two buttons and two LEDs for user interaction, backchannel UART through USB to PC, lastly four I<sup>2</sup>C modules and up to eight SPI modules. [11]

In order to carry out the measurements to verify the behavior of the implementation, two *MSP432P401R Launchpads* were used. They were connected between each other using the pinout described in table 2 for the I<sup>2</sup>C Master and Slave connection. That is because of the need to use two libraries (I2CMaster.h and I2CSlave.h) from Texas Instruments that run with the Real-Time Operating System (RTOS). Here, the bitrate is 100 kb/s, and the value of the two pull-up resistors is 10 kΩ, with a voltage supplied of  $V_{cc}=3.3$  V.

**Table 2.** Pin set-up for one Launchpad

Master Pins	Pull-up resistor	Slave pins
UCB1SDA (P6.5)	10 kΩ	UCB0SDA (P1.6)
UCB1SCL (P6.4)	10 kΩ	UCB0SCL (P1.7)
GND	NONE	GND

#### Inter-platform communication protocol verification

This experiment aims at verifying the implementation of the inter-platform communication protocol. The scenario consists of having an agent from one Launchpad send a message to a *foreign agent* from another Launchpad and expect an answer from the *foreign agent*. All measurements are performed using the Texas Instruments proprietary Code Composer Studio (CCS) version 8.2.0.00007 and the RTOS Analyzer’s Execution Analysis tool, to examine how the agents execute and interact within the MAES Framework.



Therefore, two *MSP432P401R Launchpads* were connected with each other, and the MAES Framework updated library was installed on both of them. In this scenario, the size of the mailboxes for the I<sup>2</sup>C Master and I<sup>2</sup>C Slave is of 3 messages each, and both Launchpads allocate a total of 5 agents that are listed in table 3 for Launchpad 1 and in table 4 for Launchpad 2.

**Table 3.** Agents on Launchpad 1.

Name	Priority
I <sup>2</sup> C Slave_Task	15
Postman_Task	14
I <sup>2</sup> C Master_Task	13
AMS_Task	12
Write_Task	1

**Table 4.** Agents on Launchpad 2.

Name	Priority
I <sup>2</sup> C Slave_Task	15
Postman_Task	14
I <sup>2</sup> C Master_Task	13
AMS_Task	12
Read_Task	1

All measurements were executed using launchpad 1 as reference considering it houses agent “Write” Therefore, the results reported below correspond to Launchpad 1’s viewpoint. First, upon start-up, all the agents are initialized before they can perform any of their tasks. The initialization process takes place in compliance with the design of the MAES framework, which first sets up sequentially the agents from the highest to the lowest priority. This is shown in figure 5, where the I<sup>2</sup>C Slave, the Postman, and the I<sup>2</sup>C Master agents are the ones that initialize first. These are followed by the AMS agent, who then allows agent “Write” to initialize to be ready for operation and, immediately after the agent “Write” sends a message with the *performative: REQUEST* to agent “Read” located on Launchpad 2.

As expected, right after the initialization of all the agents, agent “Write” takes over the execution and composes the ACL message with the *performative: REQUEST*, *sender*, *receiver* and *content* and posts the message to the I<sup>2</sup>C Master’s mailbox, as is shown on mark 1 from figure 6. Mark 2 shows the I<sup>2</sup>C Master preempting agent “write” to receive the message from its mailbox, compose the packet with the header and payload (ACL message) and, initializing the I<sup>2</sup>C channel after it returns execution to agent “write”(mark 3) for it to terminate the routine of message composition and sending. Marks 4 & 5 show the I<sup>2</sup>C Master agent sending the message through the I<sup>2</sup>C bus to Launchpad 2.

Finally, the “idle loop” task, which is part of the TI RTOS, runs when no other task is scheduled to run. For the case shown in figure 7 it runs because it is waiting for the arrival answer message from Launchpad’s agent “Read” (mark 1) after mark 2 shows how the I<sup>2</sup>C Slave executes when

it has received the answer message from Launchpad 2. On mark 3, the Postman takes over execution, where the header of the packet gets read, and the Postman determines that the message is intended for agent “Write” who is registered to the platform’s AMS, so it posts the packet’s payload (ACL message) to agent “Write’s” mailbox. Mark 4 shows agent “Write” executing, meaning it receives the confirmation message from agent “Read” thus marking the end of the send/receive cycle. Afterwards, the cycle starts again for the next message.

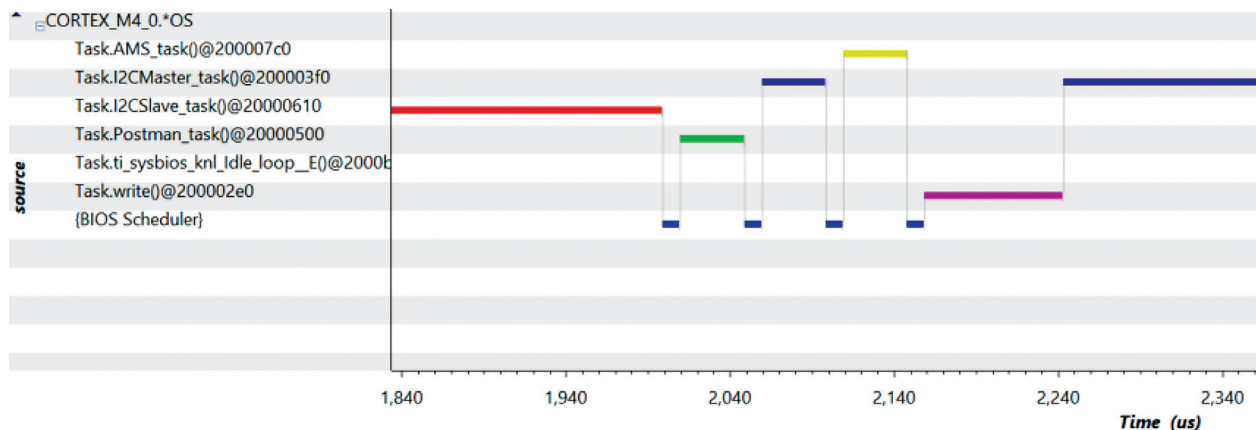


Figure 5. Agent Initialization on Launchpad 1.

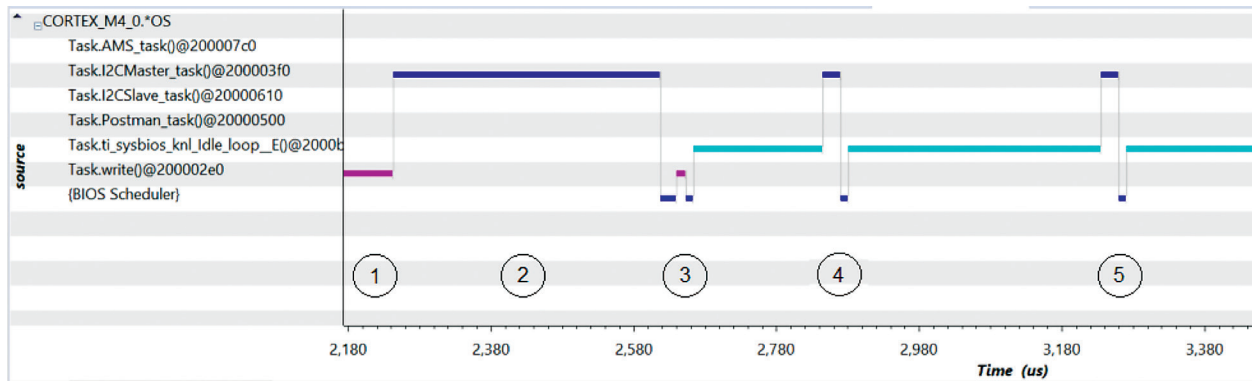


Figure 6. Message trace of a sent message on Launchpad 1.

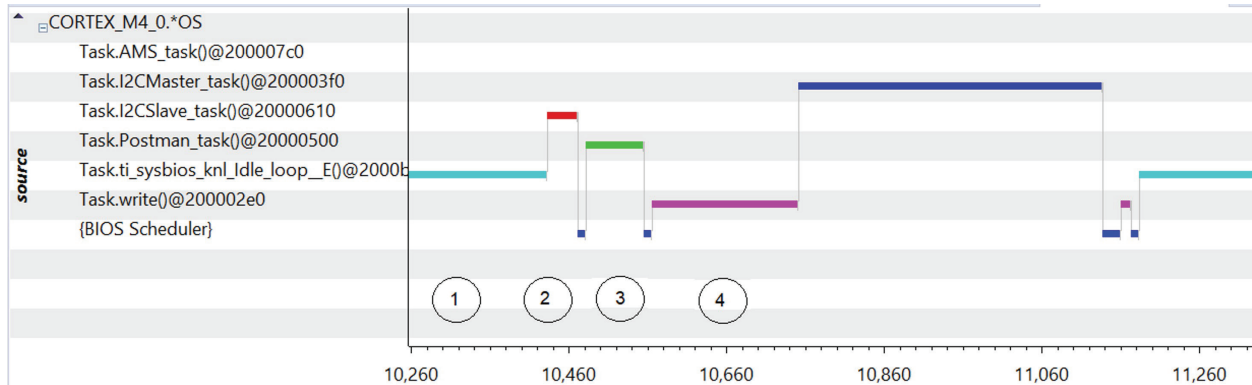
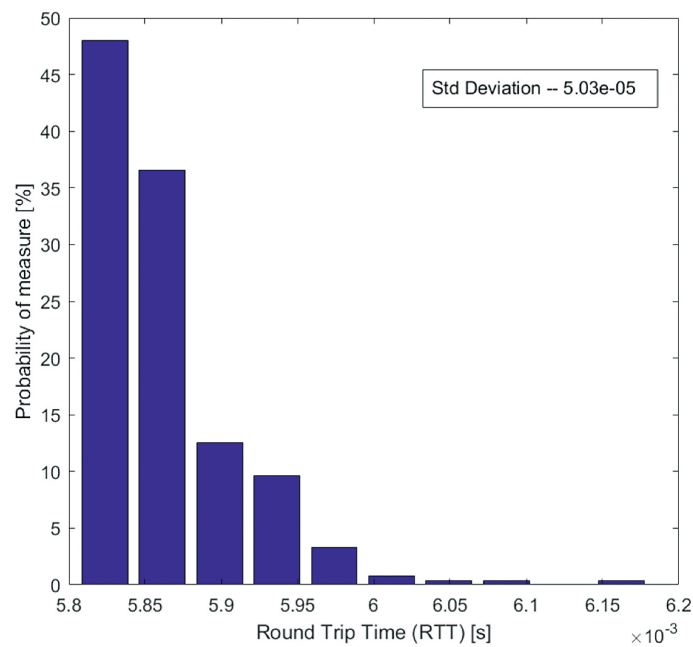


Figure 7. Message trace of a received message on Launchpad 1.

### Precision of the Inter-platform communication protocol

This experiment is intended to determine the precision of the I<sup>2</sup>C bus and MAES Framework while transmitting and receiving inter-platform messages. The scenario is the same as the one described before. A sample of 300 messages was collected, where the time that is taken by agent “Write” to send the request message and to receive the answer from agent “Read” was measured. Figure 8 shows the histogram obtained from measuring the round-trip time (RTT). It can be observed that the probability of having an RTT between 5.82 ms and 5.84 is around 45%, which can be considered as the minimum time an agent has to wait for a response after sending a message to a *foreign agent* when the I<sup>2</sup>C bus is working with perfect conditions.



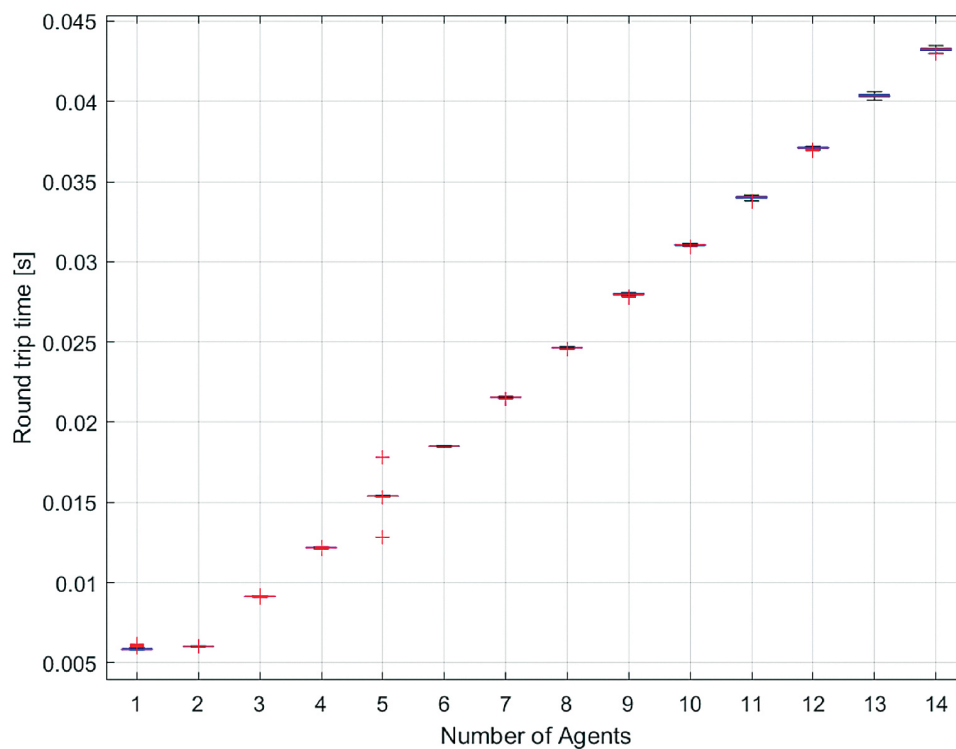
**Figure 8.** Histogram showing the round-trip time of 300 samples sent from Launchpad 1 to Launchpad 2.

### Relationship between the number of agents and the delay

The purpose of this experiment is to determine the effect on the round-trip time on an agent when the number of agents transmitting at the same time on the I<sup>2</sup>C bus increases. To obtain the results, the same setup, was used. This time the number of agents on each Launchpad was increased simultaneously, first starting with one agent (agent “Write” on Launchpad 1 and agent “Read” on Launchpad 2) until reaching 14 agents operating on each Launchpad, counting for a total of 14 trails. On each trial, all agents were triggered to start sending a message with the *performative: REQUEST* at the same time, thus measuring the round-trip time for an agent “Write.” A number of 300 samples were considered for each trial. The measurements are taken from Launchpad 1’s viewpoint. Figure 9 shows a Box Plot, where it can be observed that the precision of the samples holds independently of the number of agents running on the Launchpad, as seen before. Moreover, the Box Plot shows that when the number of agents accessing simultaneously

the I2C bus increases, the round-trip time for the agent “Write” increases as well. This result indicates that the relationship between the number of agents on a Launchpad and the delay increases linearly.

This linear relationship resembles the results obtained for an analysis conducted to characterize the bus performance of satellite missions. In this case, CAN bus was used as the communication channel between the attitude and orbit control subsystem (AOCS), that is based on a multi-agent system application, and a distributed architecture of sensors. According to Carvajal-Godinez [12], the results show that the bus utilization increases linearly, in the function of the number of nodes in the network as long as the bus saturation is not reached. For MAES Framework maximum capacity of the I<sup>2</sup>C was not reached because the Launchpad ran out of RAM. That forced the experiment to be stopped at 14 agents. However, both results coincide on the fact that for Multi-Agent based systems, the delay of the messages hold a linear relationship with the number of agents/nodes for I<sup>2</sup>C and CAN buses, as long as the buses are not working at maximum capacity.



**Figure 9.** Box Plot of the round-trip time of agent “Write” vs. the number of agents running

## Conclusions and Future Work

This paper reports the design of a communication architecture that allows platforms, which are running Multi-Agent framework for Embedded Systems (MAES), the ability for their local agents to communicate with foreign agents thus extending the distributed control architecture that serves as a tool for developers to design embedded real-time applications for future CubeSat target missions.

It was determined that I<sup>2</sup>C fits the design requirements for the implementation of inter-platform communication using MAES framework because of its scalability, ability to arbitrate messages, and its low implementation complexity.

A static message routing strategy was selected for the implementation because the CubeSat setting is contained enough not to demand a complex execution in order to handle inter-platform messages.

The extension of MAES capabilities framework was done by adding the Agent Communication Channel (ACC), who is the service on MAS that is in charge of determining if the messages are local or need them to be encapsulated into the payload of the ACL message and deliver them to a different platform. FIPA's ACC is mapped as the I<sup>2</sup>C Master, Slave and Postman agents. The experiments show that the round-trip time of a message is below 5.84 ms in around 50% of the cases when there is no congestion. Further experiments show that the relationship between the delay of the exchange of inter-platform messages increases linearly with the number of agents that are simultaneously exchanging messages on the I<sup>2</sup>C bus while saturation is not reached.

The inter-platform communication protocol gives the MAES framework extended capacities to perform inter-platform communication. Thus, the control unit architecture can be broadened, allowing agents from different platforms to interact and perform cooperatively routines designed by the developer, so it is not limited to the capabilities of just one platform.

Future work should consider the integration of mobility capabilities into MAES framework, which allows agents to move between platforms promoting a flexible inter-operability to the framework, so it can be arranged as it finds most convenient. Likewise, in future work, there can be an extension of the Communication Class to allow wireless communication technologies to be the channel between platforms. That could give the developer the ability to design its application with more flexibility. Also, the addition of Wireless Communication can provide redundancy based on a unique technology to the inter-platform communication, thus increasing the reliability of MAES Framework.

## References

- [1] M. Swartwout, "The First One Hundred CubeSats A Statistical Look," *Journal of small Satellites*, vol. 2, no. 2, pp. 213-233, 2013.
- [2] P. Maes, "Artificial Life Meets Entertainment: Lifelike Autonomous Agents," *Communications of the AC*, vol. 38, no. 11, pp. 108-114, 1995.
- [3] D. M. Glavic, "Agents and Multi-Agent Systems: A Short Introduction for Power Engineers," Montefiore Institute, 2006. [Online]. Available: [http://www.montefiore.ulg.ac.be/~glavic/MAS-Intro\\_Tech\\_report.pdf](http://www.montefiore.ulg.ac.be/~glavic/MAS-Intro_Tech_report.pdf). [Accessed 19 3 2018].
- [4] G. Coulouris, J. Dollimore, T. Kindberg and G. Blair, *Distributed Systems Concepts and Design*, Addison-Wesley, 2012.
- [5] C. Chan-Zheng and J. Carvajal-Godínez, "A Multi-Agent System Framework for Miniaturized Satellite," *Tecnología en Marcha*, vol. 32, no. 1, pp. 54-67, 2018.
- [6] F. Bellifemine, G. Caire and D. Greenwood, *Developing multi-agent systems with JADE*, John Wiley and Sons, Ltd, 2007.
- [7] F. f. I. P. Agents, "Foundation for Intelligent Physical Agents," FIPA, 2018. [Online]. Available: <http://www.fipa.org/>. [Accessed 19 3 2018].
- [8] J. D. Jensen and D. C. M. Swenson, "Command and Data Handling Subsystem Design for the Ionospheric Observation Nanosatellite Formation (ION-F)," *SSC00*, vol. VII, no. 3, 2002.

- [9] C. Nagarajan, R. G. D'souza, S. Karumuri and K. Kinger, "Desing of a Cubesat Computer Architecture using COTS Hardware for Terrestrial Thermal Imaging," in *2014 IEEE International Conference on Aerospace Electronics and Remote Sensing Technology*, 2014.
- [10] S. Sabri, S. Yuhaniz and K.Kamardin, "Designing a low Cost CubeSat's Command and Data Handling Subsystem kit," *ARPJ Journal of Engineering and Applied Sciences*, vol. 11, no. 10, pp. 6259-6264, 2016.
- [11] Texas Instruments, "MSP432P401R SimpleLink Microcontroller LaunchPad," Texas Instruments, 2018.
- [12] J. Carvajal-Godinez, J. Guo and E. K. A. Gill, "Effects of Saturation for High-Throughput Satellite Buses," in *IEEE Transactions on Aerospace and Electronic Systems*, vol. 56, no. 2, pp. 1014-1025, April 2020, doi: 10.1109/TAES.2019.2940341.
- [13] S. Interiano, "A Communication Protocol Design for Multi-Agent Systems Framework for Embedded Systems (MAES)-based platforms," Politecnico di Milano, Milano,Italy, 2018.

# Uso de vehículos aéreos no tripulados (VANT's) para el monitoreo y manejo de los recursos naturales: una síntesis

## Use of unmanned aerial vehicles (UAVs) for the monitoring and management on natural resources: a synthesis

Mario Guevara-Bonilla<sup>1</sup>, Ana Sofía Meza-Leandro<sup>2</sup>,  
Edwin Antonio Esquivel-Segura<sup>3</sup>, Dagoberto Arias-Aguilar<sup>4</sup>,  
Andrea Tapia-Arenas<sup>5</sup>, Federico Masís-Meléndez<sup>6</sup>

*Fecha de recepción: 16 de agosto de 2019*  
*Fecha de aprobación: 9 de diciembre de 2019*

Guevara-Bonilla, M; Meza-Leandro, A; Esquivel-Seguro, E; Arias-Aguilar, D; Tapia-Arenas, A; Masís-Meléndez, F. Uso de vehículos aéreos no tripulados (VANT's) para el monitoreo y manejo de los recursos naturales: una síntesis. *Tecnología en Marcha*. Vol. 33-4. Octubre-Diciembre 2020. Pág 77-88.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v33i4.4528>

- 1 Escuela de Ingeniería Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: magbo10@icloud.com.  
 <https://orcid.org/0000-0003-3305-9132>
- 2 Instituto Nacional de Aprendizaje. Costa Rica. Correo electrónico: sofy.m29@gmail.com.  
 <https://orcid.org/0000-0002-2894-1115>
- 3 Escuela de Ingeniería Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: eesquivel@itcr.ac.cr.  
 <https://orcid.org/0000-0001-9553-060X>
- 4 Escuela de Ingeniería Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: darias@itcr.ac.cr.  
 <https://orcid.org/0000-0002-3056-9172>
- 5 Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: atapiaarenas@yahoo.com.  
 <https://orcid.org/0000-0002-1853-0910>
- 6 Escuela de Química, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: fmasis@tec.ac.cr.  
 <https://orcid.org/0000-0003-1456-7190>



## Palabras clave

Drones; sensores multiespectrales; América Latina; recursos naturales.

## Resumen

El desarrollo tecnológico de los vehículos aéreos no tripulados, VANT's da acceso a nuevas aplicaciones en múltiples campos de la ciencia y la ingeniería. El uso de sensores remotos, el análisis satelital, la medición de datos en el sitio han sido las principales herramientas empleadas para la monitorización y el estudio de los recursos naturales. Los VANT's son una tecnología de bajo costo capaz de recolectar información de manera rápida y precisa, con alta resolución espacial. El objetivo del presente trabajo fue realizar una revisión de las características principales y las aplicaciones de los vehículos aéreos no tripulados en el manejo de los recursos naturales, principalmente en la región latinoamericana. En este trabajo se describen los tipos de drones existentes, sus ventajas, desventajas y los diferentes tipos de sensores que se pueden adaptar. Además, se revisaron trabajos sobre VANTS realizados en Brasil, Perú y Colombia como una guía para América Latina. Se muestra una serie de posibles arreglos entre VANTS y sensores remotos. Próximamente, estos arreglos tendrán un amplio potencial de incrementar la eficiencia de adquisición de datos, incrementando su aplicabilidad en el campo del estudio de los recursos naturales. El futuro del uso de este tipo de tecnologías parece apuntar a una mayor automatización en la captura de datos, mejoras en el rendimiento de los tiempos de vuelo y sistemas automatizados con algoritmos complejos capaces de ofrecer información en tiempo real.

## Keywords

Drones; multiespectral sensors; LatinAmerica; natural resources.

## Abstract

The technological development of unmanned aerial vehicles (UAVs) has giving access to emerging applications in both fields of science and engineering. Using remote sensors, satellite analysis, on-site data collection, have been key tools so far for the monitoring of natural resources. UAVs is a cost-effective technology that can collect information quickly and accurately with high spatial resolution. The objective of this work was to review the main characteristics and applications of unmanned aerial vehicles in the management of natural resources with a focus on the Latin American region. This work describes types of existing drones, their advantages, disadvantages and the different types of sensors they can merge. Further, works from Brazil, Peru, and Colombia carried out on this subject were revisited as a guide for Latin America. A series of possible arrangements between UAVs and remote sensors is shown. These arrangements have a wide-open potential to increase the efficiency of data acquisition by increasing its applicability in the field of natural resources. An increase in automation of data acquisition, improvements in flight time performance and automated systems with complex algorithms capable of offering real-time information seems to be the forthcoming improvements of this technology.



## Introducción

Durante la historia del desarrollo de la ciencia, la técnica y la tecnología, siempre ha sido evidente la necesidad de incorporar diferentes disciplinas para la generación de nuevos conocimientos. En el campo de los recursos naturales se hace cada vez más importante buscar soluciones a los problemas ambientales, y avanzar hacia la sustentabilidad.

El desarrollo tecnológico permite el uso de herramientas novedosas para acoplar el trabajo de la comunidad científica con el resto de la sociedad. Los profesionales en recursos naturales tienen el reto de ser innovadores y creadores de nuevos modelos, procesos de colaboración, métodos y herramientas de investigación, básica y aplicada, en temas como la agricultura, el manejo forestal, la ganadería y el uso de los recursos como el agua, el suelo y la biodiversidad.

Por mucho tiempo el uso de sensores remotos ha sido una de las principales herramientas tecnológicas para la monitorización de propiedades ambientales y de recursos naturales a partir de imágenes. Sin embargo, a pesar de su gran uso, todavía presenta barreras técnicas como lo son la obtención de información periódica (a nivel de días u horas) en áreas específicas de terreno [1].

Para enfrentar este reto se ha propuesto una alternativa la cual es la utilización de vehículos aéreos no tripulados (VANT's) o drones como se les conoce de forma popular. Los VANT's fueron desarrollados a principios del siglo XX con objetivos militares, sin embargo, no es hasta la última década en donde su utilización ha adquirido un creciente interés y se ha popularizado rápidamente, gracias a sus diferentes tamaños, formas y capacidades de operación, con un amplio espectro de aplicaciones civiles y de investigación [2], [3], mostrando así el gran potencial de este tipo de tecnología para aplicaciones ambientales y de conservación [4].

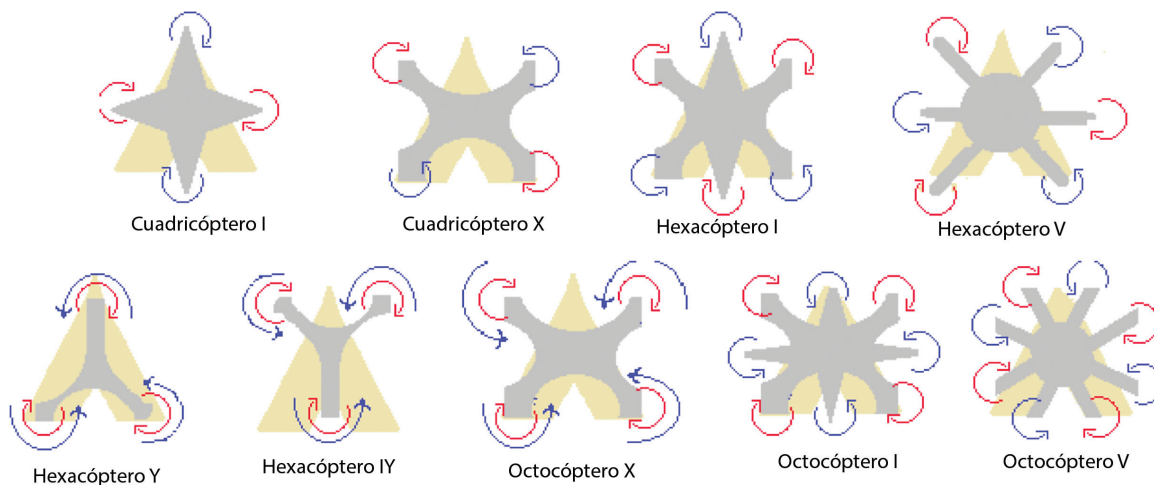
Estas plataformas operan de manera autónoma o mediante control o pilotaje remoto. Este tipo de tecnología puede aportar información muy precisa con alto nivel de detalle y a un precio bajo en comparación con otras tecnologías, por lo que su uso podría provocar un ahorro de tiempo, mano de obra y dinero [4]. Según Aguilar-Salas [5], los costos varían de acuerdo a los distintos modelos de hélices múltiples con rangos de autonomía baja, hasta modelos de ala fija con autonomía mayor, con diferentes capacidades de carga y posibilidades de instalación de sensores y otros componentes con los que estos pueden contar.

Este artículo pretende realizar una revisión acerca de los conceptos y características básicas de los vehículos aéreos no tripulados así como de las principales aplicaciones de los mismos en el manejo de recursos naturales con enfoque en América Latina.

## Vehículos aéreos no tripulados como plataforma de teledetección

### Tipos de drones

Pádua et al [6] mencionan que esta tecnología permite obtener información en múltiples aplicaciones gracias a la amplia gama de equipos existentes, los cuales se pueden clasificar según su tamaño en micro y mini VANT's: de ala fija o multi-rotor, que cuentan con distintas ventajas de implementación en diferentes entornos o tareas específicas. Por su parte, [1] clasificaron los drones en dos categorías de acuerdo con las técnicas de despegue y aterrizaje: los aviones no tripulados de ala fija (aviones) los cuales tienen características de despegue y aterrizaje horizontal, y las aeronaves de rotor o drones de ala giratoria (helicópteros y autogiros) que realizan el despegue y aterrizaje de forma vertical (figura 1). Asimismo, mencionan que los drones de ala fija requieren de una pista para despegar y aterrizar, mientras que los equipos más pequeños pueden hacerlo manualmente o utilizando soportes terrestres.



**Figura 1.** Ejemplos de multirrotores con diferentes tipos de configuración de brazos. Fuente: [1].

### Ventajas y desventajas

[6] reconocen que las nuevas tecnologías mejoran continuamente en términos de resolución espacial, espectral y temporal, sin embargo, cada una de ellas tiene beneficios y limitaciones en cuanto a factores operacionales, tecnológicos y económicos.

Autores como [4], [1], [2], [6] y [7] mencionan que entre las ventajas que presentan los VANT's se encuentran: el proporcionar una alta resolución temporal gracias a la facilidad de repetición de los vuelos, un menor costo operativo para proyectos pequeños, recopilación de datos de alta precisión y buena resolución espacial puesto que al operar a baja altura generan poca interferencia atmosférica y no se ven afectados por la nubosidad, no se presentan riesgos humanos para la tripulación al usar este tipo de tecnología y muestran gran facilidad de uso para operadores no especializados.

En cuanto a las limitaciones, este tipo de tecnología presenta poca cobertura, podría mostrar restricciones de operación debido a las regulaciones de cada país, es sensible a las condiciones ambientales adversas y muestra dificultad para reconstruir o procesar imágenes de áreas muy homogéneas [6]. Adicionalmente los pilotos deben estar capacitados para hacer que el equipo vuele de la mejor manera [8], y existen limitaciones en cuanto al equipo de cómputo requerido para el procesamiento adecuado de las imágenes capturadas [7].

### Sensores que se pueden usar

Existe en el mercado variedad de sensores que pueden ser utilizados en los vuelos para la adquisición de datos, entre ellos se destacan dos tipos de sensores: activos tales como los LIDAR, radio detección y RADAR y por otra parte los sensores pasivos que incluyen cámaras RGB, cámaras de infrarrojo cercano (NIR), cámaras térmicas y sus combinaciones multiespectrales e hiperspectrales [9].

**Sensores RGB:** los sensores de luz visible permiten captar imágenes perceptibles por el ojo humano, además de que los sensores RGB (Red, Green, Blue) utilizados en drones son capaces de capturar imágenes en alta resolución [6]. De acuerdo con [10], el sensor RGB se utiliza para realizar labores de inspección visual, modelos de elevación del terreno y conteo de plantas.

**Sensores infrarrojos:** La radiación infrarroja (IR) se emite desde una fuente de calor y se propaga de manera muy similar a la luz. El espectro infrarrojo cubre longitudes de onda mayores al

espectro de luz visible que abarca de 400 a 800 nm. Por ejemplo el infrarrojo cercano, NIR, entre 780 nm a 2500 nm e infrarrojo lejano, FIR, entre 15  $\mu\text{m}$  a 1000  $\mu\text{m}$ . Los límites entre lo visible y el NIR, en un extremo, y entre el FIR y las microondas no son precisas y están abiertas a diferentes interpretaciones [11] Según [6] la región espectral del NIR representa donde se produce la reflectancia de la planta, siendo así importante para el análisis de la vegetación en las aplicaciones agroforestales, ya que cuando una planta está saludable y en constante crecimiento la producción de energía a partir de la fotosíntesis reflejará más la región del NIR.

El infrarrojo cercano (NIR) se utiliza para detectar propiedades de los suelos de forma remota como el análisis de humedad y estrés por deficiencia de nutrientes [10]. Además, es posible estudiar propiedades más complejas como el área superficial específica [12], el contenido de carbono orgánico [13] y la hidrofobicidad [12].

Sensores multiespectrales e hiperespectrales: [14] menciona que mientras los sensores multiespectrales son capaces de dividir el espectro electromagnético en pocas bandas o porciones espectrales (baja resolución espectral), los sensores hiperespectrales puede registrar cientos de bandas contiguas en diversas dimensiones del espectro electromagnético (alta resolución espectral), permitiendo así obtener mayor nivel de detalle en la curva del comportamiento espectral de gran cantidad de coberturas o elementos de la superficie terrestre para lograr con mayor precisión su identificación.

En el área de los recursos naturales el procesamiento de imágenes hiperespectrales permite estimar la degradación y salinidad de los suelos [14], [15], realizar estudios de patrones espectrales de coberturas y especies vegetales asociados a propiedades fisiológicas [16] y estructurales de las plantas, así como factores ambientales, fenológicos [17] y antropogénicos [18]. Asimismo, permiten obtener mediciones de follaje y cobertura, de fracción de radiación fotosintéticamente activa, empleo de modelos de radiación del dosel vegetal y el cálculo de índices de vegetación; han permitido el desarrollo de índices de propiedades fisiológicas vegetales como vigor, senescencia y estado hídrico, así como la identificación de tipos específicos de coberturas y especies vegetales, plagas y enfermedades, y áreas susceptibles a incendios que no son posibles por medio de imágenes multiespectrales.

Sensores LIDAR (Light Detection and Ranging): Este se trata de un sistema que mide la distancia del sensor a un punto en el terreno a partir del tiempo que tarda el rayo de luz en alcanzar el suelo y regresar al sensor en el VANT, el cual cuenta con la capacidad para obtener una serie de puntos del terreno y sus coordenadas. En el ámbito forestal, los sensores LIDAR se pueden utilizar en áreas de plantaciones para estimar el volumen de madera y el diámetro del tronco y, además, es posible estudiar la estratificación vertical de la vegetación y la biomasa [19].

Sensores especializados: dado que la tecnología de los drones ha estado más accesible, se han llevado a cabo estudios en diferentes áreas donde ha sido posible incorporar sensores especializados. [20] utilizaron sensores especiales para la detección de gases contaminantes en la atmósfera, mientras que [21] también colocaron a bordo sensores especializados para detectar gases presentes durante una actividad eruptiva. También se ha reportado el uso de instrumentos especializados para la toma de datos meteorológicos a bordo de drones [22].

## Aplicaciones de los drones en el monitoreo y manejo de recursos naturales

El uso de este tipo de tecnología ha permitido su aplicación en actividades que van desde las recreativas hasta en investigación. A nivel de recursos naturales se pueden mencionar, entre otras, las siguientes aplicaciones:

## Agricultura

La agricultura de precisión y el uso de los drones en labores agrícolas son cada vez más implementadas por los agricultores. Esto se debe a la gran capacidad con la que cuenta esta tecnología para captar información de los cultivos de manera precisa y sin estar en contacto con ella, permitiéndoles así ayudar en la toma de decisiones. Las imágenes capturadas con los drones permiten realizar gestiones hídricas, fertilización, detección de enfermedades y cosechas selectivas, así como generación de mapas agronómicos que muestran los problemas y avances de los cultivos [23].

El empleo de drones en la agricultura ha permitido realizar modelos tridimensionales del terreno, planificar el establecimiento, la producción y el monitoreo de cultivos, detectar plagas, enfermedades, deficiencias nutricionales [5], así como realizar estimaciones de volumen, crear modelos de irrigación y drenaje, y detectar otros cambios en los cultivos que de otra manera no son visibles para el ojo humano [24]. Austin [11] menciona que los vehículos aéreos no tripulados son utilizados en agricultura para el monitoreo de cultivos, puesto que es posible utilizar cámaras infrarrojas y de color para detectar la aparición de alguna enfermedad a través de cambios en el color en los cultivos. También usados para la siembra y fumigación de cultivos, como por ejemplo en Japón, en donde se utilizan los VANT's para sembrar arroz y fumigar posteriormente el cultivo. Berrío-Meneses *et al.* [10] mencionan que la implementación de los drones se plantea como alternativas de manejo, monitoreo y control de los cultivos agrícolas en diferentes etapas de su desarrollo con el fin de mejorar la producción y disminuir costos.

## Forestal

[5] menciona que en el sector forestal se han logrado observar diversas aplicaciones para el uso de drones como el conteo y medición de árboles, monitoreo del estado de bosques y plantaciones forestales, caracterización del uso de la tierra, estudios de fotointerpretación, identificación de especies, estado fitosanitario de los individuos y evaluación del estrés hídrico de la cobertura vegetal.

Por su parte, [2] encontraron diversos estudios que muestran ejemplos de las aplicaciones de los VANT's para la planificación y manejo forestal sostenible, estudios de dinámica y estructura del bosque, determinación de volumen, mapeo, detección de infestación de plagas, conteo de árboles y determinación de altura del dosel. Además de otras actividades con gran potencial de desarrollo en el futuro con el avance de esta tecnología como lo son la detección de especies en rodales, evaluación de la perturbación de los bosques, identificación de brechas en los claros como indicadores de biodiversidad [25], entre otros.

Koh & Wich [4] en su estudio lograron detectar con el uso de esta tecnología, distintas actividades humanas que afectan los recursos naturales como lo son los incendios forestales y la tala de árboles.

## Desastres naturales

Los drones muestran un gran potencial para la obtención de datos en zonas afectadas por los desastres naturales. De acuerdo con [26], evaluar los daños en situaciones de emergencia como por ejemplo el sismo ocurrido en setiembre del 2017 en Tehuantepec, México, conlleva muchos esfuerzos, costos y tiempo. Es por esto que este tipo de tecnología, al sobrevolar las zonas de difícil acceso, permite obtener información para evaluar los daños en las edificaciones afectadas sin poner en riesgo la vida de quien realice la labor. También es útil para elaborar mapas de zonas de riesgo y rutas para suministrar donativos a los damnificados, y ubicar edificios derrumbados o bloqueos en las carreteras.

Yuan, Liu & Zhang [27] propusieron un método que utiliza imágenes RGB y patrones de movimiento para detectar incendios forestales. Los autores afirman que una combinación de este método con otras técnicas podría disminuir la tasa de falsos positivos. Con este tipo de metodologías se podría detectar focos de incendio incipientes para una rápida atención del mismo, a la vez que puede ofrecer información relevante en la toma de decisiones respecto al manejo y adecuada atención de un siniestro.

### Vida silvestre

En este campo de aplicación, [4] lograron identificar la ubicación actual de los animales para el monitoreo de especies de fauna silvestre con el fin de obtener información que ayude a detallar sobre su comportamiento, distribución, abundancia, hábitat y utilización de los recursos.

Han, Yoo & Kwon [28] utilizaron diferentes modelos de drones para el monitoreo de aves acuáticas y su entorno, estableciendo una metodología diferente en términos del conteo e identificación de aves. En su estudio pudieron determinar alturas de vuelo óptimas para el dron y mejoras en la toma de datos a través de lentes que permitieran un mejor enfoque para facilitar la identificación de las aves. Ivosevic, Han y Kwon [29], llevaron a cabo un estudio similar, pero con mariposas. Ellos utilizaron un dron comercial de bajo costo para el monitoreo de la especie *Libythea celtis*, obteniendo resultados promisorios en el uso de esta tecnología para el monitoreo de fauna.

### Aguas y ríos

Existe un gran potencial de aplicación de este tipo de tecnología para el monitoreo de corredores ribereños para estimar la posible extensión de crecida de los ríos sobre su propio lecho comparando fotografías aéreas del sitio de las estaciones seca y lluviosa [5].

Zhao *et al.* [30] presentan un método innovador que integra el uso de drones y monitoreo en campo para estimar el índice e-flow, utilizado para conocer respecto al manejo sostenible del agua. En dicho estudio se obtuvo estimaciones que demuestran las capacidades del uso de drones para investigación aplicada. Por su parte, [31] desarrollaron una metodología para la detección rápida de los efectos geomorfológicos ante situaciones de inundación mediante el análisis de productos derivados de vuelos con drones.

También se ha utilizado esta tecnología para el monitoreo de la morfología de ríos y la erosión en las riberas [32]. [33] utilizaron diferentes sensores a bordo de un dron para estimar niveles de agua en ríos y lagos, obteniendo resultados satisfactorios; un estudio similar se llevó a cabo en México [34].

### Geología

Desde el punto de vista geológico, el uso de los drones muestra gran variedad de ventajas gracias a que pueden ser utilizados en zonas de difícil acceso y a las distintas tecnologías que se les pueden incorporar, puesto que permite obtener información de afloramientos, cálculo y análisis de parámetros de la superficie terrestre, estudiar las formas del terreno, obtener ortofotografías y modelos digitales de la topografía con alta resolución que son de gran utilidad para conocer los procesos geológicos, entre otras [35].

### Otras actividades

Algunos ganaderos han encontrado utilidad en este tipo de tecnología para el monitoreo y conducción de rebaños, ubicación de ganado y verificación de cercas [11]. Además, administradores pesqueros han visto beneficios en los drones para reducir tiempos y costos en patrullaje, así como método de disuasión y captura de embarcaciones ilegales de pesca en aguas protegidas [24].

Esta tecnología también se ha utilizado para estimar la erosión a través del análisis temporal de Modelos de Elevación Digital generados en vuelos con drones [36]. Obanawa & Hayakawa [37] estudiaron el impacto de las olas del mar versus el de movimientos telúricos sobre acantilados próximos al mar a través del análisis multitemporal de mediciones topográficas a bordo de drones y en tierra, llegando a sugerir que la erosión producto del oleaje es mayor que el provocado por movimientos telúricos.

El uso de drones para llevar a cabo análisis comparativo para el monitoreo en las costas ha demostrado tener un gran potencial a través de la generación de modelos de superficie [38]. Esto ha tenido gran relevancia para conocer el impacto de cambio climático en estas zonas.

### Aplicaciones de VANT's: Ejemplos de aplicación en América Latina

A pesar de que en regiones como Europa o Asia la cantidad de trabajos científicos enfocados en el uso y aplicaciones de los VANT's es extenso y ha sido bien documentado, el desarrollo de aplicaciones en la región de América Latina es incipiente y la mayoría de estudios se concentran en cuatro países: Brasil, Perú, Colombia y Costa Rica. Los estudios científicos realizados hasta el momento se han enfocado principalmente en el campo forestal y agronómico.

En Brasil en el trabajo de [39] en el cual desarrollaron un marco de referencia para poder planificar vuelos de una manera más eficiente con el fin de detectar las áreas donde existen individuos de eucalipto enfermos. El estudio realizado por [40], en dos de los sitios de estudio en Paraná, Brasil, plantación de eucalipto joven y plantación adulta de eucaliptos y pinos, aseguraron haber desarrollado una herramienta que permite detectar automáticamente árboles individuales en conjuntos de datos obtenidos de vehículos aéreos no tripulados (UAV) obteniendo resultados satisfactorios en distintos tipos de bosque. En este estudio también se comprobaron los resultados de esta herramienta en bosque natural.

También en Brasil, se integró el uso de imágenes provenientes de drones y datos de campo para estudiar cómo ha impactado la actividad humana a la biodiversidad en la Amazonía [41]. Otro caso de utilización de VANT's es el descrito por [42], quienes en un cultivo de azúcar analizaron imágenes tomadas por un vehículo aéreo no tripulado con un sistema de reconocimiento de patrones para identificar especies con niveles de infestación bajo, ya que el vuelo con esta tecnología se realiza a baja altura y no se ve afectado por las nubes. Ellos mencionan algunos factores que afectan la productividad de azúcar tiene como lo son la presencia y tipo de maleza, la extensión del terreno, tipo de herbicidas y la dosificación de los productos fitosanitarios.

Algunas comunidades indígenas de Panamá han usado la tecnología de los drones para la protección y conservación de los recursos naturales documentando la ocupación y conversión de las zonas boscosas y la tala ilegal mediante el monitoreo de las tierras en territorios indígenas [43].

Berrío-Meneses *et al.* [10] enfocaron su estudio en el uso de drones como una herramienta de planificación en agricultura de precisión para el diagnóstico temprano de problemas fisiológicos en el desarrollo del cultivo de papa en Cundinamarca, Colombia. Evaluaron los problemas que se presentan en el desarrollo del cultivo mediante la utilización de VANT's y su respuesta espectral en imágenes de infrarrojo cercano (NIR). Esta respuesta permitió identificar características específicas de la vegetación, desarrollo y problemas en el cultivo, por lo que consideraron a los drones como una herramienta tecnológica alternativa para pequeños y grandes agricultores que permite identificar problemas y tomar medidas para optimizar el desarrollo de sistemas productivos.

En Colombia [20] realizaron un estudio sobre contaminantes atmosféricos utilizando sensores a bordo de un dron. Encontraron información interesante sobre las diferencias en concentración de gases a diferentes altitudes (Cárdenas et al, 2018). A pesar de que el estudio se hizo de manera puntual, promete ser una metodología replicable para estudiar la concentración de gases de efecto invernadero en la tropósfera.

También en Colombia se llevó a cabo un estudio en el cultivo del arroz, donde se pudo combinar imágenes de alta resolución espacial de una cámara RGB con información multiespectral de baja resolución espacial con el fin de identificar malezas [44]. La metodología empleada para poder combinar la información de ambas cámaras permitió una mejor detección de las áreas afectadas por la maleza en este cultivo (Barrero & Perdomo, 2018).

Baena *et al.* [41] mencionan un proyecto que se llevó a cabo al norte de Perú enfocado a la conservación de bosques de *Prosopis pallida*. Las imágenes multiespectrales, captadas a través de drones, ofreció la información necesaria para enfocar los esfuerzos de restauración ya que se pudo hacer un análisis espacial de distribución y abundancia de individuos en el área de estudio.

Al sur de Perú un análisis de imágenes de alta resolución de drones ayudó a establecer una red para la protección de relictos de bosque importantes para mantener la disponibilidad de material genético para la restauración [41]. El uso de las imágenes proveyó información referente a la identificación y cuantificación de árboles madre y su salud .

También en Perú, [22] llevaron a cabo un estudio donde se desarrolló un modelo de dron para el monitoreo de temperatura, viento y turbulencia en la capa atmosférica baja (entre 0 y 1300 msnm). En dicho estudio se pudo obtener información precisa para poder plantear de modo general algunos aspectos relevantes sobre el comportamiento de esas variables atmosféricas en la zona de estudio [22]. Quizás las conclusiones más relevantes de este estudio residen en el hecho de saber que se puede obtener información precisa y de calidad a través de una monitorización continua con un dron de bajo costo.

En México, [34] llevaron a cabo un estudio en el cual se pudo obtener datos de la profundidad del agua y mediciones de batimetría a través de información proveniente de drones. Permitiendo así, conocer el comportamiento de las lagunas y cenotes conectados a través de cavernas sumergidas y flujo difuso en la Península de Yucatán.

En Costa Rica el uso de vehículos aéreos no tripulados se ha enfocado en mejorar procesos productivos en los campos agrícola y forestal. Los esfuerzos encontrados son a nivel experimental y son enfocados en los siguientes aspectos:

- a) Uso de la tierra, monitoreo de actividades y cálculo de áreas: A partir de VANT´s se ha obtenido información precisa a partir de sensores especializados y se ha integrado al sistema de monitoreo en tierra [21].
- b) Conteo de árboles: A partir de las imágenes realizadas y de la creación de nubes de puntos se desarrolló un algoritmo que permite el conteo de árboles en plantaciones recién establecidas. Esta herramienta fue desarrollada en conjunto con las escuelas de Ingeniería Forestal, Electrónica y Computadores y permitiría realizar muestreos para determinar la mortalidad inicial en el establecimiento de plantaciones cubriendo mayores áreas de forma más rápida (figura 2).



**Figura 2.** Conteo de árboles de Melina de 5 meses de edad por medio de una interpretación algorítmica de una ortofoto tomada con un dron Mavic Pro, Los Chiles, Costa Rica.

- c) Estimación de alturas: A partir del modelo digital de superficie y del modelo digital de elevación, se puede generar un modelo de altura del dosel que permite estimar las alturas de los árboles.
- d) Cuantificación de la erosión: Arriola *et al.* [45] desarrollaron una metodología que posibilita la cuantificación de erosión a partir de una base de datos de modelos de elevación digital con alta resolución espacial y temporal.

## Conclusiones

En este artículo presentamos las características principales, las ventajas y desventajas de utilizar vehículos aéreos no tripulados para el monitoreo y manejo de los recursos naturales. La aplicación de esta tecnología en el manejo de los recursos naturales se ha extendido debido al bajo costo del equipo, su fácil manejo y su versatilidad. Los drones tienen un amplio potencial de incrementar la eficiencia de adquisición de datos para el uso en las distintas aplicaciones en el campo de los recursos naturales, sin embargo, se debe investigar aún más puesto que muchos estudios se encuentran en fase experimental.

Serán cada vez más los ejemplos y la investigación aplicada en los diferentes campos del manejo de los recursos naturales a medida que la tecnología se vaya desarrollando y esté disponible a mayor cantidad de personas.

El futuro del uso de este tipo de tecnologías parece apuntar a una mayor automatización en la captura de datos, mejoras en el rendimiento de los tiempos de vuelo y sistemas automatizados con algoritmos complejos capaces de ofrecer información en tiempo real.

## Referencias

- [1] L. Tang y G. Shao, «Drone remote sensing for forestry research,» *Journal of Forestry Research*, 2015.
- [2] T. Banu, G. Borlea y C. Banu, «The use of drones in Forestry,» *Journal of Environmental Science and Engineering*, pp. 557-562, 2016.
- [3] I. Colomina y P. Molina, «Unmanned aerial systems for photogrammetry and remote sensing: A review,» *Journal of photogrammetry and remote sensing*, n° 92, pp. 79-97, 2014.
- [4] L. Koh y S. Wich, «Dawn of drone ecology: low-cost autonomous aerial vehicles for conservation,» *Tropical Conservation Science*, vol. II, n° 5, pp. 121-132, 2012.



- [5] L. Aguilar, «Evaluación de bosques tropicales mediante el uso de tecnología VANT,» *Revista Germinar*, n° 19, pp. 14-15, 2016.
- [6] L. Pádua, J. Vanko, J. Hruska, T. Adao, S. JJ, E. Peres y R. Morais, «UAS, sensors and data processing in agroforestry: a review towards practical applications,» *International Journal of Remote Sensing*, n° 38, pp. 2349-2392, 2017.
- [7] S. Arriola-Valverde, A. Ferenz-Appel y R. Rimolo-Donadio, «Fotogrametría terrestre con sistemas aéreos autónomos no tripulados,» *InvestigaTEC*, n° 31, pp. 09-12, 2018.
- [8] A. Méndez, J. Vélez, F. Scaramuzza y D. Villaroel, «Los drones como herramienta para el monitoreo de cultivos,» *Revista de la bolsa de comercio de Rosario*, n° 1524, pp. 6-10, 2015.
- [9] J. Richards y X. Jia, *Remote Sensing Digital Image Analysis*, Springer, 2006.
- [10] V. Berrío-Meneses, J. Mosquera y D. Alzate, «Uso de drones para el análisis de imágenes multispectrales en agricultura de precisión,» *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, n° 13, pp. 28-40, 2015.
- [11] R. Austin, *Unmanned aircraft systems: UAVS design, development and deployment*, United Kingdom, 2010.
- [12] M. Knadel, F. Masis-Meléndez, L. Wollensen de Jonge, P. Moldrup, E. Arthur y M. Humlekrog Greve, «Assesing soil water repellency of a sandy field with visible near infrared spectroscopy,» *Journal of near infrared spectroscopy*, n° 24, pp. 215-224, December 2015.
- [13] M. Seidel, C. Hutengs, B. Ludwig, T.-B. Soren y M. Vohland, «Strategies for the efficient estimation of soil organic carbon at the field sclae with vis-NIR spectroscopy: Spectral libraries and spiking vs. local calibrations,» *Geoderma*, n° 354, pp. 1-13, 2019.
- [14] M. Peña, «Sensores hiperespectrales: Los últimos avances en teledetección,» *Ecoamerica*, vol. 7, n° 66-70, 2007.
- [15] J. Hu, J. Peng, Y. Zhou, D. Xu, R. Zhao, Q. Jiang y T. Fu, «Quantitative estimation of soil salinity using UAV-borne hyperspectral and satellite multispectral images,» *Remote Sensing*, vol. 11, n° 7, 2019.
- [16] G. Blackburn, «Hyperspectral remote sensing of plant pigments,» *Journal of experimental botany*, vol. 58, n° 4, pp. 855-867, 2007.
- [17] B. Cole, J. Mcmorrow y M. Evans, «Spectral monitoring of moorland plant phenology to identify a temporal window for hyperspectral remote sensing of peatland,» *ISPRS Journal of photogrammetry and remote sensing*, vol. 90, pp. 49-58, 2014.
- [18] A. Maliki, G. Owens y D. Bruce, «Capabilities of remote sensing hyperspectral images for the detection of lead contamination: a review,» *ISPRS Annals of the photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences*, vol. I, n° 7, pp. 55-60, 2012.
- [19] E. Orfanó Figuereido, M. V. Neves d'Oliveira, E. Muñoz Braz, D. d. A. Papa y P. Fearnside, «LIDAR-based estimation of bole biomass for precision management of an Amazon forest: Comparisons of ground-based and remotely sensed estimates,» *Remote Sensing of Environment*, vol. 187, pp. 281-293, 2016.
- [20] A. Cárdenas, L. Rivera, B. Gómez, G. Valencia, H. Acosta y J. Correa, «Short communication: Pollution-and-greenhouse gases measurement system,» *Measurement*, vol. 129, pp. 565-568, 2018.
- [21] J. A. Díaz, D. Pieri, K. Wright, P. Sorensen, R. Kline-Shoder, R. Arkin, M. Fladeland, G. B. M. F. Bland, C. Ramírez, E. Corrales, A. Alan, O. Alegría y D. Díaz, «Unmanned aerial mass spectrometer system for in-situ volcanic plume analysis,» *Journal of The American society for Mass Spectrometry*, vol. 26, n° 2, pp. 292-304, 2015.
- [22] B. Balsley, D. Lawrence, R. Woodman y D. Fritts, «Fine-scale characteristics of temperature, wind, and turbulence in the lower atmosphere (0-1300 m) over the south Peruvian coast.,» *Boundary-Layer Meteorology*, vol. 147, n° 1, pp. 165-178, 2013.
- [23] A. González, G. Amarillo, M. Amarillo y F. Sarmiento, «Drones aplicados a la agricultura de precisión,» *Revista especializada en Ingeniería*, vol. 10, pp. 23-27, 2017.
- [24] F. Greenwood, «Drones en el horizonte: la nueva frontera de la innovación agrícola,» *ICT update*, n° 82, pp. 2-4, 2016.
- [25] L. Tang y G. Shao, «Drone remote sensing for forestry research and practices,» *Journal of Forestry Research*, vol. 26, n° 4, pp. 791-797, 2015.
- [26] S. George, G. Reyes, D. Rondón, A. Huechacona, P. Moctezuma y S. Proust, «Mapeando el desastre: Uso de drones para la ubicación y evaluación de daño después de un sismo de alta magnitud en el sureste de México,» *Desde el Herbario CICY*, n° 9, pp. 222-227, 2017.

- [27] C. Yuan, Z. Liu y Y. Zhang, «Aerial images-based forest fire detection for firefighting using optical remote sensing techniques and unmanned aerial vehicle,» *Journal of Intelligent and Robotic Systems*, vol. 88, pp. 635-654, 2017.
- [28] Y.-G. Han, S. H. Yoo y O. Kwon, «Possibility of applying unmanned aerial vehicle (UAV) and mapping software for the monitoring of waterbirds and their habitats,» *Journal of Ecology and Environment*, vol. 41, pp. 21-27, 2017.
- [29] B. Ivosevic, Y.-G. Han, S. H. Yoo y O. Kwon, «Monitoring butterflies with an unmanned aerial vehicle: current possibilities and future potentials,» *Journal of Ecology and Environment*, vol. 41, pp. 12-21, 2017.
- [30] C. Zhao, C. Zhang, S. Yang, C. Liu, H. Xiang, Y. Sun, Z. Yang, Y. Zhang, X. Yu, N. Shao y Q. Yu, «Calculating e-flow using UAV and ground monitoring,» *Journal of Hydrology*, vol. 552, pp. 351-365, 2017.
- [31] K. Langhammer y T. Vacková, «Detection and mapping of the geomorphic effects of flooding using UAV photogrammetry,» *Pure and Applied Geophysics*, vol. 175, n.º 9, pp. 3223-3245, 2018.
- [32] S. Hemmeler, W. Marra, H. Markies y S. De Jong, «Monitoring river morphology and bank erosion using UAV imagery- A case study of the river Buech, Hautes-Alpes, France,» *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, vol. 73, pp. 428-437, 2018.
- [33] F. Bandini, J. Jakobsen, D. Olesen, J. A. Reyna-Gutierrez y P. Bauer-Gottwein, «Measuring water level in rivers and lakes from lightweight Unmanned Aerial Vehicles,» *Journal of Hydrology*, vol. 548, pp. 237-250, 2017.
- [34] F. Bandini, A. López-Tamayo, G. Merediz-Alonso, D. Olesen, J. Jakobsen, S. Wang, M. García y P. Bauer-Gottwein, «Unmanned aerial vehicle observations of water surfaces elevation and bathymetry in the cenotes and lagoons of the Yucatán Peninsula, Mexico,» *Hydrology Journal*, vol. 26, n.º 7, pp. 2213-2228, 2018.
- [35] J. Fernández-Lozano y G. Gutiérrez-Alonso, «Aplicaciones geológicas de los drones,» *Revista de la Sociedad Geológica de España*, vol. 29, n.º 1, pp. 89-105, 2016.
- [36] N. Pineux, J. Lisein, G. Swerts, C. Bielders, P. Lejeune, G. Colinet y A. Degre, «Can DEM time series produced by UAV be used to quantify diffuse erosion in an agricultural watershed?,» *Geomorphology*, vol. 280, pp. 122-136, 2017.
- [37] H. Obanawa y Y. Hayakawa, «Variations in volumetric erosion rates of bedrock cliffs on a small inaccessible coastal island determined using measurements by an unmanned aerial vehicle with structure-from-motion and terrestrial laser scanning,» *Progress in Earth and Planetary Science*, vol. 5, n.º 1, pp. 33-42, 2018.
- [38] A. Clark, «Small unmanned aerial systems comparative analysis for the application to coastal erosion monitoring,» *GeoResJ*, vol. 13, pp. 175-185, 2017.
- [39] K. Vivaldini, T. Martinelli, V. Guizilini, J. Souza, M. Oliveira y F. Ramos, «UAV route planning for active disease classification,» *Autonomous robots*, vol. 43, n.º 5, pp. 1137-1153, 2019.
- [40] A. Klein-Hentz, A. Dalla Corte, S. Péllico, M. Strager y E. Schoeninger, «Tree detection: automatic tree detection using UAV-based data,» *Floresta*, vol. 48, n.º 3, pp. 393-402, 2018.
- [41] S. Baena, D. Soyed y J. Moat, «UAV's pursuit of plant conservation-real world experiences,» *Ecological informatics*, vol. 47, pp. 2-9, 2018.
- [42] I. Yano, J. Alvez, W. Santiago y B. Mederos, «Identification of weeds in sugarcane fields through images taken by UAV and Random Forest classifier,» *IFAC-PapersOnline*, vol. 49, n.º 16, pp. 415-420, 2016.
- [43] N. Tushev, T. Bewick y C. Ellis, «Documentando la ocupación ilegal de tierras desde el aire,» *ICT Update*, vol. 82, pp. 16-17, 2016.
- [44] O. Barrero y S. Perdomo, «RGB and multispectral UAV image fusion for Graminae weed detection in rice fields,» *Precision Agriculture*, vol. 19, n.º 5, pp. 809-822, 2018.
- [45] S. Arriola, K. Villagra, M. Méndez-Morales, N. Gómez, S.-Q. Milton y R. Rímolo-Donadío, «Desarrollo y validación de una metodología para la cuantificación de la erosión hídrica a través de fotogrametría UAS,» *Tecnología en Marcha*, vol. 32, pp. 43-52, 2019.

# Efecto de la aplicación foliar suplementaria de calcio sobre la producción de melón (*Cucumis melo L.*)

## Effect of the supplementary foliar application of calcium on melon (*Cucumis melo L.*) production

José Eladio Monge-Pérez<sup>1</sup>, Michelle Loría-Coto<sup>2</sup>

---

*Fecha de recepción: 18 de agosto de 2019*  
*Fecha de aprobación: 2 de diciembre de 2019*

Monge-Pérez, J; Loría-Coto, M. Efecto de la aplicación foliar suplementaria de calcio sobre la producción de melón (*Cucumis melo L.*). *Tecnología en Marcha*. Vol. 33-4. Octubre-Diciembre 2020. Pág 89-102.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v33i4.4556>



- 1 Ingeniero agrónomo. Docente de Sede de Guanacaste, e Investigador de Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno, Universidad de Costa Rica, Costa Rica. Correo electrónico: melonescr@yahoo.com.mx.
- 2 Economista agrícola. Docente e Investigadora de la Escuela de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Estatal a Distancia, Costa Rica. Correo electrónico: michelle\_loria@yahoo.com.

## Palabras clave

*Cucumis melo*; melón; peso del fruto; °Brix, firmeza de la pulpa del fruto; rendimiento; calidad; *Pseudoperonospora cubensis*.

## Resumen

Se evaluó el efecto de la aplicación foliar suplementaria de calcio, sobre la producción de melón Amarillo cv. Natal F-1, en Lepanto, Puntarenas. Los tratamientos evaluados fueron: JMX-Ca (4,22 kg CaO/ha), JMX-Ca (2,41 kg CaO/ha), Manvert-Ca (4,22 kg CaO/ha), y un testigo (agua). La cosecha inició a los 58 días después del trasplante (ddt) para todos los tratamientos. Los datos muestran una importante variabilidad entre los tratamientos en cuanto al número de frutos exportables por metro lineal (1,79 – 2,06), rendimiento exportable (13638 – 16126 kg/ha), producción exportable (1318 – 1556 cajas/ha), peso promedio del fruto (1364,3 – 1433,0 g), porcentaje de sólidos solubles totales (10,90 – 11,88 °Brix), firmeza de la pulpa del fruto (26,94 – 28,38 N), severidad máxima de mildiú veloso (*Pseudoperonospora cubensis*) a los 50 ddt (3,83 – 4,17; escala 1-5), e incidencia de colapso de la planta a los 58 ddt (0 – 1,85 %). Solamente se presentaron diferencias significativas entre tratamientos para el porcentaje de sólidos solubles totales; el tratamiento de JMX-Ca a 4,22 kg CaO/ha obtuvo un mayor valor para esta característica (11,88 °Brix) en comparación a JMX-Ca a 2,41 kg CaO/ha y a Manvert-Ca a 4,22 kg CaO/ha (entre 10,90 y 11,15 °Brix), pero no fue diferente del testigo (11,45 °Brix). Se concluye que, bajo las condiciones en que se desarrolló el ensayo, no se justifica económicamente la aplicación foliar suplementaria de calcio.

## Keywords

*Cucumis melo*; melon; fruit weight; °Brix; fruit flesh firmness; yield; quality; *Pseudoperonospora cubensis*.

## Abstract

The effect of supplementary foliar application of calcium on production of Amarillo type melon cv. Natal F-1, was evaluated in Lepanto, Puntarenas. Evaluated treatments were: JMX-Ca (4,22 kg CaO/ha), JMX-Ca (2,41 kg CaO/ha), Manvert-Ca (4,22 kg CaO/ha), and control (water). The harvest started 58 days after transplant (dat) for all treatments. Data show an important variability among treatments with respect to number of exportable fruits per linear meter (1,79 – 2,06), exportable yield (13638 – 16126 kg/ha), exportable production (1318 – 1556 boxes/ha), mean fruit weight (1364,3 – 1433,0 g), percentage of total soluble solids (10,90 – 11,88 °Brix), fruit flesh firmness (26,94 – 28,38 N), maximum downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) severity at 50 dat (3,83 – 4,17; 1-5 scale), and plant collapse incidence at 58 dat (0 – 1,85 %). Differences between treatments were significant only for the percentage of total soluble solids; JMX-Ca at 4,22 kg CaO/ha rendered the highest value for this characteristic (11,88 °Brix) compared to JMX-Ca at 2,41 kg CaO/ha and Manvert-Ca at 4,22 kg CaO/ha (10,90 and 11,15 °Brix). But the difference was not significant compared to the control treatment (11,45 °Brix). In conclusion, there is no economical justification for the supplementary foliar application of calcium under the growing conditions of the trial.

## Introducción

En 2011, el melón (*Cucumis melo* L.) fue el quinto producto agrícola de exportación de Costa Rica (2,8 % del total), luego de banano, piña, café oro y plantas ornamentales, y generó divisas por un total de 66,9 millones de dólares. Los principales tipos de melón producidos en Costa Rica para la exportación son: Harper, Cantaloupe, Amarillo, Honey Dew, Galia, Piel de Sapo, Charentais, y Orange Flesh [1]. En el caso del melón Amarillo, en 2012 se cultivaban 2109 ha, lo que representó un 46 % del área cultivada de melón en el país; el principal mercado para este tipo de melón es Europa [2].

El melón es un cultivo de ciclo corto, que requiere una aplicación intensiva de insumos para el logro de rendimientos altos. Además, por tratarse principalmente de un cultivo de exportación en Costa Rica, es muy importante lograr la producción de fruta de alta calidad, que satisfaga los estándares de los mercados extranjeros.

El melón demanda una cantidad importante de nutrientes; se ha estimado que una hectárea de este cultivo consume en total 114 kg de calcio (Ca), 97 kg de potasio (K), 83 kg de nitrógeno (N), 24 kg de magnesio (Mg), y 15 kg de fósforo (P). En el caso del calcio, la cantidad consumida de dicho elemento por este cultivo es muy alta, así como la desproporción entre la cantidad que requiere la parte vegetativa (90 %) y la que consume el fruto (10 %). Sin embargo, como el calcio es un elemento que no se transloca en modo alguno, los aproximadamente 10 kg/ha que requieren los frutos deben ingresar en los últimos 20 días de llenado de fruto, y además, es muy importante que lo hagan [3]. Para lograr este cometido, una de las principales herramientas que tiene a disposición el agricultor es la aplicación foliar de este elemento, especialmente en forma de quelatos [4].

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación foliar suplementaria de calcio, sobre el rendimiento y la calidad en el cultivo de melón.

## Materiales y métodos

El ensayo se realizó en una finca ubicada en Lepanto, Puntarenas, administrada por la empresa M y M Internacional S. A., la cual se dedicaba a la producción y exportación de melón y sandía a Europa. El ensayo se ubicó en el lote 6-1 de dicha finca; el trasplante se realizó el día 27 de diciembre de 2015, con plántulas del híbrido de melón amarillo (*Cucumis melo* L.), cv. Natal F-1.

El cultivo se sembró en camas de 1,0 m de ancho, cubiertas con plástico. La distancia entre hileras fue de 1,8 m, y la distancia entre plantas fue de 0,3 m, por lo que la densidad de siembra correspondió a 18519 plantas por hectárea.

La fertilización implementada normalmente por la finca consiste en la aplicación de fertilizante granulado al momento de la siembra, junto con el aporte de fertilizantes solubles vía fertirriego a lo largo del ciclo del cultivo. Además, en forma complementaria, se realizan aplicaciones foliares de fertilizantes. La fuente de calcio empleada a nivel foliar por la finca corresponde al fertilizante líquido Amino Grow Calcio, que contiene 7 % p/v de CaO; 4,3 % p/v de N; 1,41 % p/v de aminoácidos, así como reguladores de crecimiento (auxinas, giberelinas y citoquininas); se hicieron 5 aplicaciones de este producto, a lo largo del ciclo del cultivo.

En forma suplementaria (adicional a los fertilizantes aplicados normalmente por la finca), para el presente ensayo se aplicaron los siguientes fertilizantes foliares:

- 1) JMX-Ca: fertilizante foliar sólido, en presentación de polvo muy fino, color blanco, y cuya composición es: 40,2 % p/p de CaO; 2440 ppm de MgO; 190 ppm de Fe; y 240 ppm de Si.

- 2) Manvert-Ca: fertilizante foliar líquido, de color café oscuro, y cuya composición es: 20,2% p/v de CaO; el agente acomplejante es ácido lignosulfónico.

Los tratamientos, aplicados en forma suplementaria al programa de fertilización normal de la finca, se muestran en el cuadro 1.

**Cuadro 1.** Tratamientos aplicados en el ensayo.

Tratamiento				Fechas de aplicación (ddt*)
Número	Fertilizante	Dosis de CaO (kg/ha)	Dosis del fertilizante	
1	Testigo (agua)	0	0	12; 26; 40; 50
2	JMX-Ca	4,22	10,5 kg/ha	12; 26; 40; 50
3	JMX-Ca	2,41	6,0 kg/ha	26; 40
4	Manvert-Ca	4,22	20,89 l/ha	12; 26; 40; 50

Nota: \* = días después de trasplante.

Todos los tratamientos se hicieron mediante aspersion foliar. El tratamiento 1 (testigo) consistió en la aplicación de agua limpia. En el tratamiento 2 se realizaron cuatro aplicaciones del fertilizante JMX-Ca; la dosis de la primera aplicación fue de 1,5 kg/ha, y la dosis de las otras tres aplicaciones fue de 3,0 kg/ha cada una. En el tratamiento 3 se hicieron dos aplicaciones de JMX-Ca, a una dosis de 3,0 kg/ha cada una. En el tratamiento 4 se realizaron cuatro aplicaciones del fertilizante Manvert-Ca; la dosis de la primera aplicación fue de 2,98 l/ha, y la dosis de las otras tres aplicaciones fue de 5,97 l/ha cada una. De este modo, tanto el tratamiento 2 como el tratamiento 4 aportaron en total 4,22 kg/ha de CaO, y el tratamiento 3 aportó 2,41 kg/ha de CaO.

Los tratamientos se aplicaron en todos los casos con una bomba de espalda marca Carpi, modelo Spray Mec, de 18 litros de capacidad. Entre la aplicación de un tratamiento y el siguiente, se realizó un lavado adecuado de la bomba, con agua limpia. El volumen total de caldo aplicado al cultivo correspondió a 231 l/ha para las aplicaciones realizadas a los 12 y 26 ddt, y a 462 l/ha para las aplicaciones hechas a los 40 y 50 ddt, debido a la mayor cantidad de follaje presente en esos momentos en el cultivo.

Para la aplicación de todos los tratamientos, se añadió el coadyuvante Agrex RP 25,7 SL, a una dosis de 0,5 ml/litro. Este producto contiene 16,2 % p/v de alquil-aril-éter-poliglicólico; 4,0% p/v de dioctil sulfosuccinato; y 5,5 % p/v de glicol.

Las variables evaluadas fueron:

- Edad al inicio de cosecha (ddt): se calculó según los días transcurridos desde el trasplante hasta el inicio de la cosecha, para cada tratamiento.
- Número de frutos por metro lineal: se contabilizó el número de frutos exportables por parcela útil, y se dividió entre 8 m (longitud de la cama de la parcela útil). Se consideraron como frutos no aptos para exportación aquellos con deformidades, decoloraciones, o daños por plagas, enfermedades o quema por sol.
- Rendimiento exportable (kg/ha): se obtuvo a partir del peso total de los frutos exportables y de la densidad de siembra, y se calculó el rendimiento por hectárea. Se utilizó una balanza electrónica marca Ocony, modelo TH-I-EK, con una capacidad de 5000,0 ± 0,1 g.

- d) Producción exportable (cajas/ha): se obtuvo al relacionar el número de frutos según su tamaño y peso, y a partir de este dato y de la densidad de siembra, se calculó el número total de cajas exportables de 10 kg producidas en una hectárea.
- e) Peso promedio del fruto (g): se obtuvo al dividir el peso total de los frutos exportables por parcela, entre el número total de los mismos.
- f) Distribución porcentual de tamaño de los frutos: se obtuvo al estimar el porcentaje de frutos ubicados en cada categoría de tamaño, según su peso. El tamaño del fruto se expresa de acuerdo con el número de frutos que caben en una caja de 10 kg. Así, entre mayor sea el número que identifica el tamaño del fruto, menor será el tamaño del mismo. Para hacer esta estimación se utilizó el rango de peso que se muestra en el cuadro 2.

**Cuadro 2.** Rango de peso del fruto, según la categoría de tamaño.

Categoría de tamaño del fruto	Rango de peso del fruto (g)
4	2223 – 2750
5	1819 – 2222
6	1539 – 1818
7	1334 – 1538
8	1177 – 1333
9	1053 – 1176
10	870 – 1052
12	800 – 869

- g) Porcentaje de sólidos solubles totales (°Brix): se evaluó el porcentaje de sólidos solubles totales de la pulpa del fruto, en una muestra de cinco frutos exportables por parcela, y se obtuvo el promedio. Se utilizó un refractómetro manual marca Atago, modelo N-1a, con una escala de 0,0 – 32,0 ± 0,2 °Brix.
- h) Firmeza de la pulpa del fruto (N): se evaluó la firmeza de la pulpa del fruto, en una muestra de cinco frutos exportables por parcela, y se calculó el promedio. Se utilizó un penetrómetro marca Effegi, modelo FT-327, con una escala de 0,0 – 13,0 ± 0,1 kg-fuerza, y los valores obtenidos se multiplicaron por un factor de conversión de 9,807 para calcular el dato en Newtons (N); se utilizó el puntero del penetrómetro cuya base mide 7,5 mm de ancho.
- i) Severidad máxima de mildiú vellosa: se realizaron cuatro evaluaciones fitosanitarias (a los 12 ddt, 26 ddt, 40 ddt y 50 ddt), a nivel cuantitativo en todas las plantas de cada parcela, para determinar la severidad máxima de la enfermedad mildiú vellosa (*Pseudoperonospora cubensis*), según la escala que se muestra en el cuadro 3.
- j) Incidencia de colapso de la planta: se realizaron cinco evaluaciones fitosanitarias (a los 12 ddt, 26 ddt, 40 ddt, 50 ddt y 58 ddt) a nivel cuantitativo, para determinar el porcentaje de plantas colapsadas por enfermedades causadas por hongos fitopatógenos en el cuello de la planta (tales como *Fusarium* spp., *Sclerotium rolfsii*, *Mycosphaerella* spp., entre otros). Se evaluaron todas las plantas de cada parcela.

**Cuadro 3.** Escala de evaluación de la severidad de mildiú veloso en melón.

Número de lesiones necróticas por hoja	Escala
0	1
1-3	2
4-6	3
7-10	4
Más de 10	5

k) Relación beneficio:costo del tratamiento: se calculó a partir del costo adicional de los fertilizantes aplicados, el precio de venta de la caja de melón de exportación, y el aumento o reducción adicional en el rendimiento, en comparación con el testigo (el cual se tomó como el tratamiento base). El precio considerado para el JMX-Ca fue de 7238 colones/kg, para el Manvert-Ca fue de 2399 colones/litro, y para la caja de melón de exportación fue de 4048 colones/caja.

Además, para cada tratamiento se realizó un análisis foliar orientativo; se tomó una muestra compuesta de 30 hojas maduras (quinta hoja a partir del brote de la rama) para cada tratamiento (cinco hojas por cada parcela útil), y se realizó un análisis químico foliar completo, en el Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica.

Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar, con seis repeticiones y cuatro tratamientos. Cada bloque consistió en una hilera de plantas de 48 metros de longitud, ubicado en la zona central del lote 6-1 de la finca. Cada bloque se separó del otro por medio de una hilera de plantas, que sirvió de borde entre bloques. La parcela total consistió en una sección de 12 metros lineales de cama, y la parcela útil consistió en la sección central de dicha parcela, con una longitud de 8 metros lineales de cama.

Para las variables cuantitativas de rendimiento, calidad, y daño por enfermedades, se realizó un análisis de variancia para establecer diferencias significativas entre tratamientos, y se usó la prueba LSD Fisher ( $p \leq 0,05$ ) para clasificar los resultados de los tratamientos.

## Resultados y discusión

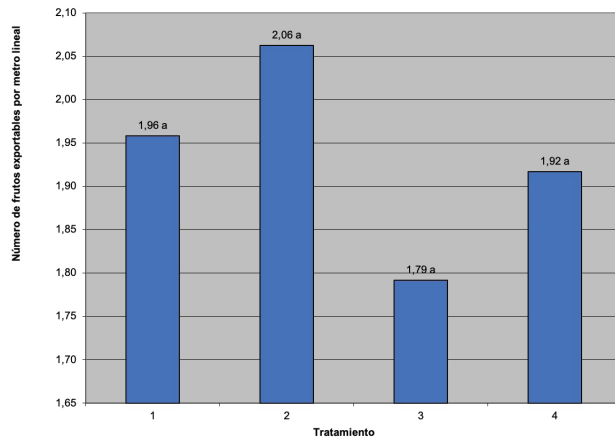
La cosecha inició el 23 de febrero de 2016 (58 ddt), y finalizó el 28 de febrero de 2016 (63 ddt), para todos los tratamientos. No se observaron diferencias en el inicio de la madurez (precocidad) de los frutos entre tratamientos.

En la figura 1 se presentan los datos para el número de frutos exportables por metro lineal, según los diversos tratamientos evaluados. El tratamiento 2 mostró el mayor valor para esta variable con 2,06 frutos/m, y el menor valor correspondió al tratamiento 3 (1,79 frutos/m). Sin embargo, las diferencias encontradas entre tratamientos no fueron estadísticamente significativas.

En dos ensayos realizados en Brasil con melón Amarillo, no hubo diferencias en el número de frutos por planta (y por lo tanto, en el número de frutos por metro lineal) entre el testigo y el tratamiento de aplicación foliar de calcio [5], [6]; en el presente ensayo se obtuvo un resultado similar.

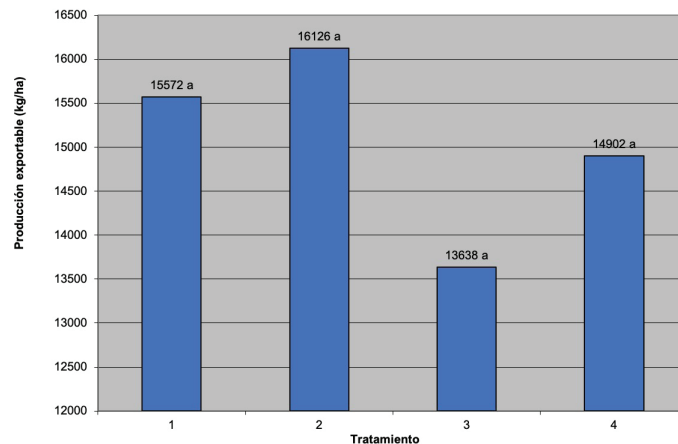
En la figura 2 se muestran los resultados del rendimiento exportable de melón.





**Figura 1.** Número de frutos exportables por metro lineal, según tratamiento.

Nota: elaboración propia, a partir de los datos obtenidos. Medias seguidas de una misma letra no se consideran distintas según la prueba de LSD Fisher ( $p \leq 0,05$ ).



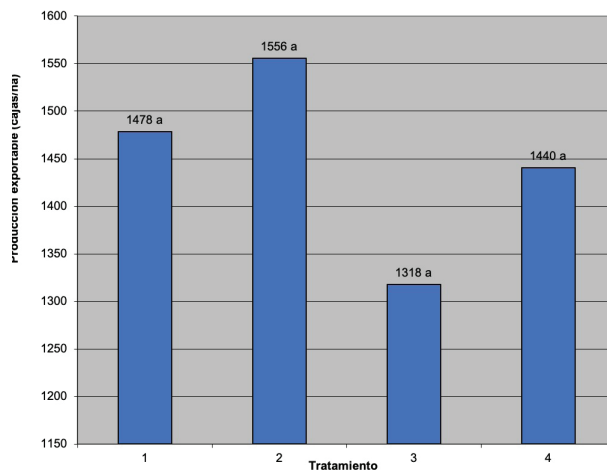
**Figura 2.** Rendimiento exportable de melón (kg/ha), según tratamiento.

Nota: Medias seguidas de una misma letra no se consideran distintas según la prueba de LSD Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

El tratamiento 2 mostró el mayor rendimiento en este ensayo con 16126 kg/ha, y el menor rendimiento correspondió al tratamiento 3 (13638 kg/ha). Sin embargo, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para esta variable. Los resultados obtenidos en el presente ensayo son inferiores a los rendimientos informados para exportación de melón en Costa Rica, de entre 17781 y 27516 kg/ha [2].

En un ensayo con melón Amarillo en Brasil, la aplicación foliar de calcio aumentó en forma significativa el rendimiento comercial para el híbrido Gold Mine en comparación al testigo, pero para el híbrido 10-00 no se presentaron diferencias con el testigo [5]; en el presente ensayo se obtuvo el mismo resultado que el hallado por dichos autores con el híbrido de melón 10-00.

En la figura 3 se presenta la producción exportable de melón, en cajas por hectárea. El tratamiento 2 presentó el mayor rendimiento con 1556 cajas/ha, y el tratamiento 3 mostró la menor producción (1318 cajas/ha). Pero las diferencias encontradas entre tratamientos no fueron estadísticamente significativas.



**Figura 3.** Producción exportable de melón (cajas/ha), según tratamiento.

Nota: Medias seguidas de una misma letra no se consideran distintas según la prueba de LSD Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

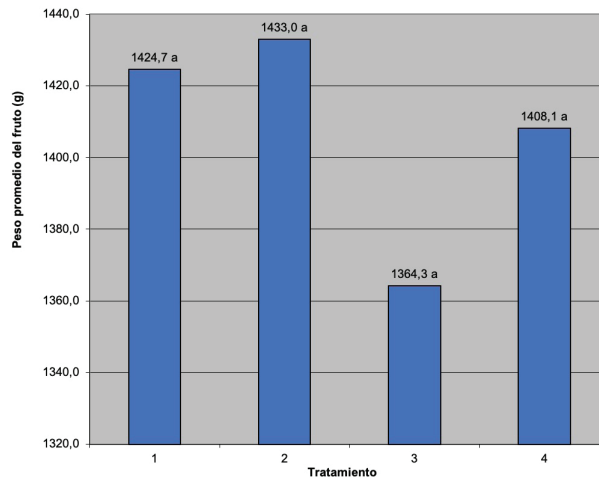
Es conveniente resaltar que el rendimiento del cultivo en este ensayo fue bastante bajo, dado que los rendimientos normales para la zona y para esta variedad de melón, generalmente es cercano a las 2500 cajas/ha (J. E. Monge-Pérez, datos sin publicar).

En la figura 4 se muestran los datos del peso promedio del fruto, según el tratamiento evaluado. El tratamiento 2 produjo los frutos con mayor peso (1433,0 g), y el menor valor para esta variable se obtuvo con el tratamiento 3 (1364,3 g). Sin embargo, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para esta variable.

En otro ensayo realizado en Argentina con melón Honey Dew, en cuatro localidades no se hallaron diferencias significativas en el peso del fruto entre el testigo y los tratamientos en que se aplicaron tres diferentes fuentes de calcio vía foliar; pero en otra localidad sí se hallaron diferencias para esta variable entre dos de las fuentes de calcio entre sí, pero no entre dichas fuentes y el testigo [7]; los resultados obtenidos en el presente ensayo son similares a los hallados por esos autores en las cuatro localidades supracitadas.

Sin embargo, en una investigación con melón Amarillo realizada en Brasil, el peso del fruto sí aumentó con la aplicación foliar de calcio, en comparación con el testigo [6].

En el cuadro 4 se presentan los datos de la distribución porcentual de tamaño de los frutos. El tratamiento 2 concentró la mayor proporción de frutos de tamaño 6, 7 y 8 juntos (68,69 % de los frutos totales), que corresponden a los que tienen mayor demanda en el mercado en Europa, seguido por el tratamiento 3 (61,63 %), el tratamiento 4 (58,70 %), y por último el tratamiento 1 (58,51 %). Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas entre tratamientos para la cantidad de frutos 6, 7 y 8 juntos (no se muestran los datos del análisis estadístico).



**Figura 4.** Peso promedio del fruto (g), según tratamiento.

Nota: Medias seguidas de una misma letra no se consideran distintas según la prueba de LSD Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

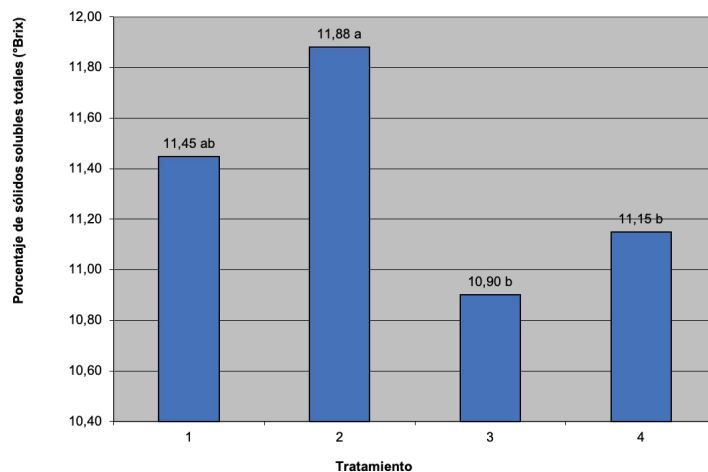
**Cuadro 4.** Distribución porcentual de tamaño de los frutos.

Tratamiento	Categoría de tamaño del fruto (valores en porcentaje)							
	4	5	6	7	8	9	10	12
1	3,19	9,57	24,47	22,34	11,70	13,83	10,64	4,26
2	1,01	7,07	26,26	27,28	15,15	9,09	9,09	5,05
3	0,00	9,30	19,77	24,42	17,44	9,30	19,77	0,00
4	1,09	13,04	17,39	22,83	18,48	9,78	16,30	1,09

En la figura 5 se muestran los resultados para el porcentaje de sólidos solubles totales ( $^{\circ}$ Brix), según el tratamiento. Esta fue la única variable en que sí existieron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos; el mayor valor se presentó con el tratamiento 2 (11,88  $^{\circ}$ Brix), y el menor valor lo obtuvo el tratamiento 3 (10,90  $^{\circ}$ Brix). No se presentaron diferencias significativas entre el tratamiento 2 y el tratamiento 1 (testigo, 11,45  $^{\circ}$ Brix). El valor alcanzado por el tratamiento 2 sí fue significativamente superior con respecto a los tratamientos 3 y 4 (entre 10,90 y 11,15  $^{\circ}$ Brix). Por otra parte, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos 1, 3 y 4 entre sí, para esta característica.

Unos investigadores evaluaron el efecto de la aplicación vía foliar de tres fuentes de calcio en melón Honey Dew, y no hallaron diferencias entre tratamientos en cuatro localidades para el porcentaje de sólidos solubles totales, pero en otra localidad el tratamiento testigo sí obtuvo un mayor valor para esta variable en comparación con los tratamientos de aplicación de calcio [7]; en el presente ensayo se obtuvieron resultados diferentes a los hallados por dichos autores.

En otras investigaciones realizadas en Brasil y Argentina, no se presentaron diferencias en el porcentaje de sólidos solubles totales, entre el testigo y la aplicación de diferentes dosis y/o fuentes de calcio a nivel foliar, en melón Amarillo [8], [6], [5]; los datos hallados en el presente estudio fueron similares a los informados por esos autores, en el sentido de que el tratamiento testigo no fue estadísticamente diferente de los otros tratamientos evaluados.



**Figura 5.** Porcentaje de sólidos solubles totales (°Brix), según tratamiento.

Nota: Medias seguidas de una misma letra no se consideran distintas según la prueba de LSD Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

En la figura 6 se presentan los valores obtenidos para la firmeza de la pulpa del fruto. El tratamiento 4 produjo los frutos con la pulpa más firme (28,38 N), y el menor valor para esta característica correspondió al tratamiento 1 (testigo, con 26,94 N). Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para esta variable.

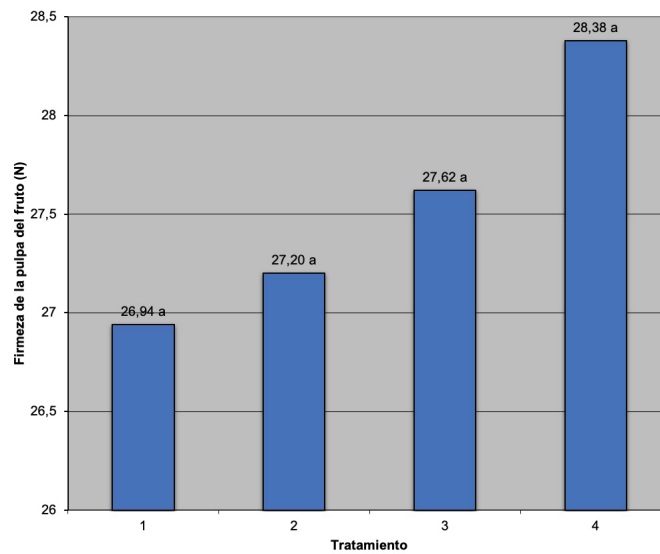
En Argentina, se informó que la aplicación de tres fuentes de calcio vía foliar provocó el aumento de la firmeza de la pulpa del fruto en melón Honey Dew, en comparación con el testigo, en cuatro localidades; pero en otra localidad no hubo diferencias entre tratamientos [7], tal y como sucedió en el presente ensayo.

Unos investigadores hallaron diferencias en la firmeza del fruto de melón Amarillo entre el testigo y el tratamiento de aplicación foliar de nitrato de calcio a una dosis de 2,6 g/l; pero no se presentaron diferencias entre el testigo y las dosis de 1,3; 5,2; y 10,5 g/l de nitrato de calcio [8], de manera similar a los resultados hallados en el presente trabajo.

En otro ensayo con melón Amarillo en Brasil, la firmeza del fruto aumentó con la aplicación foliar de calcio, en comparación con el testigo [6].

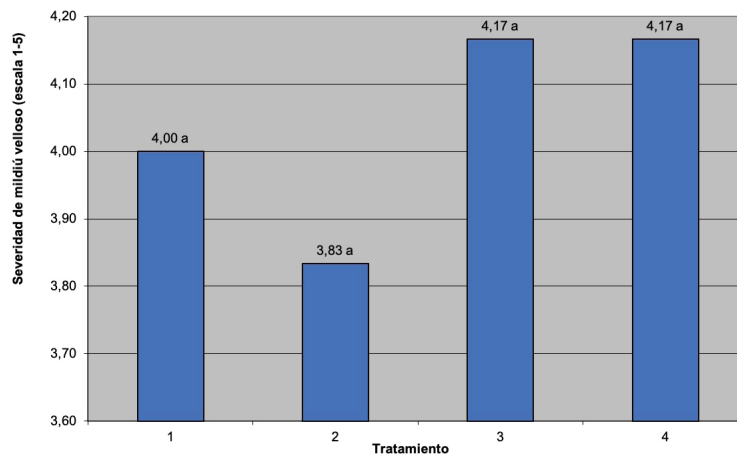
Con respecto a la evaluación fitosanitaria, a los 12 ddt y a los 26 ddt, las plantas estaban completamente sanas y libres de enfermedades. A los 40 ddt, se encontró una incidencia importante de la enfermedad mildiú polvoso (*Erysiphe* sp. y/o *Sphaerotheca* sp.), distribuida uniformemente en todos los tratamientos. A los 50 ddt, el mildiú polvoso ya había sido controlado; además, se encontraron algunas plantas con síntomas de afectación por virus en las hojas, otras plantas mostraron un ataque leve de minador (larvas de la mosca *Liriomyza* sp.) en las hojas, y también se presentaron síntomas de la enfermedad mildiú veloso (*Pseudoperonospora cubensis*), pero que ya había sido controlada mediante fungicidas.

En la figura 7 se muestra la evaluación de la severidad máxima de mildiú veloso por tratamiento, a los 50 ddt. El tratamiento 2 fue el que mostró la menor severidad máxima de esta enfermedad, con una calificación de 3,83 puntos (escala 1-5), mientras que el mayor valor para esta variable correspondió a los tratamientos 3 y 4, con 4,17 puntos para cada uno. Sin embargo, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para esta variable. En términos generales, estos resultados indican que las hojas mostraron una severidad máxima de 7-10 lesiones necróticas causadas por esta enfermedad a los 50 ddt, lo que se considera una severidad alta.



**Figura 6.** Firmeza de la pulpa del fruto (N), según tratamiento.

Nota: Medias seguidas de una misma letra no se consideran distintas según la prueba de LSD Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

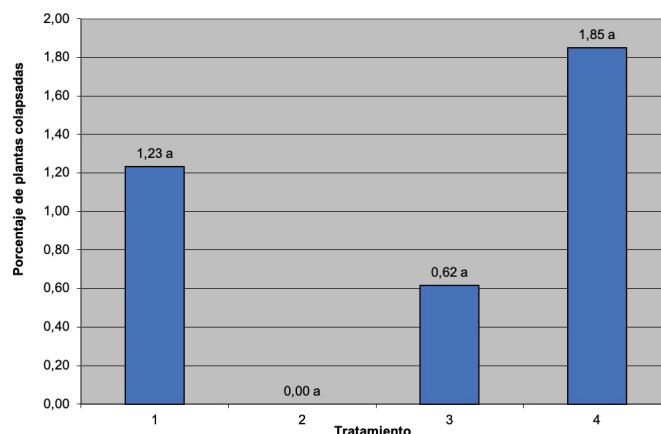


**Figura 7.** Severidad máxima de mildiú veloso (escala 1-5), a los 50 ddt, según tratamiento.

Nota: Medias seguidas de una misma letra no se consideran distintas según la prueba de LSD Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

Al inicio de la cosecha (58 ddt), se encontraron algunas plantas colapsadas por enfermedades causadas por hongos fitopatógenos en el cuello de la planta; en la figura 8 se presentan los datos de la incidencia de esta enfermedad en ese momento. El tratamiento 2 fue el único que no mostró ninguna planta colapsada por dicha patología. Le siguió el tratamiento 3, que presentó una incidencia de 0,62 %, el tratamiento 1 con 1,23 %, y el mayor valor para esta variable se obtuvo con el tratamiento 4 (1,85 %). Sin embargo, las diferencias halladas entre tratamientos no fueron estadísticamente significativas.

También, en el momento del inicio de la cosecha (58 ddt) se encontraron varios frutos que mostraban síntomas de afectación por virus fitopatógenos (como manchas y protuberancias), y otros frutos que presentaban daños en la cáscara causados por larvas de insectos (*Spodoptera* spp. y *Diaphania* spp.) Obviamente, esos frutos fueron descartados ya que no cumplían con los estándares para exportación.



**Figura 8.** Incidencia de colapso de la planta (porcentaje), a los 58 ddt, según tratamiento.

Nota: Medias seguidas de una misma letra no se consideran distintas según la prueba de LSD Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

En el cuadro 5 se presentan los resultados del análisis químico foliar para los cuatro tratamientos.

Según los rangos definidos por el Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica para el cultivo de melón [9], en todos los tratamientos se encontraron niveles adecuados (suficientes) en la mayoría de elementos (N, P, S, Fe, Zn, Mn y B). Solamente se presentaron niveles bajos en el caso del potasio (alrededor de la mitad de lo necesario), en los cuatro tratamientos. Por otra parte, se presentaron niveles altos en el caso del cobre, magnesio y calcio en todos los tratamientos; particularmente en el caso del calcio, el nivel obtenido casi llega a duplicar el nivel considerado suficiente, lo que podría explicar por qué no hubo respuesta a los tratamientos de aplicación foliar suplementaria de calcio evaluados en este ensayo, para la mayoría de las variables evaluadas.

Sin embargo, otra investigadora considera como normal en melón que el contenido foliar de N y K sea de alrededor del 3 % para cada uno de ellos, y que el contenido foliar de Ca sea de alrededor del 5 % [3]. Bajo estos parámetros, los resultados encontrados en el presente ensayo se ajustan mejor a los valores considerados normales, excepto que se presentó un exceso de N con respecto a K, lo que podría haber afectado la producción de frutos, y haber favorecido más bien el crecimiento vegetativo.

Definitivamente, el bajo rendimiento exportable hallado en el presente ensayo podría estar asociado al bajo nivel de potasio encontrado en las hojas del melón. El potasio es un elemento esencial para lograr el llenado del fruto [10]. Este bajo nivel de potasio encontrado a nivel foliar podría ser el factor limitante más importante para el cultivo en este caso. Lo normal es que, en el tejido vegetativo de melón, la concentración de K sea mayor que la de N [3], pero en el presente ensayo se encontró la situación contraria. Sin embargo, el bajo rendimiento obtenido en este caso también podría estar relacionado con otros factores limitantes ya comentados, como el efecto de plagas y enfermedades, en especial con la enfermedad mildiú vellosa, que presentó una severidad máxima alta a los 50 ddt.

**Cuadro 5.** Resultados del análisis químico foliar, según tratamiento.

Elemento	Unidad	Tratamiento				Rango suficiente*	Diagnóstico
		1	2	3	4		
N	%	4,79	5,02	4,81	4,83	4,5 - 5,5	suficiente
P	%	0,52	0,52	0,51	0,48	0,3 - 0,8	suficiente
Ca	%	4,28	4,23	4,81	4,98	2,3 - 3,0	alto
Mg	%	0,91	0,91	1,02	1,02	0,35 - 0,8	alto
K	%	2,32	2,17	2,41	2,43	4,0 - 5,0	bajo
S	%	0,78	0,82	0,82	0,74	0,25 - 1,0	suficiente
Fe	mg/kg	175	235	256	265	50 - 300	suficiente
Cu	mg/kg	35	38	34	36	8,0 - 30	alto
Zn	mg/kg	47	49	47	46	20 - 200	suficiente
Mn	mg/kg	101	106	103	102	50 - 250	suficiente
B	mg/kg	38	39	40	41	25 - 60	suficiente

\*Fuente: [9].

En el cuadro 6 se presenta la relación beneficio:costo para los tratamientos de aplicación foliar suplementaria de calcio, en comparación con el tratamiento testigo.

**Cuadro 6.** Relación beneficio:costo, según tratamiento.

Tratamiento	Beneficios adicionales (colones/ha)	Costos adicionales (colones/ha)	Relación beneficio:costo
1	n.a.	n.a.	n.a.
2	315.744	76.000	4,15:1
3	-647.680	43.429	-14,91:1
4	-153.824	50.127	-3,07:1

El único caso en que el beneficio adicional estimado fue superior al costo correspondió al tratamiento 2 (relación beneficio:costo de 4,15), en el cual el retorno de la inversión fue de 4,15 colones por cada colón invertido, lo que se considera una opción altamente rentable. Los tratamientos 3 y 4 obtuvieron una relación beneficio:costo negativa, por lo que no se consideran económicamente rentables. Sin embargo, se debe recordar que no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en la producción exportable en cajas por hectárea, entre tratamientos.

## Conclusiones y recomendaciones

Se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para el porcentaje de sólidos solubles totales. El tratamiento 2 (JMX-Ca a 4,22 kg CaO/ha) produjo frutos con un valor significativamente más alto (11,88 °Brix) para esta variable, en comparación con los tratamientos 3 (JMX-Ca a 2,41 kg CaO/ha) y 4 (Manvert-Ca a 4,22 kg CaO/ha) (entre 10,90 y

11,15 °Brix). Sin embargo, el resultado obtenido por el tratamiento 2 no fue estadísticamente diferente del valor hallado por el tratamiento 1 (testigo, 11,45 °Brix).

A pesar de que en todas las demás variables evaluadas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, prácticamente en todos los casos el mejor resultado fue obtenido por el tratamiento 2 (JMX-Ca a 4,22 kg CaO/ha), excepto en la firmeza del fruto, en que el mejor resultado se obtuvo con el tratamiento 4 (Manvert-Ca a 4,22 kg CaO/ha).

Se concluye que, bajo las condiciones en que se desarrolló el ensayo, no se justifica económicamente la aplicación foliar suplementaria de calcio.

## Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo de la empresa M y M Internacional S. A. y de su personal, para la ejecución del trabajo. Asimismo, agradecen la colaboración de Gabriela Zárate, Jendry Portilla y Jorge Díaz en el trabajo de campo.

## Referencias

- [1] J. E. Monge-Pérez, «Producción y exportación de melón (Cucumis melo) en Costa Rica,» *Tecnología en Marcha*, vol. 27, n° 1, pp. 93-103, 2014.
- [2] J. E. Monge-Pérez, «Caracterización económica de la producción de melón (Cucumis melo) en Costa Rica,» de *La investigación en Guanacaste II*, San José, Costa Rica, Nuevas Perspectivas, 2016, pp. 257-275.
- [3] F. Bertsch, «Utilización de estudios de crecimiento y absorción de nutrientes para afinar programas de fertilización foliar,» de *Fertilización foliar: principios y aplicaciones*, San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, CIA-UCR-ACCS, 2002, pp. 129-146.
- [4] L. Rincón, «Fertilización del melón en riego por goteo,» de *Melones*, Vols. %1 de %2Compendios de Horticultura, 10, Reus, España, Ediciones de Horticultura S. L., 1997, pp. 85-93.
- [5] J. E. Yuri, T. S. D. Ferreira, D. R. S. Gama, G. M. d. Resende y J. H. Mota, «Produtividade e qualidade dos frutos de melão pulverizados com cálcio,» *Horticultura Brasileira*, vol. 30, n° 2 (Suplemento-CD Rom), pp. S6563-S6569, 2012.
- [6] A. J. Pereira, A. F. Blank, M. A. R. Alvarenga y R. J. d. Souza, «Aplicação de fontes e doses de cálcio na produção e qualidade de frutos de melão,» *Horticultura Brasileira*, vol. 20, n° 3, pp. 428-431, 2002.
- [7] C. A. Bouzo y S. B. Cortez, «Efecto de la aplicación foliar de calcio sobre algunos atributos de calidad en frutos de melón,» *RIA*, vol. 38, n° 3, pp. 257-262, 2012.
- [8] F. F. Muñoz, V. E. Ruiz y C. A. Bouzo, «Effect of preharvest foliar sprays of calcium nitrate on melon fruit quality,» *Pyton*, vol. 86, pp. 131-136, 2017.
- [9] Laboratorio de Suelos y Foliaves, «Tabla de interpretación de análisis foliar en melón,» Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica, 2002.
- [10] F. Bertsch, *La fertilidad de los suelos y su manejo*, San José, Costa Rica: ACCS, 1995, p. 157.



# Fraccionamiento de metales pesados en un suelo contaminado del Valle de Mexicali

## Heavy metals fractionation in Mexicali Valley contaminated soil

Francisco Javier Gómez-Puentes<sup>1</sup>, Jaime Alonso Reyes-López<sup>2</sup>,  
María Guadalupe Amado-Moreno<sup>3</sup>




---

*Fecha de recepción: 29 de agosto de 2019*  
*Fecha de aprobación: 16 de diciembre de 2019*

Gómez-Puentes, F; Reyes-López, J; Amado-Moreno, M.  
Fraccionamiento de metales pesados en un suelo contaminado del Valle de Mexicali . *Tecnología en Marcha*. Vol. 33-4. Octubre-Diciembre 2020. Pág 103-113.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v33i4.4586>



- 1 Profesor del Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica. TecNM Campus Mexicali. México. Correo electrónico: javiergomezp@itmexicali.edu.mx.  
 <https://orcid.org/0000-0002-8778-8173>
- 2 Investigador del Instituto de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California. México. Correo electrónico: Jaime.reyes63@uabc.edu.mx.  
 <https://orcid.org/0000-0001-7962-9191>
- 3 Profesora del Departamento de Ciencias Básicas. TecNM Campus Mexicali. México. Correo electrónico: lupitaamado@yahoo.com.mx.  
 <https://orcid.org/0000-0001-6363-5888>

## Palabras clave

Partición química; metales pesados; zona vadosa; agua subterránea.

## Resumen

La contaminación provocada por metales pesados constituye uno de los grandes retos relacionados con la calidad del ambiente y la salud humana. La introducción de estos elementos en los sistemas naturales puede deberse a diversas actividades humanas entre ellas la agricultura y la disposición de residuos sólidos. En el Valle de Mexicali, la agricultura representa la actividad económica más importante, sin embargo, el uso de agroquímicos, así como la disposición clandestina de residuos sólidos urbanos (RSU) han generado problemas de contaminación severos afectando la fertilidad de suelos y la calidad de las aguas subterráneas. El propósito de esta investigación consistió en evaluar el contenido de metales pesados en diferentes fracciones de suelo a través de la zona vadosa (ZV) en un sitio ubicado en el Valle de Mexicali e influenciado por la agricultura y la disposición de residuos. Las muestras de suelo se sometieron al procedimiento de extracción secuencial y fueron analizadas mediante espectrometría de absorción atómica. Los resultados obtenidos revelan una marcada acumulación de metales desde la superficie hasta los primeros 50 cm de profundidad. Las variaciones estacionales del nivel freático, así como el riego agrícola favorecen el transporte de solutos observándose concentraciones de metales en el agua subterránea superiores a los estándares para agua potable. Los elementos Cd, Cr y Ni se distribuyen preferentemente en la fracción residual del suelo limitando así su movilidad. El Cu presentó una fuerte asociación con la materia orgánica en tanto que el Zn y Pb presentaron la mayor asociación con fracción intercambiable.

## Keywords

Chemical partitioning; heavy metals; vadose zone; groundwater.

## Abstract

Heavy metals contamination is one of the greatest challenges related to the environment quality and human health. The introduction of these elements into natural systems may be due to various types of human activities such as agriculture and solid wastes disposal. In Mexicali Valley, agriculture represents the most important economic activity, however, the use of agrochemicals as well as the clandestine disposition of urban solid wastes have generated severe pollution problems affecting soil fertility and groundwater quality. The purpose of this research was to evaluate the heavy metals content in the different fractions of soil through the vadose zone (ZV) in a site located in Mexicali Valley, B.C. influenced by agriculture and solid wastes disposal. Soil samples were subjected to the sequential extraction procedure and then analyzed by atomic absorption spectrometry. The results obtained reveal a marked accumulation of metals from the surface until 50 cm depth. Seasonal variations in the water table, as well as agricultural irrigation, favors the solutes transport with heavy metals concentrations in groundwater higher than the standards for drinking water. The elements Cd, Cr y Ni are preferably distributed in the residual fraction of soil, limiting their mobility. Cu presented a strong association with organic matter, while Zn and Pb presented the greatest association with the exchangeable fraction.

## Introducción

El municipio de Mexicali, en el estado de Baja California, México, se caracteriza por poseer un clima semiárido con temperaturas que alcanzan los 48 °C durante el verano y una precipitación media anual de escasos 77.8 mm [1]. Por las características geológicas de ambiente deltaico, la principal explotación de los suelos del Valle de Mexicali ha sido la agricultura, de modo que el riego de las tierras de cultivo se ha venido llevando a cabo mediante el aprovechamiento de las únicas fuentes de agua disponibles, las aguas del Río Colorado y las del acuífero de la región. Con estas aguas se abastecen, a través de una amplia red de canales, 207 935 hectáreas de tierras agrícolas del Distrito de Riego 014 [2]. El agua del Río Colorado, que representa la principal fuente de recarga para el acuífero del Valle de Mexicali, se caracteriza por poseer una concentración de sales que alcanza en promedio las 1000 ppm, lo que ha favorecido la salinización progresiva de los suelos agrícolas. La salinización del suelo del Valle de Mexicali se ha convertido en una preocupación primordial de los productores agrícolas en relación con la rentabilidad de los cultivos [3].

Por otro lado, la proliferación de sitios clandestinos de disposición final de residuos sólidos urbanos (RSU) en el Valle de Mexicali representa una seria amenaza al ambiente. Los impactos provocados por este tipo de sitios incluyen la contaminación de suelo, aire, vectores transmisores de enfermedades, vegetación, así como la afectación de cuerpos de agua superficial y subterránea [4]. Los lixiviados de vertederos municipales son efluentes complejos altamente concentrados que contienen materia orgánica disuelta, macrocomponentes inorgánicos, metales pesados y sustancias orgánicas xenobióticas [5]. La concentración total de metales pesados es un importante indicador de los riesgos de contaminación. Sin embargo, los metales asociados con las diferentes fracciones de un suelo tienen diferentes impactos sobre el medio ambiente por lo que el contenido total de metales pesados por sí mismo es insuficiente para evaluar su impacto ambiental en suelos contaminados. Varios métodos químicos y de fraccionamiento han sido desarrollados y aplicados para el análisis de metales en suelos y sedimentos [6]. El uso de los procedimientos de extracción secuencial (partición química) proporciona información significativa sobre la biodisponibilidad de metales tóxicos a los organismos vivos ya que estos métodos permiten determinar la forma en la que estos elementos se distribuyen en las diferentes fracciones del suelo [7].

El sitio de estudio colinda al norte con varias parcelas de cultivo de riego por inundación y durante cerca de 20 años operó como un sitio no controlado recibiendo diariamente 30 Ton de residuos sólidos procedentes de diferentes poblados de la localidad. Hoy en día, este basurero se encuentra en proceso de regularización siendo administrado por la autoridad municipal. Hasta el año 2011, se llevaba a cabo la separación y reciclaje solamente de metales ferrosos y aluminio mientras que el resto de los residuos era quemado a cielo abierto. La cercanía al Río Colorado contribuye a que el nivel freático sea muy próximo a la superficie fluctuando a lo largo del año entre los 4 y 1.5 m de profundidad. Con el propósito de determinar impacto ambiental provocado por metales pesados (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn), durante febrero y junio de 2017 se llevó a cabo el muestro y análisis químico de suelo y agua subterránea en este sitio.

## Metodología

Muestreo y tratamiento de agua. Durante el mes de junio de 2017, se tomaron 08 muestras de agua de las cuales 06 correspondieron a agua subterránea obtenidas de la red de pozos de monitoreo instalada y 02 muestras de agua superficial correspondientes a un canal de riego agrícola y al Río Colorado respectivamente (figura 1). El muestreo se realizó siguiendo las recomendaciones para estos tipos de aguas [8]. Para la toma de las muestras se emplearon recipientes de polietileno de 1 L de capacidad. La toma de muestras de agua subterránea se

realizó mediante un sistema de vacío tipo manual de acuerdo con la literatura consultada [9]. Por cada punto de muestreo se usaron dos recipientes uno para análisis de aniones y otro para cationes y metales pesados. Durante la colección del agua, la materia en suspensión fue removida mediante el uso de papel filtro de 0.45 micras. Finalmente, las muestras para análisis de cationes y metales fueron acidificadas hasta un pH menor a 2 mediante la adición de ácido nítrico concentrado.

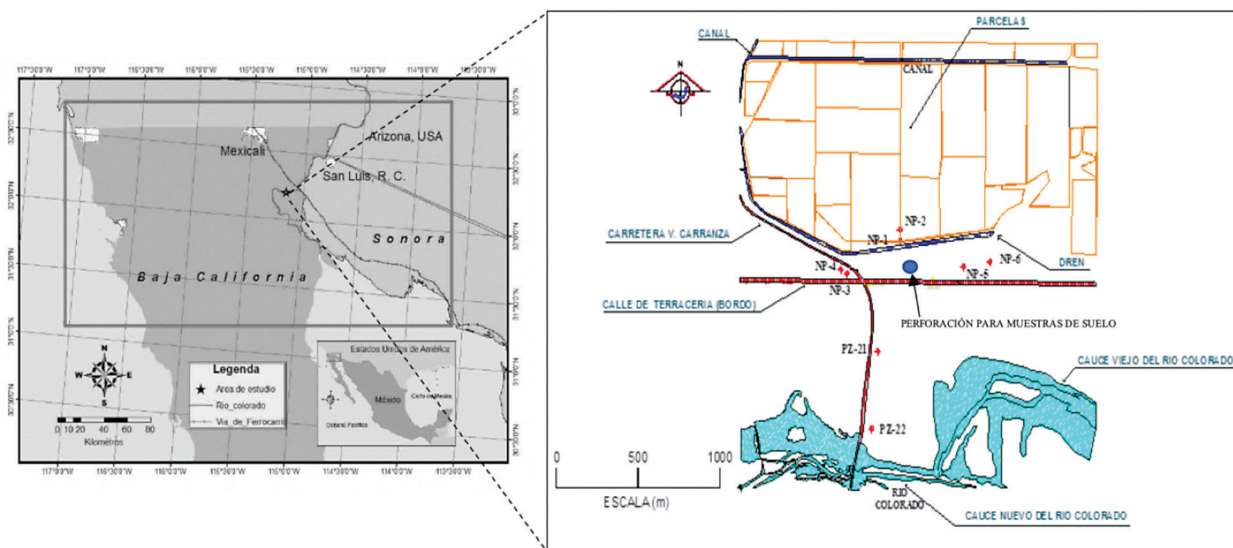


Figura 1. Área de estudio

Muestreo y tratamiento de suelo. En base a resultados de estudios previos en cuanto al contenido total de metales pesados en suelo, los cuales evidenciaron un contenido superior a suelos cultivados de acuerdo con la literatura, en febrero de 2017, se realizó una perforación en el área de descarga de residuos sólidos próxima a las parcelas de cultivo. Dicha zona fue caracterizada como la de mayor impacto. A partir de dicha perforación se obtuvieron muestras de suelo desde la superficie hasta alcanzar el nivel freático tomándose una muestra a intervalos de 50 cm. Dicho muestreo se realizó con base en las recomendaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 [10]. El tratamiento de cada muestra de suelo se basó en lo establecido en el método AS-01 de la referida Norma e incluyó las etapas de secado, molienda, tamizado y homogeneizado.

Análisis de Agua. Parámetros fisicoquímicos en agua, tales como pH, temperatura, oxígeno disuelto, alcalinidad, sólidos disueltos (SD) y conductividad eléctrica fueron medidos en campo utilizando instrumentos portátiles previamente calibrados. El contenido de cationes y de metales pesados en agua se determinaron mediante espectrometría de absorción atómica empleando un espectrofotómetro marca GBC modelo Avanta.

Análisis de suelo. Se estimó el contenido de materia orgánica mediante el método de Walkley & Black basado en la oxidación del carbono orgánico del suelo por medio de una solución de dicromato de potasio y ácido sulfúrico concentrado, con la posterior dilución de la mezcla y su valorización volumétrica con sulfato ferroso. El pH del suelo se determinó electroquímicamente en la solución sobrenadante de una mezcla de relación suelo/agua de 1:2. La conductividad eléctrica se determinó en el extracto de saturación mediante un instrumento marca HANNA

modelo HI99301. Se empleó el método denominado titulación rápida de Piper para determinar el contenido de carbonatos de calcio. La textura del suelo se determinó por el método del hidrómetro de Bouyoucos y se cuantificó el contenido de cationes y aniones en el extracto de saturación del suelo.

Extracción secuencial (partición química) de metales pesados en suelo. A una cantidad adecuada (1 g) de cada muestra homogeneizada se le agregaron diversos reactivos químicos ajustándose el pH y sometiéndose a una serie de extracciones sucesivas de acuerdo con la literatura [7]. De esta extracción secuencial se obtuvieron 05 diferentes extractos para cada una de las muestras.

Análisis químico de metales pesados. A cada extracto obtenido se le analizó el contenido de metales pesados (Cu, Cd, Cr, Ni, Pb, Zn) mediante la técnica de espectrometría de absorción atómica con un espectrofotómetro marca GBC modelo Avanta.

## Resultados y discusión

Parámetros fisicoquímicos. En el cuadro 1 se presentan los resultados de los análisis de los parámetros fisicoquímicos de agua y suelo. En el caso del agua, los valores de pH en general son neutros, lo que termodinámicamente desfavorece la solubilidad de metales y cationes [11]. El oxígeno disuelto de las aguas superficiales está muy por encima del correspondiente a la muestra de agua subterránea debido su interacción con la atmosfera favoreciendo la disolución del gas. Los valores de conductividad eléctrica y sólidos disueltos totales de las aguas superficiales y subterránea presentan un gran contraste en sus valores. En la zona de descarga de los residuos, el contenido de SD en las aguas superficiales alcanza en promedio las 900 partes por millón (ppm), a medida que estas aguas se infiltran a través del subsuelo se enriquecen en solutos hasta un valor 20 veces mayor respecto al agua subterránea. Por su parte, las propiedades fisicoquímicas del suelo, medidas a partir del extracto de saturación, indican una acumulación considerable de solutos desde la superficie hasta los primeros 50 cm de profundidad. A profundidades mayores, se observa una disminución sensible del contenido de SD a excepción de los 150 cm de profundidad donde se aprecia un incremento de sólidos, pero lejos de alcanzar los niveles observados en los primeros 50 cm (Cuadro 1). Los valores de pH evidencian un suelo con características neutras a ligeramente alcalinas lo que favorece la retención de metales y cationes. La capacidad de intercambio catiónico (CIC) en este perfil de suelo presenta los valores mas altos que se encuentran típicamente a los correspondientes a materiales arcillosos del tipo de la clorita y la mica. La textura del suelo en general corresponde a los tipos arcilloso y franco-arcilloso. En cuanto al contenido de materia orgánica, el suelo puede clasificarse como pobre, por lo que, el mayor contenido de materia orgánica en los primeros niveles de profundidad puede atribuirse tanto a la vegetación, así como a los residuos de tipo orgánico que se disponen en esta área. La mayor acumulación de solutos en el extracto de saturación ocurre en los extractos de suelo con los valores más altos de CIC, materia orgánica y arcilla. Es importante señalar que durante la toma de muestras se observó en un horizonte cercano a los 50 cm de profundidad en el que la apariencia del suelo básicamente consistió en una mezcla de suelo, cenizas y restos de residuos.

Análisis químico de agua. En el cuadro 2 se presentan los resultados obtenidos para el contenido de iones mayoritarios y elementos traza en agua superficial y subterránea, así como los resultados de cationes y aniones solubles en el extracto de saturación de suelo. En el caso de los iones mayoritarios, es evidente que el agua subterránea en el sitio de estudio ha recibido el impacto provocado por las actividades agrícolas y de disposición de residuos, los contenidos elevados de especies como Na, K, Cl,  $\text{SO}_4$ ,  $\text{HCO}_3$ , así como varios metales pesados lo confirman. El alto contenido de iones cloruros puede explicarse como consecuencia del impacto del

basurero en tanto que la actividad agrícola constituye un aporte significativo de iones sulfatos al agua subterránea dado su mayor contenido durante la temporada de riego [12]. En el caso de las aguas superficiales, aunque poseen un contenido apreciable de iones mayoritarios, en general se encuentran dentro de los rangos propios de las aguas de tipo continental. Asimismo, las concentraciones de los elementos traza estuvieron dentro de los valores reportados por otros autores [5].

**Cuadro 1.** Parámetros fisicoquímicos medidos en agua y suelo – junio de 2017

Agua											
ID	Tipo	Temperatura (°C)	pH	OD (mg/L)	CE (mS/cm)	STD (ppm)					
RC	Superficial	27.1	7.2	7.8	1.75	878					
Canal	Superficial	26.8	7.4	8.1	1.82	913					
AS	Subterránea	25.4	6.9	3.2	37.7	18900					
Suelo											
ID	Profundidad (cm)	pH	CE (mS/cm)	STD (ppm)	CIC	% CaCO <sub>3</sub>	% MO	% arcilla	% limo	% arena	
Bas 1	0	7.7	41.2	20900	55.8	12.1	3.5	44.2	29.3	26.5	
Bas 2	50	7.9	23.1	11280	52.1	10.1	3.2	42.9	27.5	29.6	
Bas 3	100	7.4	4.45	2230	43.1	8.7	2.2	29.2	28.1	42.7	
Bas 4	150	8.4	5.34	2680	49.7	12.4	2.9	39.5	28.4	32.1	
Bas 5	200	8.1	3.84	1925	44.5	8.8	1.8	32.4	24.1	43.5	
Bas 6	250	7.5	2.48	1252	33.1	7.6	1.6	27.5	24.8	47.7	
Bas 7	300	7.6	1.18	594	35.6	8.1	1.4	25.4	28.3	46.3	
RC – Agua del Río Colorado Canal – Agua de canal usada para riego agrícola AS – Agua subterránea en la zona de la perforación			OD = oxígeno disuelto CE = Conductividad eléctrica STD = Sólidos totales disueltos				CIC = capacidad de intercambio catiónico (meq/100g) MO = Materia orgánica				

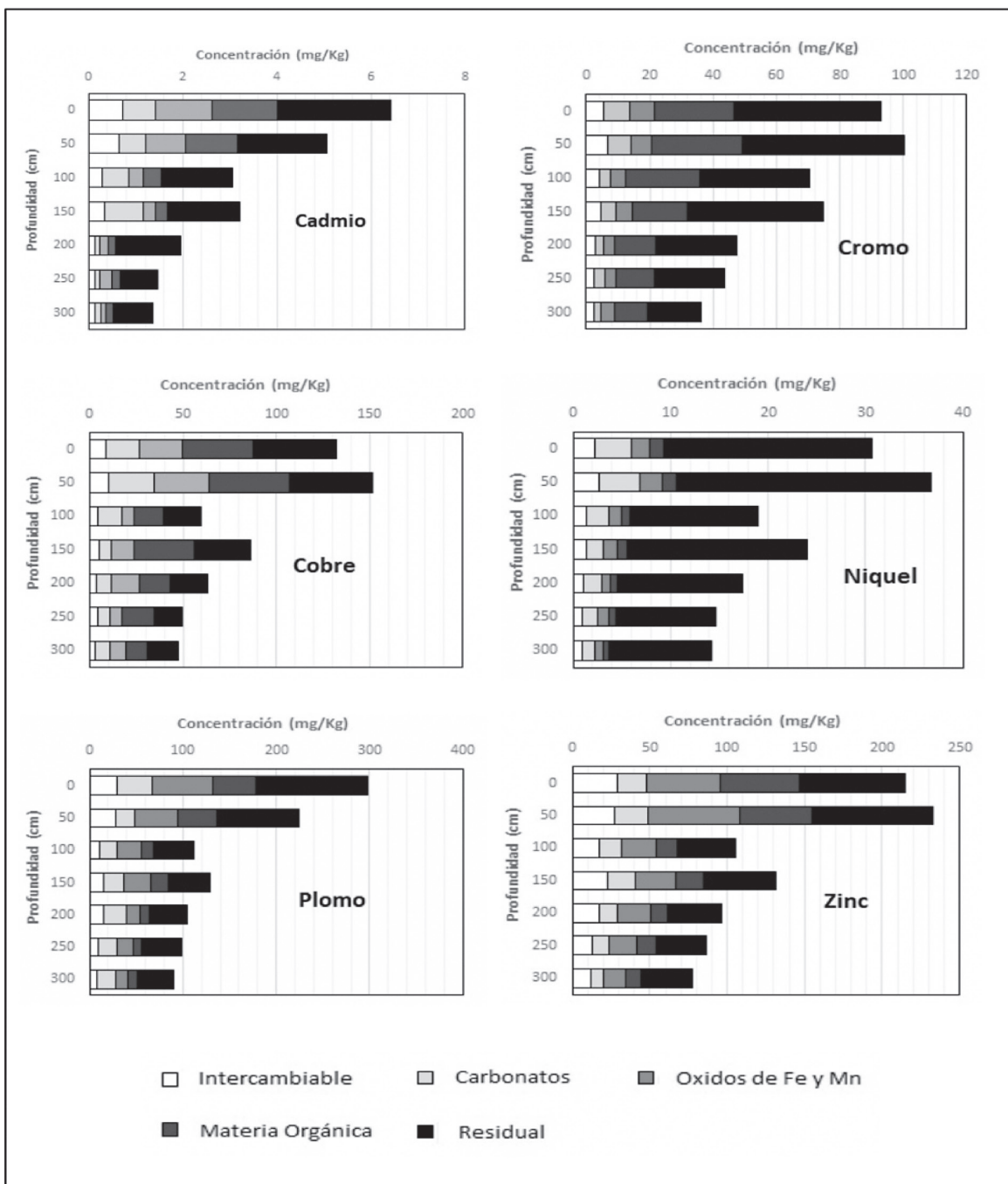
Partición química de metales pesados en suelo. La especiación química de metales llevada a cabo mediante la extracción secuencial es esencial para estimar su movilidad. El orden de movilidad de los metales considerando su abundancia en las fracciones es: intercambiable > unido a carbonato > unido a óxidos > unido a compuestos orgánicos > residual [13]. Tomando como referencia lo anterior, y de acuerdo con los resultados obtenidos (figura 2) puede afirmarse que el contenido de metales pesados tiende a predominar en las fracciones residual y materia orgánica lo que favorece su retención en el suelo limitando con ello su movilidad. Los óxidos que contienen metales traza se pueden movilizar en condiciones reductoras y ácidas. La fase orgánica es de naturaleza relativamente estable, pero puede mobilizarse en condiciones de oxidación fuerte debido a la degradación de la materia orgánica [14]. La quema a cielo abierto de los residuos sólidos, en el sitio, contribuye a la acumulación de metales en estas dos fracciones. En la figura 2, se aprecia que el mayor contenido de metales pesados se encuentra

en las primeras capas del suelo y en concentraciones que superan los rangos típicos en suelos sin cultivar. Cadmio. Su contenido fluctuó entre 1.4 y 6.4 mg/kg, encontrándose los niveles más altos entre los primeros 50 cm de profundidad. A nivel mundial, el rango de Cd en suelos suele estar entre 0.01 y 1 mg/kg con valor promedio de 0.36 mg/kg [15], las muestras de suelo analizadas sobrepasaron estos niveles hasta los 150 cm de profundidad. En el área de estudio, la biodisponibilidad este elemento se ve limitada por el pH elevado del suelo (cuadro I) y el contenido relativamente alto de Ca promoviendo la retención de Cd preferentemente en forma de silicatos [16]. Por otro lado, el contenido elevado de Cl (cuadro I) en los primeros 50 cm de profundidad, favorece la movilidad debido a que el Cd tiende a formar complejos con Cl que tienden a acumularse en la fracción intercambiable facilitando el transporte de Cd hacia la fase acuosa [17]. A mayor profundidad, el menor contenido de cloruros provoca la acumulación de Cd en la fracción residual disminuyendo su movilidad.

**Cuadro 2.** Resultados de los análisis químicos de agua y extracto de saturación en suelo

Agua											
ID Tipo de agua		Iones mayoritarios									
		Na	K	Ca	Mg	Cl	SO <sub>4</sub>	HCO <sub>3</sub>			
RC	Superficial	161	3.9	104	37	163	280	195			
Canal	Superficial	175	3.4	125	42	182	297	188			
AS	Subterránea	6170	85	142	65	8962	4621	980			
ID	Tipo	Elementos traza									
		Al	Fe	Mn	Si	Zn	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb
RC	Superficial	0.01	0.03	0.01	0.05	0.47	0.01	15	130	0.02	0.03
Canal	Superficial	0.01	0.05	0.01	0.07	0.52	0.01	18	152	0.04	0.04
AS	Subterránea	0.74	1.1	0.42	1.8	2.3	1.2	103	208	235	237
Suelo (extracto de saturación)											
ID	Profundidad (cm)	Na	K	Ca	Mg	Cl	HCO <sub>3</sub>	SO <sub>4</sub>			
Bas 1	0	8450	397	2853	478	11456	2305	2025			
Bas 2	50	1153	285	2215	381	2127	421	1379			
Bas 3	100	542	210	1256	228	1620	391	684			
Bas 4	150	330	178	873	180	904	361	509			
Bas 5	200	310	175	756	115	542	421	514			
Bas 6	250	254	155	680	95	430	330	401			
Bas 7	300	285	169	821	65	443	301	364			
Concentraciones en mg/L (agua) y mg/kg (suelo)											
Elementos Cd, Cr, Cu, Ni, Pb concentraciones en ug/L											

Cromo. Hasta 150 cm de profundidad, este elemento se encontró en niveles superiores al rango promedio medido para suelos cultivados (15-70 mg/kg) [18]. El mayor contenido de Cr (47-57%) en las muestras de suelo se encontró en la fracción residual. Lo anterior es consistente con lo reportado en diversos estudios y puede atribuirse a la baja tendencia del Cr a formar los oxianiones cromato y dicromato [19]. La siguiente fracción en importancia fue la materia orgánica (23-33% del Cr total en suelo). Bajo las circunstancias anteriores, el cromo no representa un riesgo significativo para la biota y la vegetación en el área de estudio por su baja biodisponibilidad [20].



**Figura 2.** Partición química de metales pesados a través de la zona vadosa



*Cobre.* Su contenido promedio en suelos cultivados oscila entre 10 y 40 mg/kg [18]. El cobre junto con el zinc son micronutrientes, sin embargo, a medida que se vuelven abundantes sus efectos adversos son evidentes. El Cu no se bioacumula a través de la cadena alimenticia lo cual minimiza sus efectos tóxicos. Su origen en suelos cultivados en parte es promovido por el uso extensivo de fertilizantes, bactericidas y fungicidas. En el sitio de estudio se encontró que este metal supera el rango promedio para suelos cultivados a lo largo de la ZV, concentrándose en las fracciones residual y materia orgánica, aunque también se distribuye de manera significativa en las fracciones carbonatos y óxidos de Fe y Mn. El cobre tiende a formar complejos con materiales arcillosos, hidróxidos metálicos y materia orgánica [14]. En suelos de naturaleza calcárea es ampliamente reconocida su asociación y retención debido a su tendencia a acumularse en las fracciones residual y de óxidos [21].

*Níquel.* El rango de concentración de este metal para suelos cultivados se encuentra entre 2 y 18 mg/kg [18]. Los procesos de adsorción/desorción de Níquel son importantes en suelos no contaminados de pH bajo mientras que los procesos de precipitación/disolución son favorecidos en suelos con pH elevado y con cantidades apreciables del metal. El Níquel suele ser fuertemente absorbido en las formas  $Ni^{+2}$  y  $NiOH^+$ . La mayor parte del Níquel que es desechado al ambiente termina siendo adsorbido por la materia orgánica y diversos materiales arcillosos contenidos en el suelo favoreciendo su inmovilización [22]. En la zona de estudio, la distribución de Níquel a través de la ZV se concentró principalmente en la fracción residual (~70%), seguida de la fracción de carbonatos (~11%) mientras que en el resto de las fracciones el contenido osciló entre 4 y 7%.

*Plomo.* Los efectos nocivos de plomo en los cultivos incluyen reducción de la actividad fotosintética, inhibición del crecimiento, reducción de la absorción de agua y transpiración. En suelos cultivados, este metal se encuentra en un rango que oscila entre 3 y 27 mg/kg [18]. En el sitio de estudio, se encontró en cantidades muy superiores al rango señalado sobre todo en los primeros 50 cm de profundidad superando los 200 mg/kg, siendo la fracción dominante la residual seguida de la materia orgánica. Por lo anterior, la ocurrencia de este metal es atribuible a la disposición de los residuos sólidos ya que suele estar presente en materiales cerámicos, plásticos, aleaciones, pigmentos y vidrio. En el suelo, el Pb es relativamente inmóvil debido a la tendencia a ser transformado en compuestos de baja solubilidad como sulfatos y fosfatos además de que forma complejos con materia orgánica y arcillas. Finalmente, se ha investigado la adsorción de este metal por calcita encontrando una elevada velocidad de adsorción en la superficie del mineral a pocos segundos de su contacto, sin embargo, este proceso no es irreversible por lo que la liberación del plomo por desorción es posible [23].

*Zinc.* Se encuentra en suelos cultivados en un rango promedio de concentración entre 37 y 68 mg/kg [18]. Su movilidad suele estar muy relacionada con el pH de los suelos, en general, el potencial de disolución disminuye drásticamente a valores de pH de 6 o superiores. La disminución de la solubilidad del zinc por el incremento del pH se debe a una mayor capacidad de adsorción de las superficies sólidas del suelo que incrementan sus cargas negativas atrayendo  $Zn^{+2}$  provocando a su vez la quimisorción en calcita y la coprecipitación en óxidos de Fe [24]. Por otro lado, el zinc tiende a formar complejos con la materia orgánica con relativa rapidez frenando la actividad del ion  $Zn^{+2}$  [25]. Los resultados de la partición química de este metal revelan que tiende a distribuirse preferentemente en las fracciones residual, materia orgánica y óxidos de Fe y Mn. El contenido de zinc superó el reportado en la literatura para suelos cultivados alcanzando concentraciones entre 100 y 230 mg/kg, esto hasta una profundidad de 200 cm.

## Conclusiones

El presente estudio demuestra la capacidad de impacto que poseen conjuntamente la actividad agrícola y la disposición de residuos sólidos tanto en suelo como en agua subterránea en sitios con escasa precipitación pluvial y nivel freático somero. Aunque las propiedades fisicoquímicas del suelo favorecen la retención de contaminantes, el riego agrícola y la variación del nivel freático a lo largo del año han contribuido a la contaminación del agua subterránea sobre todo en las épocas del riego en las que el nivel del agua se eleva hacia las capas menos profundas ocasionando el lavado y arrastre de solutos, entre ellos metales pesados, a pesar de la tendencia de estos a complejarse con las fracciones menos móviles del suelo. En general, el contenido de metales pesados (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn) se encontró en niveles que superan los rangos promedios encontrados en suelos cultivados preferentemente en los primeros 50 cm de profundidad.

## Referencias

- [1] I. N. de E. y G. INEGI, "Anuario estadístico y geográfico de Baja California 2017.", 2017. [En línea]. Disponible en: [http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/Productos/prod\\_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva\\_estruc/anuarios\\_2017/702825094874.pdf](http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/Productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva_estruc/anuarios_2017/702825094874.pdf).
- [2] J. Ramirez-Hernández, *Una visión de la problemática ambiental de Mexicali y su valle: elementos para su gestión*. UABC, 2006.
- [3] G. Judkins y S. Myint, "Spatial Variation of Soil Salinity in the Mexicali Valley, Mexico: Application of a Practical Method for Agricultural Monitoring", *Environ. Manage.*, vol. 50, núm. 3, pp. 478–489, sep. 2012.
- [4] K. Adhikari y S. Pal, "Assessment of Pollution Potential of Soil and Groundwater in a Non-Engineered MSW Landfill Site", *Int. J. Environ. Sci. Dev.*, vol. 7, pp. 207–210, ene. 2016.
- [5] T. Christensen *et al.*, "Biogeochemistry of Landfill Leachate Plumes", *Appl. Geochem.*, vol. 16, pp. 659–718, jun. 2001.
- [6] A. Sungur, M. Soylak, E. Yilmaz, S. Yilmaz, y H. Ozcan, "Characterization of Heavy Metal Fractions in Agricultural Soils by Sequential Extraction Procedure: The Relationship Between Soil Properties and Heavy Metal Fractions", *Soil Sediment Contam. Int. J.*, vol. 24, núm. 1, pp. 1–15, ene. 2015.
- [7] A. Tessier, P. G. C. Campbell, y M. Bisson, "Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals", *Anal. Chem.*, vol. 51, núm. 7, pp. 844–851, jun. 1979.
- [8] C. A. J. Appelo y D. Postma, *Geochemistry, Groundwater and Pollution*, 2a Ed. the Netherlands: A. A. Balkema Publishers, 2005.
- [9] C. W. Fetter, T. Boving, y D. Kremer, *Contaminant Hydrogeology: Third Edition*, 3a Ed. USA: Waveland Press, 2017.
- [10] S. I. de N. y E. de la C. SINEC, "NOM-021-SEMARNAT-2000, Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudio, muestreo y análisis.", *SINEC*, s.f. [En línea]. Disponible en: <http://www.sinec.gob.mx:80/SINEC/Vista/Normalizacion/DetalleNorma.xhtml?pidn=N2lrSU9jS05YUm5oc2Y3L2FLd mxSZz09>. [Consultado: 29-jul-2019].
- [11] E. Remoundaki *et al.*, "Groundwater Deterioration: The Simultaneous Effects of Intense Agricultural Activity and Heavy Metals in Soil", *Procedia Eng.*, vol. 162, pp. 545–552, ene. 2016.
- [12] S. K. Maiti, S. De, T. Hazra, A. Debsarkar, y A. Dutta, "Characterization of Leachate and Its Impact on Surface and Groundwater Quality of a Closed Dumpsite – A Case Study at Dhapa, Kolkata, India", *Procedia Environ. Sci.*, vol. 35, pp. 391–399, ene. 2016.
- [13] M. Alan y D. Kara, "Comparison of a new sequential extraction method and the BCR sequential extraction method for mobility assessment of elements around boron mines in Turkey", *Talanta*, vol. 194, pp. 189–198, mar. 2019.
- [14] J. Huang, R. Huang, y J. J. Jiao, "Speciation and mobility of heavy metals in mud in coastal reclamation areas in Shenzhen, China", *Environ. Geol.*, vol. 53, pp. 221–228, 2007.
- [15] A. Kubier, R. T. Wilkin, y T. Pichler, "Cadmium in soils and groundwater: A review", *Appl. Geochem.*, vol. 108, p. 104388, sep. 2019.

- [16] X. Zhao y M. Saigusa, "Fractionation and solubility of cadmium in paddy soils amended with porous hydrated calcium silicate", *J. Environ. Sci.*, vol. 19, núm. 3, pp. 343–347, mar. 2007.
- [17] H. Li, Z. Li, M. A. Khaliq, T. Xie, Y. Chen, y G. Wang, "Chlorine weaken the immobilization of Cd in soil-rice systems by biochar", *Chemosphere*, vol. 235, pp. 1172–1179, nov. 2019.
- [18] F. R. Siegel, *Environmental Geochemistry of Potentially Toxic Metals*. Springer Science & Business Media, 2002.
- [19] C. M. A. Iwegbue, F. N. Emuh, N. O. Isirimah, y A. C. Egun, "Fractionation, characterization and speciation of heavy metals in composts and compost-amended soils", *Afr. J. Biotechnol.*, vol. 6, núm. 2, ene. 2007.
- [20] S. Raptis, D. Gasparatos, M. Economou-Eliopoulos, y A. Petridis, "Chromium uptake by lettuce as affected by the application of organic matter and Cr(VI)-irrigation water: Implications to the land use and water management", *Chemosphere*, vol. 210, pp. 597–606, nov. 2018.
- [21] E. Kelepertzis, F. Botsou, C. Patinha, A. Argyraki, y I. Massas, "Agricultural geochemistry in viticulture: An example of Cu accumulation and geochemical fractionation in Mediterranean calcareous soils (Nemea region, Greece)", *Appl. Geochem.*, vol. 88, pp. 23–39, ene. 2018.
- [22] W. Sun, X. Zhang, X. Sun, Y. Sun, y Y. Cen, "Predicting nickel concentration in soil using reflectance spectroscopy associated with organic matter and clay minerals", *Geoderma*, vol. 327, pp. 25–35, oct. 2018.
- [23] A. A. Rouff, R. J. Reeder, y N. S. Fisher, "Pb (II) Sorption with Calcite: A Radiotracer Study", *Aquat. Geochem.*, vol. 8, núm. 4, pp. 203–228, dic. 2002.
- [24] B. J. Alloway, "Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans", *Environ. Geochem. Health*, vol. 31, núm. 5, pp. 537–548, oct. 2009.
- [25] M. C. Hernandez-Soriano y J. C. Jimenez-Lopez, "Effects of soil water content and organic matter addition on the speciation and bioavailability of heavy metals", *Sci. Total Environ.*, vol. 423, pp. 55–61, abr. 2012.

# Wood Wide Web: communication through the mycorrhizal network

## Internet de las plantas: comunicación a través de la red micorrízica

Ana Lucía Castro-Delgado<sup>1</sup>, Stephanie Elizondo-Mesén<sup>2</sup>,  
Yendri Valladares-Cruz<sup>3</sup>, William Rivera-Méndez<sup>4</sup>


*Fecha de recepción: 5 de setiembre de 2019*

*Fecha de aprobación: 28 de enero de 2020*

Castro-Delgado, A; Elizondo-Mesén, S; Valladares-Cruz, Y; Rivera-Méndez, W. Wood Wide Web: communication through the mycorrhizal network. *Tecnología en Marcha*. Vol. 33-4. Octubre-Diciembre 2020. Pág 114-125.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v33i4.4601>


1 Estudiante. Ingeniería en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: aluca167@gmail.com.

 <https://orcid.org/0000-0003-0011-9880>

2 Estudiante. Ingeniería en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: stephanieelizondo73@gmail.com.

 <https://orcid.org/0000-0002-7286-2254>

3 Estudiante. Ingeniería en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: yendrirc@gmail.com.

 <https://orcid.org/0000-0001-9606-0822>

4 Investigador. Escuela de Biología, Ingeniería en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: wirivera@itcr.ac.cr.

 <https://orcid.org/0000-0002-2065-6264>



## Keywords

Ectomycorrhizas; arbuscular mycorrhizas; symbiosis; plants communication; carbon exchange.

## Abstract

Mycorrhizal fungi are classified as ectomycorrhizae (EM) and endomycorrhizae, which include arbuscular mycorrhizas (AM). They colonize over 80% of land plants roots and provides them with nutrients from the soil and a hyphal network named wood wide web. This review describes the interactions in which mycorrhizal networks are involved. From a practical point of view, EM can be more beneficial than AM for plant development and the relationship between fungi and plants is conditioned by external factors. The investigation also showed that mycelium can transfer a wide variety of compounds and signals among plants that can modify their behaviour to protect the network as a whole. Carbon transfer is an important tool to achieve that and can promote forests regeneration. These findings emphasize the complexity of forests relations, and the importance of study their dynamics to guarantee its conservation.

## Palabras clave

Ectomicorrizas; micorriza arbuscular; simbiosis; comunicación de plantas; intercambio de carbono.

## Resumen

Los hongos micorrícicos se clasifican como ectomicorrizas (EM) y endomicorrizas, que incluyen micorrizas arbusculares (AM). Colonizan más del 80% de las raíces de las plantas terrestres, proporcionando nutrientes del suelo y formando una red de hifas llamada internet de las plantas (wood wide web). En esta revisión se describen las interacciones en las que están involucradas las redes de micorrizas. Desde un punto de vista práctico, las EM pueden ser más beneficiosa que la AM para el desarrollo de las plantas y la relación entre hongos y plantas está condicionada por factores externos. La investigación también mostró que el micelio puede transferir una amplia variedad de compuestos y señales entre las plantas, que pueden modificar su comportamiento para proteger la red en su conjunto. La transferencia de carbono es una herramienta importante para lograrlo y puede promover la regeneración de los bosques. Estos hallazgos enfatizan la complejidad de las relaciones en los bosques y la importancia de estudiar su dinámica para garantizar su conservación.

## Introduction

The transition of plants to the earth, 470 million years ago, was based on the emergence of cooperation between plants and soil microorganisms, supported according to fossil records and the conserved mechanism for recognition between organisms [1].

Globally, in over 80% of land plants, roots associated with the soil fungi, forming chimeric organs called mycorrhizae, and numerous ecosystems are dominated by mycorrhizal plants, in a gram of soil can be meters of mycorrhizal hyphae. This suggests mycorrhizal fungi may represent the most abundant plant mutualist [2]. The word mycorrhiza is the union of the Greek terms associated with “fungi” and “root”. Mycorrhizal fungi create an extensive net of hyphae in the soil, the place called the internet of plants, which can be related to plant plants to offer an efficient horizontal transfer of nutrients [3].

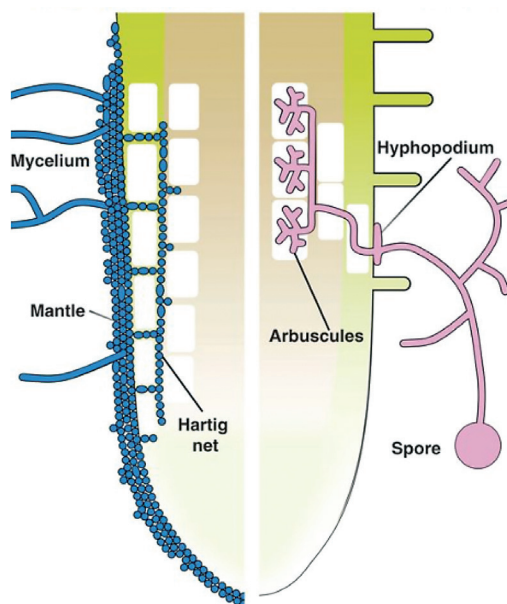
Mycorrhizal fungi classification cannot be realized easily, since, mycorrhizal fungi are a variable aggregate of species distributed in various fungal taxa [4]. Commonly, mycorrhizae are classified in ectomycorrhizae (EM) when the hyphae form networks in the intercellular spaces of the root, and endomycorrhizae when they colonize the inside of the cells. Endomycorrhizae is divided into orchids, ericoids and arbuscular mycorrhizae (AM) [3].

The life cycle of mycorrhizal fungi has a stage in which these are not associated with the root; however, the rest of the time, they are always associated with higher plants, such as forest species and grasses, among others. They have an important role in the cycle of nutrients through the specific activity of their mycelium to absorb nutrients from the soil and provide them to the plant [4].

This review seeks to provide an overview of mycorrhizal interactions between the fungus and the plant, the connection between plants mediated by mycorrhizal networks and special emphasis on the transfer of carbon through mycorrhizae, conducting a compilation of updated research on the subject.

### Plant-mycorrhizal interaction

The plant-mycorrhizal interaction can occur mainly in two ways: by ectomycorrhizae (EM) or by arbuscular mycorrhizae (AM).



**Figure 1.** Root colonization in EM (left) and AM (right) interactions. Obtained from [4].

To begin with, ectomycorrhizae interactions are described. Mechanism of formation of the ectomycorrhizal fungus begins when a layer of thick and closely formed hyphae surrounds the tip of the root, then, the Hartig network, which are hyphae surrounding the epidermal cells, forms inside the root (see figure 1). EM fungi have a dual lifestyle: they live as symbionts when they colonize the lateral roots of trees with mycorrhizae coating and can also live in plant roots, as facultative saprotrophs in the soil, in addition, their growth capacities in Petri dishes have been demonstrated [4].

On the other hand, arbuscular mycorrhizae do not colonize the tip of the root. Since only a hifopodium forms in the epidermis of the root, which comes from a hypha generated from a spore. Finally, colonization occurs both between the intercellular spaces and within the cell where arbuscules are formed, which are hyphae in the shape of a small tree [4].

### **Influence of the mycorrhizal interaction in the nutrition of plants**

The factors that regulate the diversity of plant species are not yet determined. However, an important factor is the relationships established between the plant and other organisms, whether beneficial or not.

A relevant relationship is the symbiosis between plant and fungi, which directly influences the nutrition of the plants and therefore their development. Nevertheless, the benefit of this interaction depends on the type of mycorrhiza that forms, in particular between dominant arbuscular mycorrhizae (AM) and ectomycorrhizae (EM).

For instance, EM interaction provides better access and transfer of nitrogen to its associates, so that adult trees with EM more systematically facilitate the recruitment of seedlings than trees with AM [5]. This makes EM mycorrhizae more beneficial in systems with nitrogen limitation [6].

In addition, it has been confirmed that EM fungi offer greater protection against pathogens than AM fungi because they form an envelope at the tip of the root [7]. By the above mechanisms, the survival of young EM plants is greater than that of AM seedlings. Therefore, plant-soil feedback may be more negative for plants with AM mycorrhizae than those of EM plants.

Research conducted by [8], indicates; first, most species of EM have shown positive plant-soil feedback and, on the contrary, most AM species shows negative feedback. In addition, the phylogenetic distribution of mycorrhizae and not of trees determines phylogenetic influences in plant-soil feedback, however, this does not occur in all environment. Plant-soil feedback continued negative for AM plants and positive for EM plants, regardless of the substrate used for growth. This indicates that plant-soil feedback strongly influences the type of mycorrhiza present. However, there is a possibility that the plant-soil feedback for the different types of mycorrhizae is influenced by other factors that are not controlled or measured as the availability of nitrogen in its different forms.

Second, the EM roots had greater mycorrhizal colonization and maintained the size of the radicular lesions in the different duels, which indicates a certain specificity in the EM relationship. On the contrary, the colonization of the AM roots was similar in different soils but with more radicular lesions. In addition, greater lesion density than the colonization density for the two types of mycorrhizae was observed, possibly due to competition for space at the root of the resources, although the densities of the lesions for the AM species remained high, except for the trees with more mycorrhizae.

By combining the above results, it could be inferred that young EM plants benefit more from the abundance of specific EM fungi that protect them more from antagonists, whereas compatible AM fungi are less specific and appear everywhere, AM seedlings are more damaged by the pathogens, probably because AM colonization provides less protection.

Therefore, EM fungi improve the survival of plants by reducing root damage. However, to reach a conclusion, more extensive tests are needed to establish if this fact shown in all plants with mycorrhiza EM. Since, the improvement in plants could be due to indirect effects such as improvement in nutrition and not direct protection against antagonists.

### Evolutionary stability of mycorrhizal interaction

One of the great questions regarding mycorrhizae is how this symbiosis has evolved successfully, despite the diversity of resources provided by fungi (protection against pathogens, tolerance to drought, trace elements and vitamins) [9]. Accordingly, until now, it is not known how the plant can evaluate and favor a specific fungus according to the benefits offered.

Second, giving resources to another agency is considered a high expense, however, fungi often reduce the root:shoot proportion of the host plants, which reduces the carbon assigned to the roots and reduces the cost of associating with AM fungi. Furthermore, in EM associations organic carbon may be in greater quantity than is necessary for the plant, thus, it is not an expensive resource for plants [10]. The exchange of these surpluses could be beneficial for both partners if none the carbon for the seedling nor the nutrients for the fungus are limited. In complex associations, plants are not necessarily able to discriminate among the associated fungi. Therefore, the carbon can be distributed in a non-directional way between the fungal partners present in the root system. In this scenario, carbon is considered to be a good of everyone, enjoyed by the most and least beneficial symbiotes [11]. It has been shown that the exchange of such commons is evolutionarily stable [12]. Similarly, if the cost of relating to cheaters is low, the regulation of biological markets is less important for evolutionary stability.

Third, the costs and benefits of symbiosis differ greatly with the temporal and environmental context [13]. To cite an example, the relative accessibility of phosphorus and nitrogen in the substratum greatly influences the beneficial effects of the symbiosis. Soils limited in phosphorus, it has been shown that fungi are beneficial for plants, whereas in soils limited in nitrogen the same fungi can suppress growth [14]. Consequently, the symbiotic relationship should be considered as a “conditional mutualism” since it can not be beneficial in all situations. Therefore, for a symbiote, it is complicated to estimate the benefit of a current relationship, since investing now in a non-beneficial partner may be important for future survival under different environmental situations [15]. To cite an instance, the exchange of resources does not immediately match in time but is done on the basis of “receive now, give later” [16]. In conclusion, the identity of the partners and factors such as the environment, the efficient acquisition of complementary resources, strict reciprocity and multifunctionality directly influence cooperation in the mycorrhizal symbiosis.

### Plant-to-plant interactions

Mycorrhizal networks that colonize plants roots can cause rapid changes in their behaviour, in response to biochemical communication that fungi transmit through them. In plants, behaviour is defined as the response to environmental stimuli, expressed by changes in morphology or physiology that are not part of the basic development processes [17]. This plant-to-plant dialogue leads to changes in root and shoot growth, photosynthetic rate, nutrition, defense against plagues and pathogens, drought resistance, among others; and the relation can be between individuals of the same species, with a specific response if they are the same kin or not, and between unrelated species.

The behaviour of plants connected to a mycorrhizal network depends on the nature of the organisms involved, the environmental conditions and the specific needs of each of participants in the communication, including the mycorrhizal fungus [18]. For instance, if the network receives more carbon than it requires from a plant, the excess could be transferred to another plant in need, to protect a potential carbon source for the future. For the fungus, having a greater variety of plants populations brings more stability and lower risk than rely on a single group of similar organisms [19], as a broader range of stress response signaling and nutrients donors can benefit the whole connected community, therefore the fungus [20]. Even though the mycorrhiza prefers a variety of species in the network, the plants expose different responses to the net whether the connected plants are related or not, as highlighted in the following sections.



### Intraspecific communication: protection of seedlings and kin plants

Despite the widespread belief that trees relations in a forest are exclusively competition, conspecific plants have developed strategies to protect each other and promote their development, and mycorrhizal networks represent an important tool for this. For instance, the resource transfer through fungus has an important impact in the regeneration of mono-specific forests, as it has been demonstrated in Douglas-fir forests (*Pseudotsuga menziesii*) by many authors. It was found by [21] that older trees transfer carbon, nitrogen, and water to seedlings to encourage rapid development of their photosynthetic rates, while [22] alleged that when humidity is limited, redistributed water through mycorrhiza allows shallow-rooted seedlings to maintain the hydraulic potential of the stand structures. This behaviour present plasticity, i.e., the transference of water and nutrients are not directly related to each other, instead, it happens according to the specific needs of the ecosystem in a place and moment. This intelligence in the management of resources leads to improved seedling survival, increasing the regenerative capacity of the forest even under conditions modified by climate change, as drought stress, by transferring water from replete to stressed individuals [23].

Besides water and nourishment, mycorrhizal networks also convey biochemical signals when a plant is under the attack of a plague or parasite. This signaling triggers a behavioural response in foliar defense chemistry or pest resistance, as reported by [24], they discovered that when a plant of broad beans (*Vicia faba*) connected to a network is attacked by aphids, it sends a message to neighbouring plants, which respond by producing methyl salicylate, to cause repellency to the attackers and attraction to aphid-enemies like parasitoids.

The relatedness of the plants joined by the mycorrhizal fungus determines their behaviour. It was discovered that individuals of common ragweed (*Ambrosia artisiifolia* L.) showed better foliar nutrition when they were grown with siblings than when growth with conspecific strangers and this improvement was directly related with higher root colonization and fungi growth [25]. This plant kin recognition is supposed to be related to root exudates that give the mycorrhizal fungus information about the genetic identity of the plant [26], and mycorrhizal fungi can identify and transfer this information to the plants. Other studies over the Douglas-fir mycorrhizal network found that more carbon is transmitted to younger kin plants than to stranger seedlings, giving the kin buds more opportunities to grow and development [27].

### Interspecific cooperation in favor of the community

Although plants conduct efforts to favour the survival of kin individuals, for the fungi this relatedness lacks importance provided that it has a durable carbon source. This causes that mycorrhizal networks generate pathways between plants for transferring nutrients, water, and biochemical signaling, creating interspecific relations. As mentioned before, mixed species contribute to the stability of the mycorrhiza, due to the lower risk of losing the whole carbon source in comparison to monocultures [17]. These situations do not seem to be equally beneficial to the involved plants, for example, it was found that in a mixed culture, flax received huge percentages of nitrogen and phosphorus from the mycorrhiza, and it gave in return small amounts of carbon. On the other hand, sorghum plants invested significant amounts of carbon and gained few nutrients, resulting in no positive growth effects for sorghum. In spite of the seemingly obvious disadvantage for the sorghum, both crops were more productive when they were mixed, although one of them received more resources from the network [28].

It was discussed before that Douglas-fir trees donate resources to protect conspecific seedlings, but in addition, they can transfer photosynthates to nearby plants belonging to the unrelated species paper birch (*Betula papyrifera*), and these neighbours pass the same amounts of carbon back in a different season [29]. Another investigation conducted by [30] found that Douglas-

fir cooperates with ponderosa pine (*Pinus ponderosae*) when one of them result damaged. Defoliation of Douglas-fir caused by western spruce budworm triggered the transference of carbon from the damaged tree to neighbouring ponderosa pines, and also the recipient of the message increased the activity of defense-related enzymes. Although the damaged tree does not seem to receive a direct benefit, the permanence and strength of the mycorrhizal network and the other trees will benefit the health of the forest.

These examples shed light upon the reasons that encourage a plant to donate to the mycorrhiza carbon that may be transferred to a plant that is not related to it, and send defense signals when suffering the attack of a pathogen or herbivores. Being connected to a diverse mycorrhizal network represents an evolutionary advantage because the mycorrhiza acquires more adaptive capability due to the variety of responses of the various species, and simultaneously gives the plants tools to cope with the variability of the environment effectively [17].

As well as beneficial compounds and signaling can travel through fungus mycelium, mycorrhizal networks can distribute allelochemicals and herbicides in the soil, increasing the negative effect in exposed plants. Tomato plants have shown reduced growth due to the strong contribution of mycorrhiza to the transport of naturally released juglone, an allelochemical produced by *Juglans regia* [31]. Another study [32] reports the facilitation of allelochemicals and herbicides through mycorrhizal networks, affecting the development of receiver plants. Another competitive response is the increase in the production of the allelopathic compounds conducted by wheat (*Triticum aestivum*) when close neighbours are detected through the mycorrhizal network [33].

## Carbon Exchange

Over the years the importance of the carbon cycle has been known, but knowledge about the reservoirs that exist on the planet is very limited, interest in this topic has been growing due to the risk in which biodiversity is found in the forests, therefore, its importance to understand the evolution and biogeography of mycorrhizal fungi and their fundamental role in the carbon cycle and the earth's climate system [34]. Over time, the benefits of mycorrhizae have been studied from a nutrient supply perspective, but until recent years research has focused on how these underground roads formed by large amounts of mycorrhizal fungal hyphae are able to transfer considerable quantities (> 1 g) of mobile carbon compounds between networks established between trees [35]. According to [36] up to 20% of the carbon fixed by the plant is transferred to the mycorrhizae.

In the last decades the developed studies have sought convincingly to determine that one of the most important functions of mycorrhizae is the ability to connect trees of the same or different species. These functional associations have been demonstrated in species such as *Alnus*, *Betula*, *Larix*, *Picea*, *Pinus* and *Pseudotsuga* interconnected by mycorrhizae that belong to the genders *Amanita*, *Paxillus*, *Pisolithus*, *Scleroderma*, *Suillus* and *Thelephora* [37]. But until August 1997, ecology professor Suzanne Simard and her collaborators suggested for the first time that mycorrhizal networks connected different tree species and that the carbon transfer that occurred between them was bidirectional [38].

In order to suggest that this exchange between trees or plants occurs, a series of questions were raised, including how much carbon was transferred, since if only small quantities were involved, this process did not have a relevant importance at the ecological and physiological level. Therefore, whether the transferred carbon was moved to the cells of the plant or remained in the fungal structures, this was due to the fact that if it remained inside the fungus it could not be used by the plant as a carbon source, so it would not influence the competitive relationships between neighboring plants. Another important question is the direction of the transfer, if this

occurred in one direction could be a parasitism and not a symbiotic relationship and finally, focuses on the role played by the links between hyphae, if the transfer of Carbon was produced mostly through the soil would relate to the normal carbon cycle and it would not be necessary to think that mycorrhizal networks played an important role in the process, otherwise if it was proven that mycorrhiza greatly influenced the transfer, converting them into physiologically and ecologically important elements.

### **Stable labeling of carbon isotopes**

To answer the series of questions established by Simard, research has focused on procedures for stable labeling of carbon isotopes, it is necessary to clarify that the labels have been given several decades ago with various isotopes in order to demonstrate the capacity of the mycorrhizae to mobilize water, carbon, phosphorus and nitrogen in interconnected plants or trees but recently the procedures are based on demonstrating and quantifying the transfer of carbon between the same or different species of plants or trees that are in the same area.

Isotopes are different forms of the same chemical element that have the same atomic number of protons but different number of neutrons [39], the process that is part of the labeling is the isotopic fractionation, which is based on the mass differences between the isotopes of the same element causing them to behave differently in many environmental and physiological processes, producing variations in their relative abundance causing an increase or decrease in proportions [40].

The isotopes used in the investigations have been the stable isotope of carbon dioxide C-13 and the radioactive carbon dioxide gas C-14 [41]. According to [38] the process consists of taking at least three different species of trees as samples, covering them with plastic bags and injecting them with a different isotope to each one, this is done in order to prove if there is a two-way communication between the species, it is estimated that in an hour the samples will absorb CO<sub>2</sub> through photosynthesis, transform them into sugar and send it to the roots. It was checked through the isotopes, that if one of the samples was blocked preventing it from absorbing sunlight, the other species connected to the network was going to transfer the carbon it required, affirming the communication or bidirectional transfer that Simard indicated, while if any of the three species was not part of that connection there would be no transfer.

### **Interaction between trees**

One of the factors that most influence this transfer is the season of year, since according to the species that are interconnected these will have morphological and physiological changes seeking to adapt the environment, which will have greater or lesser need for carbon, therefore, they will take on the role of emitter or receiver [42], which would make the trees cooperative rather than competitors as has always been believed.

From this it began to be known that the huge network formed by mycorrhizas were the cause of this communication, which worked as the internet, where everyone could communicate with everyone, it was discovered that there were mother trees or nuclei that fed the youngest [43], in a single forest these nuclei could be connected with thousands of trees and even small seedlings, making these last ones have a higher survival rate thanks to the large amount of nutrients and carbon that are transferred to them.

These nuclei or mother trees have a greater connection with those of the same species, send larger amounts of carbon to the seedlings that are their relatives, even colonize them with larger mycorrhizal networks and reduce the competition of their own roots by creating their children a "protection" framework [44]. When the mother trees are wounded or dying they send wisdom signals to their seedlings, increasing the carbon transferred and the defense signals, teaching the future generations to resist all the factors that threaten their survival, increasing all the resistance in that community.

All this leads us to think about the importance not only of the trees but also of the network that they make up and how the constant felling attacks against all that wisdom, all that feedback and resistance that the larger trees and their network of mycorrhizae provide.

## Conclusions

It is necessary to visualize forests as complex systems with a high capacity for self-regeneration thanks to all that information that crosses the mycorrhizal networks, how they allow a diversity of species, genes and genotypes to interlace to form a community resistant to the constant change that suffers the planet. This research gave a general vision, starting from the small unit called mycorrhiza, to a huge network formed by thousands of trees and plants connected to each other, forming a cooperative relationship to guarantee their survival. It is imperative to propose solutions to the threat of losing that communication and that important balance generated by this network, consider actions such as becoming more involved with the importance of forests to preserve all natural processes correctly, conserve mother trees and networks since these are genetic repositories that allow knowledge to be transmitted, we must cut down less and reforest more, but in an intelligent and diverse way and thus guarantee that all this varied interaction establishes a resistance to the imminent damage that the human being is generating to the Earth.

## References

- [1] M. A. Selosse, y F. Rousset, "The plant-fungal marketplace," *Science*, vol. 333, pp. 828-829, 2011. doi:10.1126/science.1210722
- [2] K. O. Reinhart, G. W. Wilson, y M. J. Rinella, "Predicting plant responses to mycorrhizae: integrating evolutionary history and plant traits," *Ecology Letters*, vol. 15, pp. 689-695, 2012. doi.org/10.1111/j.1461-0248.2012.01786.x
- [3] O. Alizadeh, "Mycorrhizal symbiosis," *Advanced Studies in Biology*, vol. 6, pp. 273-281, 2011.
- [4] P. Bonfante, y A. Genre, "Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis," *Nature communications*, vol. 1, pp. 82-86, 2010. doi:10.1038/ncomms1046
- [5] M. G. Van Der Heijden, y T. R. Horton, "Socialism in soil? The importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems," *Journal of Ecology*, vol. 97, pp. 1139-1150, 2009. doi.org/10.1111/j.1365-2745.2009.01570.x
- [6] A. Corrales, S. A. Mangan, B. L. Turner, y J. W. Dalling, "An ectomycorrhizal nitrogen economy facilitates monodominance in a neotropical forest," *Ecology Letters*, vol. 19, pp. 383-392, 2016. doi.org/10.1111/ele.12570
- [7] E. Laliberté, H. Lambers, T. I. Burgess, y S. J. Wright, "Phosphorus limitation, soil-borne pathogens and the coexistence of plant species in hyperdiverse forests and shrublands," *New Phytologist*, vol. 206, pp. 507-521, 2015. doi: 10.1111/nph.13203
- [8] J. A. Bennett, H. Maherali, K.O. Reinhart, Y. Lekberg, M. M. Hart, y J. Klironomos, "Plant-soil feedbacks and mycorrhizal type influence temperate forest population dynamics," *Science*, vol. 355, pp. 181-184, 2017. doi:10.1126/science.aai8212
- [9] S. E. Smith, y D. J. Read, "The symbionts forming arbuscular mycorrhizas," *Mycorrhizal symbiosis*, vol. 2, pp. 13-41, 2008.
- [10] A. Corrêa, J. Gurevitch, M. A. Martins-Loução, y C. Cruz, "C allocation to the fungus is not a cost to the plant in ectomycorrhizae," *Oikos*, vol. 121, pp. 449-463, 2012. doi.org/10.1111/j.1600-0706.2011.19406.x
- [11] M. Archetti, y I. Scheuring, "Trading public goods stabilizes interspecific mutualism," *Journal of theoretical biology*, vol. 318, pp. 58-67, 2013. doi:10.1016/j.jtbi.2012.10.022
- [12] T. M. Fayle, D. P. Edwards, E. C. Turner, A. J. Dumbrell, P. Eggleton, y W. A. Foster, "Public goods, public services and by-product mutualism in an ant-fern symbiosis," *Oikos*, vol. 121, no. 8, pp. 1279-1286, 2011. doi:10.1111/j.1600-0706.2011.20062.x
- [13] N. C. Jhonson, "Resource stoichiometry elucidates the structure and function of arbuscular mycorrhizas across scales," *New Phytologist*, vol. 185, no. 3, pp. 631-647, 2010. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.03110.x

- [14] N. C. Johnson, G. W. Wilson, M. A. Bowker, J. A. Wilson, y R. M. Miller, "Resource limitation is a driver of local adaptation in mycorrhizal symbioses," *Proceedings of the National Academy of Science*, vol. 107, no. 5, pp. 2093-2098, 2010. doi:10.1073/pnas.0906710107
- [15] Y. Lekberg, y R. T. Koide, "Integrating physiological, community and evolutionary perspectives on the arbuscular mycorrhizal symbiosis," *Botany*, vol. 92, no. 4, pp. 241-251, 2013. doi:10.1139/cjb-2013-0182
- [16] K. J. Field, J. R. Leake, S. Tille, K. E. Allinson, W. R. Rimington, M. I. Bidartondo, D. J. Beerling, y D. D. Cameron, "From mycoheterotrophy to mutualism: mycorrhizal specificity and functioning in *Ophioglossum vulgatum* sporophytes," *New Phytologist*, vol. 205, no. 4, pp. 1492-1502, 2015. doi:10.1111/nph.13263
- [17] M. A. Gorzelak, A. K. Asay, B. J. Pickles, y S. W. Simard, "Inter-plant communication through mycorrhizal networks mediates complex adaptive behaviour in plant communities," *AoB PLANTS*, vol. 7, 2015. doi:10.1093/aobpla/plv050
- [18] N. A. Hynson, S. Mambelli, A. S. Amend, y T. E. Dawson, "Measuring carbon gains from fungal networks in understory plants from the tribe Pyroleae (Ericaceae): a field manipulation and stable isotope approach," *Oecologia*, vol. 169, no. 2, pp. 307-317, 2011. doi:10.1007/s00442-011-2198-3
- [19] G. L. W. Perry, N. J. Enright, B. P. Miller, y B. B. Lamont, "Spatial patterns in species-rich sclerophyll shrublands of southwestern Australia," *Journal of Vegetation Science*, vol. 19, no. 5, pp. 705-716, 2008. doi:10.3170/2008-8-18441
- [20] E. T. Kiers, M. Duhamel, Y. Beesetty, J. A. Mensah, O. Franken, E. Verbruggen, C. R. Fellbaum, G. A. Kowalchuk, M. M. Hart, A. Bago, T. M. Palmer, S. A. West, P. Vandenkoornhuysse, J. Jansa, y H. Bucking, "Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis," *Science*, vol. 333, no. 6044, pp. 880-882, 2011. doi:10.1126/science.1208473
- [21] F. P. Teste, S. W. Simard, D. M. Durall, R. D. Guy, y S. M. Berch, "Net carbon transfer between *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* seedlings in the field is influenced by soil disturbance," *Journal of Ecology*, vol. 98, no. 2, pp. 429-439, 2010. doi:10.1111/j.1365-2745.2009.01624.x
- [22] K. J. Beiler, S. W. Simard, y D. M. Durall, "Topology of tree-mycorrhizal fungus interaction networks in xeric and mesic Douglas-fir forests," *Journal of Ecology*, vol. 103, no. 3, pp. 616-628, 2015. doi:10.1111/1365-2745.12387
- [23] M. A. Bingham, y S. W. Simard, "Do mycorrhizal network benefits to survival and growth of interior Douglas-fir seedlings increase with soil moisture stress?," *Ecology and evolution*, vol. 1, no. 3, pp. 306-316, 2011. doi:10.1002/ece3.24
- [24] Z. Babikova, L. Gilbert, T. J. A. Bruce, M. Birkett, J. C. Caulfield, C. Woodcock, J. A. Pickett, y D. Johnson, "Underground signals carried through common mycelial networks warn neighbouring plants of aphid attack," *Ecology Letters*, vol. 16, no. 7, pp. 835-843, 2013. doi:10.1111/ele.12115
- [25] A. L. File, J. Klironomos, H. Maherali, y S. A. Dudley, "Plant kin recognition enhances abundance of symbiotic microbial partner," *PLoS One*, vol. 7, no. 9, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0045648
- [26] M. Semchenko, S. Saar, y A. Lepik, "Plant root exudates mediate neighbour recognition and trigger complex behavioural changes," *New Phytologist*, vol. 204, no. 3, pp. 631-637, 2014. doi:10.1111/nph.12930
- [27] B. J. Pickles, R. Wilhelm, A. K. Asay, A. S. Hahn, S. W. Simard, y W. W. Mohn, "Transfer of <sup>13</sup>C between paired Douglas-fir seedlings reveals plant kinship effects and uptake of exudates by ectomycorrhizas," *New Phytologist*, vol. 214, no. 1, pp. 400-411, 2016. doi:10.1111/nph.14325
- [28] F. Walder, H. Niemann, M. Natarajan, M. F. Lehmann, T. Boller, y A. Wiemken, "Mycorrhizal Networks: common goods of plants shared under unequal terms of trade," *Plant Physiology*, vol. 156, no. 2, pp. 789-797, 2012. doi:10.1104/pp.112.195727
- [29] L. Philip, S. Simard, y M. Jones, "Pathways for below-ground carbon transfer between paper birch and Douglas-fir seedlings," *Plant Ecology & Diversity*, vol. 3, no. 3, pp. 221-233, 2010. doi:10.1080/17550874.2010.502564
- [30] Y. Y. Song, S. W. Simard, A. Carrol, W. W. Mohn, y R. S. Zeng, "Defoliation of interior Douglas-fir elicits carbon transfer and stress signalling to ponderosa pine neighbors through ectomycorrhizal networks," *Scientific Reports*, vol. 5, no. 1, 2015. doi:10.1038/srep08495
- [31] M. Achatz, E. K. Morris, F. Müller, M. Hilker, y M. C. Rilling, "Soil hypha-mediated movement of allelochemicals: arbuscular mycorrhizae extend the bioactive zone of juglone," *Functional Ecology*, vol. 28, no. 4, pp. 1020-1029, 2014. doi:10.1111/1365-2435.12208
- [32] E. K. Barto, M. Hilker, F. Müller, B. K. Mohny, J. D. Weidenhamer, y M. C. Rilling, "The fungal fast lane: common mycorrhizal networks extend bioactive zones of allelochemicals in soils," *PLoS One*, vol. 6, no. 11, p. e27195, 2011. doi:10.1371/journal.pone.0027195



- [33] C. H. Kong, S. Z. Zhang, Y. H. Li, Z. C. Xia, X. F. Yang, S. J. Meiners, y P. Wang, "Plant neighbor detection and allelochemical response are driven by root-secreted signaling chemicals," *Nature communications*, vol. 9, no. 1, 2018. doi:10.1038/s41467-018-06429-1
- [34] I. Alexander. & M. A. Selosse, "Mycorrhizas in tropical forests: a neglected research imperative", *New Phytologist*, vol. 182 , pp. 14-16. 2019
- [35] T. Klein, R. T. Siegwolf & C. Körner, "Belowground carbon trade among tall trees in a temperate forest", *Science*, vol. 352, pp. 342-344, 2016.
- [36] G. Kaschuk, T. W. Kuyper, P. E. Leffelaar, M. Hungria & K. E. Giller, "Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses?", *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 41, pp. 1233-1244, 2009.
- [37] J. Pérez & D. Read, "Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza", *Interciencia*, vol. 29, pp. 239-247, 2004.
- [38] S. W. Simard, D. A. Perry, M. D. Myrold, D. D. Durall & R. Molina, "Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field", *Nature*, vol. 388, pp. 579, 1997.
- [39] A. Vidal, (2017) "Los isótopos estables de carbono y nitrógeno como biomarcadores para la trazabilidad alimentaria" [Online]. Available: [https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/19621/VidalFernandez\\_Alejandra\\_TFG\\_2017.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/19621/VidalFernandez_Alejandra_TFG_2017.pdf?sequence=2&isAllowed=y)
- [40] F. Crawford, R. A. McDonald & S. Bearhop, "Applications of stable isotope techniques to the ecology of mammals", *Mammal Review*, vol. 38, pp. 87-107, 2008.
- [41] T. E. Dawson, S. Mambelli, A. H. Plamboeck, P. H. Templer & K. P. Tu, "Stable isotopes in plant ecology", *Annual review of ecology and systematics*, vol. 33, pp. 507-555, 2002.
- [42] D. L. Jones, C. Nguyen & R. D. Finlay, "Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil-root interface", *Plant and soil*, vol. 321, pp. 5-33, 2009.
- [43] S. W. Jones, M. D. Jones & D. M. Durall, "Carbon and nutrients fluxes within and between mycorrhizal plants", *Mycorrhizal ecology*, pp. 33-74, 2003.
- [44] S. W. Simard & D. M. Durall, "Mycorrhizal networks: a review of their extent function and importance, *Canadian Journal of Botany*, vol. 82. p.p 1140-1165, 2004.

# C-ficocianinas: modulación del sistema inmune y su posible aplicación como terapia contra el cáncer

## C-phyco cyanins: immune system modulation and its possible application as therapy against cancer

Álvaro Esteban Alfaro-Alfaro<sup>1</sup>, Valerie Alpízar-Cambroner<sup>2</sup>,  
Ana Iris Duarte-Rodríguez<sup>3</sup>, Joana Feng-Feng<sup>4</sup>,  
Christopher Rosales-Leiva<sup>5</sup>, Juan José Mora-Román<sup>6</sup>

*Fecha de recepción: 12 de setiembre de 2019*  
*Fecha de aprobación: 3 de febrero de 2020*

Alfaro-Alfaro, A; Alpízar-Cambroner, V; Duarte-Rodríguez, A; Feng-Feng, J; Rosales-Leiva, C; Mora-Román, JJ. C-ficocianinas: modulación del sistema inmune y su posible aplicación como terapia contra el cáncer. *Tecnología en Marcha*. Vol. 33-4. Octubre-Diciembre 2020. Pág 125-139.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v33i4.4653>



- 1 Estudiante de Licenciatura en Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: alvaro.alfarofar@ucr.ac.cr.
- 2 Estudiante de Licenciatura en Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: valerie.alpizar@ucr.ac.cr.
- 3 Estudiante de Licenciatura en Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: ana.duarte@ucr.ac.cr.
- 4 Estudiante de Licenciatura en Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: joana.feng@ucr.ac.cr.
- 5 Estudiante de Licenciatura en Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: christopher.rosalesleiva@ucr.ac.cr
- 6 Máster en Bioquímica, Departamento de Farmacia Industrial, Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: juanjose.moraroman@ucr.ac.cr.

## Palabras clave

Cáncer; inmunoterapia; C-ficocianina; respuesta inmune.

## Resumen

El cáncer es una enfermedad compleja, heterogénea y dinámica, caracterizada por una mitosis descontrolada. Históricamente, se ha tratado con cirugía, radioterapia y quimioterapia, y en años más recientes mediante la inmunoterapia. Para ello, se han investigado distintas proteínas para la modulación de la respuesta inmune. Un grupo de estas son las C-ficocianinas, biliproteínas proveniente de microalgas verde azuladas como *Spirulina platensis*. El ambiente antiinflamatorio en personas sanas es una medida profiláctica para disminuir el riesgo de desarrollar un determinado tipo de cáncer. Su ingesta ha mostrado ese comportamiento, al suprimir la liberación de sustancias proinflamatorias. También se ha apreciado un efecto inmunomodulador al aumentar o disminuir la expresión de CD59, así como al ocasionar la proliferación de macrófagos y la liberación de sustancias inflamatorias. Esto último es un indicativo de que no se cuenta con información suficiente para corroborar su uso como opción profiláctica o terapéutica contra el cáncer. Por ello, es trascendental la información sobre sustancias naturales como estas, porque aunque se ven más atractivas para tratar dicha enfermedad, no existen efectos terapéuticos totalmente comprobados.

## Keywords

Cancer; immunotherapy; C-phycoyanin; immune response.

## Abstract

Cancer is a complex, heterogeneous, and dynamic disease, characterized by uncontrolled mitosis. Historically, it has been treated with surgery, radiotherapy and chemotherapy, and immunotherapy in more recent years. For this, different proteins have been investigated for the modulation of the immune response. A group of these are C-phycoyanins, biliproteins from bluish-green microalgae such as *Spirulina platensis*. The anti-inflammatory environment in healthy people is a prophylactic measure to reduce the risk of developing a specific cancer type. Its intake has shown that behavior, by suppressing the release of pro-inflammatory substances. An immunomodulatory effect has also been appreciated by increasing or decreasing the expression of CD59, and causing the macrophage proliferation and the release of inflammatory substances. The latter is an indication that there is insufficient information to corroborate its use as a prophylactic or therapeutic option against cancer. Therefore, the information about natural substances such as these ones are transcendental, because although they are more attractive to treat said disease, there are no fully proven therapeutic effects.

## Introducción

El cáncer es una enfermedad compleja, heterogénea y dinámica que involucra muchos componentes moleculares. Afecta a toda población y el reto principal es evitar su génesis y su progresión [1].

A nivel mundial, la cantidad de casos va en aumento. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2015 fue de la primera a la cuarta causa de muerte antes de los 70 años en 113 países. Además, la incidencia en el 2018 fue de 18.078.957 casos de todos los tipos de



cáncer y la mortalidad correspondió a 9.555.027 personas. Por continentes, un 48,4 % de los casos se presentó en Asia (cuenta con el 60 % de la población mundial), seguido por Europa con un 23,4 % (9 % de la población global), América 21,0 %, África 5,8 % y Oceanía 1,4 %. Con respecto a la mortalidad, en Asia fue de un 57,3 %, y le siguió Europa (30,3 %), América (14,4 %), África (7,3 %) y Oceanía (0,7 %) [2].

En lo que respecta a Costa Rica, según datos del Ministerio de Salud, para el 2014 la incidencia en mujeres registró un total de 6.056 casos y en hombres 4.850 casos. La provincia de mayor incidencia fue San José, tanto para hombres como para mujeres. Con respecto a la mortalidad, en el 2015 murieron 2.091 mujeres y 2.576 hombres por esta patología [3].

Existen diversas causas asociadas al desarrollo de cáncer, entre ellas: consumo de tabaco, infecciones por agentes como *Helicobacter pylori*, virus de hepatitis B y C, y virus del papiloma humano, obesidad, consumo de alcohol, dietas ricas en carnes rojas y procesadas, factores genéticos, exceso de luz solar, inactividad física, pobre nutrición, exposiciones ocupacionales e inmunosupresión [4].

Para ello, se han investigado distintas proteínas para la modulación de la respuesta inmune y así, emplearlas como opción terapéutica contra el cáncer. Un grupo de estas son las C-ficocianinas. Son biliproteínas provenientes de las microalgas verde azuladas como *Spirulina platensis* [5].

Por ello, el objetivo de la presente investigación fue revisar la información relacionada a las C-ficocianinas como moduladoras de la respuesta inmune para el tratamiento contra el cáncer.

## Generalidades del cáncer

El crecimiento celular es un proceso esencial de todas las células del cuerpo, pues se relaciona con la renovación de tejidos dañados, la producción de nuevos tejidos y el recambio de células en sitios como la piel, el pelo y el epitelio. El ciclo celular implica la replicación del material de la célula, incluyendo el ADN. En el caso de este material genético, sus mecanismos de replicación poseen altos niveles de efectividad, porque mantienen una probabilidad muy baja de la colocación errónea de bases nitrogenadas por parte de la ADN polimerasa. No obstante, un error puede desencadenar una mutación [6] [7] [8].

Una mutación conlleva a que una célula sea capaz de reproducirse, a pesar de no ser funcional. Estas células no funcionales propician la creación de tejidos causantes de fallas fisiológicas, capaces de inducir efectos letales en las personas. Las mismas son llamadas cancerígenas. Aunque conservan la replicación y el crecimiento, tienen un ritmo elevado con respecto a las demás [8].

Existen muchos tipos de cáncer de acuerdo al tejido afectando. Aunque todos presentan el mismo principio fisiopatológico, algunos son más frecuentes en comparación con otros. Los tipos más comunes en orden de mayor a menor son: pulmonar, hepático, colorrectal, gástrico y de mama [9] [10] [11] [12]. Las probabilidades de generar células cancerígenas por una mutación en el ADN son bajas, pero existen factores que aumentan la probabilidad de las neoplasias como la exposición a rayos ionizantes (ultravioleta, X, gamma), que generan el rompimiento y la transposición de secuencias génicas en el ADN. Como complemento, sustancias químicas y su prolongada exposición pueden llevar a la generación de especies reactivas de oxígeno que inducen mutaciones. Ejemplo de ellas son el tabaco, las aflatoxinas, el arsénico y el alcohol.

Además, se ha estudiado la asociación de microorganismos que puede ocasionar un tipo de cáncer posterior a una infección microbiana. Un caso documentado son las infecciones por *Helicobacter pylori*. Estudios evidencian la relación de esta bacteria con el cáncer gástrico. El estilo de vida y la dieta de las personas también aumentan la probabilidad de generar células cancerígenas [10] [12] [13] [14].

La regulación del ciclo celular y la proliferación de las células se da mediante protooncogenes y otros genes como supresores de tumores, reguladores de la apoptosis e involucrados en la reparación de ADN. Estos pueden provocar defectos, llevando a la célula a una proliferación anormal. Una célula normalmente posee pasos en su ciclo en los que distintas proteínas (factores de crecimiento, ciclinas, quinasas dependientes de ciclinas) activan o desactivan dichos pasos, permitiendo detenerse o proseguir con su replicación. Los oncogenes codifican para oncoproteínas que inducen a las proteínas reguladoras del ciclo celular a fallas, y consecuente, a una proliferación sin control [15].

Además, la inflamación es distintiva del cáncer. Las células inmunes y los mediadores de la inflamación como interleucina 6 (IL-6, citoquina pro y antiinflamatoria), factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ , por sus siglas en inglés, principal citoquina proinflamatoria) e IL-23 (implicada en inflamaciones crónicas), y especies reactivas de oxígeno crean un microambiente idóneo para la aparición de mutaciones causantes del cáncer. Por todo lo anterior, el cáncer es un conjunto de enfermedades con características similares entre la gran variedad de neoplasias. Sus signos distintivos son: señal de proliferación sostenida, evasión de supresores de tumores, evasión de respuesta inmune, promoción de la inflamación, activación de invasión y metástasis, inmortalidad replicable, favorecimiento de la angiogénesis, mutación e inestabilidad genómica, resistencia a la muerte celular y desregulación de la energía celular [13] [16] [17] [18] [19].

El control inmunológico, principalmente por parte de linfocitos NK (del inglés Natural Killer), elimina células cancerígenas. Estos identifican antígenos presentados en el complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC-I, por sus siglas en inglés), hallado en todas las células del cuerpo humano. Si son activados, como consecuencia de la presencia de un antígeno en este complejo, su maquinaria lítica permite la eliminación de las células cancerígenas. Como complemento, las NK son activadas por aquellas células tumorales que no presentan MHC-I expresado en su superficie [20].

De forma similar a los NK, los linfocitos T citotóxicos (CD8+) atacan a las células cancerígenas, mediante su activación por medio del MHC-I. Las células tumorales al presentar los péptidos tumorales ocasionan la activación de los CD8+, las cuales reconocen estos péptidos como extraños. Una vez activados, liberan sustancias líticas que inducen la muerte de la célula dañada. Además, se da la liberación de interferón gamma (IFN- $\gamma$ , por sus siglas en inglés), que modula la respuesta inmune innata, al atraer y activar los macrófagos, responsables de fagocitar las células tumorales e intentar eliminarlas por completo [21] [22].

No obstante, el cáncer ha logrado evadir el sistema inmune para continuar con su crecimiento exacerbado. Entre los diferentes mecanismos de evasión se pueden mencionar: pérdida del MHC-I (disminuyendo su expresión en la membrana o modificando proteínas propias del MHC, que hacen a las células irreconocibles por el sistema inmune), favorecimiento de la proliferación tumoral mediante la secreción de citoquinas supresoras del sistema inmune en el microambiente tumoral como el factor de crecimiento tumoral  $\beta$  (TGF- $\beta$ , por sus siglas en inglés) e IL-10, y la presencia de células T reguladoras con actividad supresora en dicho microambiente [20].

### **Inmunoterapia y cáncer**

Junto con las terapias convencionales como la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, con el paso de los años se ha comenzado a usar a la inmunoterapia como pilar fundamental contra el cáncer [23].

La inmunoterapia se define como aquella terapia en la cual se usan sustancias para estimular o para inhibir el sistema inmune y de esta manera, ayudar al cuerpo a combatir el cáncer, las infecciones y otras enfermedades [24]. Específicamente para el tratamiento del cáncer, implica

el uso de agentes terapéuticos que propician una manipulación del sistema inmune por medio de citoquinas, vacunas, terapias celulares y agentes de transfección humoral [25].

Estos logran estimular la respuesta antitumoral del huésped, al aumentar el número de células efectoras y la producción de mediadores solubles. Asimismo, disminuyen los mecanismos supresores, promoviendo un entorno de destrucción de tumores y la modulación de los puntos de control inmunitarios [25].

No obstante, se debe hacer la salvedad que esta terapia cuenta con mejores resultados frente a determinados tumores. Algunos poseen mecanismos de evasión de la respuesta inmune, imposibilitando la detección por parte de sus células mediante los mecanismos indicados con anterioridad. También puede ser empleada para modular la respuesta inmune, impidiendo los ambientes antiinflamatorios propios de los tumores [26].

La inmunoterapia fue usada por primera vez en los años 1970s a través de la vacuna del Bacilo Calmette–Guérin (BCG). Es una forma atenuada de la bacteria *Mycobacterium bovis*, capaz de estimular al sistema inmune en el tratamiento contra el cáncer de células superficiales de vejiga y en la inmunidad contra la tuberculosis [27].

En los últimos años, en países como Estados Unidos, se ha dejado de usar, debido a sus efectos adversos. Junto con ello, presenta un riesgo (aunque bajo) de infección por eficacia variable en la prevención de la tuberculosis pulmonar en adultos e interferencia en la reacción a la prueba cutánea de la tuberculina [28].

En la misma época, se dio el desarrollo de los interferones. Se trata de un grupo de glicoproteínas producidas naturalmente en el organismo de los mamíferos. Cuentan con diversos modos bioquímicos y celulares de acción que han demostrado actividad en el tratamiento de numerosas y diversas enfermedades malignas como el melanoma [29] [30].

En el año 1976, se dio el descubrimiento de la interleucina-2 (IL-2) como un factor promotor del crecimiento celular (TCGF, por sus siglas en inglés) [31]. La IL-2 es un potente activador de los linfocitos T, las células NK, los macrófagos y los linfocitos B. Asimismo, estimula la liberación de varias citoquinas. Su efecto antitumoral es mediado por la promoción de la activación de las células NK, las células asesinas activadas por linfoquinas (LAK, por sus siglas en inglés) y otras células citotóxicas, así como la inducción de IFN- $\gamma$  (potencia la transcripción de genes involucrados en actividades inmunomoduladoras, antivirales, antitumorales y antiproliferativas, y aumenta las actividades citotóxica y fagocítica de células presentadoras de antígenos) [32] y TNF- $\alpha$  (promueve la expresión de genes proinflamatorios y de autoinmunidad) [33].

Como complemento, su uso en terapia génica contra cáncer se ha empleado en diversos modelos tumorales preclínicos, incluyendo carcinoma hepatocelular, carcinoma de cabeza y cuello, sarcomas, plasmocitoma, carcinoma de mama, linfomas y cáncer cervical [34] [35] [36].

Otro acercamiento de la inmunoterapia es la regulación de los llamados puntos de control. De esta manera, las terapias se dirigen hacia las moléculas que sirven como controles en la regulación de las respuestas inmunes y bloquean las moléculas inhibitorias de tales respuestas. Además, activan aquellas que mejoran la función anticancerígena del sistema inmune [25].

En cuanto a las vacunas terapéuticas, potencian el desarrollo de una respuesta inmune contra antígenos específicos de tumores o asociados a otros tumores. No obstante, el problema es la obtención del antígeno, porque son muy similares a los de las células normales y, por ende, menos inmunogénicos [37].

Los virus oncolíticos son otra opción. La razón de usarlos es que para su replicación necesitan destruir las células, como es el caso de las tumorales. La terapia con virus de este tipo modificados genéticamente puede ocasionar su destrucción y la liberación de antígenos

capaces de generar una mayor respuesta inmune contra dicha enfermedad. Entre los más usados se encuentran: ONYX015 (dl1520), ICOVIR-7 y DELTA-24 (Ad5/3-D24-GMCSF). Sus características se describen en el cuadro 1 [38] [39].

Dentro de esta estrategia, una de las herramientas más empleadas son los anticuerpos monoclonales. Fueron descubiertos en 1975 por Georges Kohler y César Milstein [40]. Son proteínas obtenidas en el laboratorio que se puede unir a antígenos presentes en el cuerpo, incluso en células cancerosas. Existen diversos tipos de anticuerpos monoclonales, de acuerdo con la proporción del anticuerpo cuyo origen sea humano o de otra especie [41].

**Cuadro 1.** Principales virus oncolíticos usados en la inmunoterapia [38]

Virus oncolítico	Características
ONYX015 (dl1520)	Adenovirus que carece de la proteína viral E1B, implicada en su replicación. Sin ella no puede replicarse en las células que contienen p53 funcional (células normales). Las células tumorales tienen alterado el p53, permitiendo su replicación y favoreciendo la lisis celular
ICOVIR-7	Cuenta con una modificación en el gen RGD-4C para que presente selectividad por las células tumorales. También, para respetar el tejido sano, presenta una modificación en el promotor E2F, que está estructurado en palíndromos (tipo de secuencia de organización de ADN, relacionada con la señal para el inicio de la transcripción). Con ello, consigue su unión a la proteína del retinoblastoma Rb-p16, alterada en la mayoría de los tumores sólidos avanzados, constituyendo el complejo E2F-pRb.
DELTA-24 (Ad5/3-D24-GMCSF)	Desarrollado tras sustituir fibras del adenovirus serotipo 3 en el esqueleto del adenovirus 5. Con ello, mejora la transferencia de genes, pues el adenovirus 3 se une a un receptor no coxsackie, cuya expresión está aumentada en las células tumorales. Además, este vector quimérico 5/3 expresa el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés), induciendo actividad inmune antitumoral.

Inicialmente se contó con la tecnología del hibridoma, la cual usa una célula de melanoma y un linfocito B. Estos se fusionan y forman un hibridoma capaz de producir este tipo de anticuerpos. Sin embargo, debido a problemas de inmunogenicidad por su origen murino, se dio un proceso de humanización de los mismos, conduciendo al desarrollo de anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos, cuya tendencia implica tener una mayor proporción de naturaleza humana en la molécula [42].

Una de las aplicaciones de esta terapia es el cáncer de mama, uno de los que más afecta a las mujeres. Se descubrió que algunos tipos sobreexpresan el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2, por sus siglas en inglés). En el caso del anticuerpo monoclonal trastuzumab, funciona debido a tres mecanismos: inhibe la autoactivación del receptor HER-2, activa la citotoxicidad dependiente de anticuerpos y promueve la degradación de este receptor [43] [44].

Como complemento, combinarlos parece ser un buen tratamiento. Un ejemplo es la combinación de la IL-2 y un anticuerpo capaz de reconocer péptidos en la superficie de células cancerígenas. Por ejemplo, el tratamiento con IL-2 favoreció la función del sistema inmune contra los tumores

y al vincularlo al anticuerpo ALT-801, se incrementó la actividad contra las células cancerosas [45].

Otra terapia es la basada en células T. Como se mencionó anteriormente, son células que intervienen en mayor medida en la eliminación de células tumorales. Para esta terapia, se extraen del paciente y se modifican en el laboratorio para que actúen mejor sobre las células cancerosas y las destruyan. Se producen millones de copias de estas células modificadas y se devuelven al paciente para que combatan el cáncer [47]. En el año 2017, se aprobó el uso de la terapia con células T de receptor de antígeno químerico (CAR T, por sus siglas en inglés) en niños y adultos jóvenes con leucemia linfoblástica aguda a través del medicamento tisagenlecleucel (Kymriah®) de la casa farmacéutica Novartis [47].

Finalmente, se ha implementado el uso de las células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés). La respuesta inmune adaptativa por parte de los linfocitos T requiere la presentación de antígenos tumorales mediante células presentadoras como las DC, los macrófagos y los linfocitos B en el contexto del MHC-I. Así, se han creado DC modificadas para mejorar la actividad antitumoral [48].

En general, la situación anterior muestra que existe un número considerable de sustancias capaces de modular la respuesta inmune contra el cáncer. No obstante, la búsqueda continúa, y uno de los resultados de esta han sido las ficocianinas.

## Generalidades de las ficocianinas

Las ficobiliproteínas son proteínas presentes en las cianobacterias, las algas rojas y las criptófitas [49]. Están constituidas por al menos dos tipos diferentes de péptidos, que conforman la proteína conjugada o apoproteína. A esta parte proteica se unen grupos prostéticos lineales de tetrapirrol a través de enlaces tioéter de cisteína [50]. Sus subunidades son pigmentos de colores brillantes, solubles en agua y autofluorescentes. Algunas de las principales fuentes son: cianobacterias como *Arthrospira (Spirulina) plantesis* y *Arthrospira (Spirulina) máxima*, microalgas, entre ellas, *Pyrophyridium* sp, *Synechocystis* sp, *Phormidium ceylanicum*, *Limnothrix* sp, *Synechococcus lividus* y algunas especies de *Nostoc* [51].

Estas proteínas se clasifican según el color observable y el intervalo de absorbancia en: aloficocianina (APC, por sus siglas en inglés) de color azul-verde (650 a 655 nm), ficocianina (PC, por sus siglas en inglés) de color azul (610 a 620 nm) y ficoeritrina (PE, por sus siglas en inglés) de color rosado (540 a 570 nm) [49] [50]

También se clasifican según la fuente de la cual han sido extraídas en: C-ficocianina (proviene de cianobacterias o algas verde azuladas), R-ficocianina (se obtiene de algas rojas) y R-ficocianina II (proviene de especies de *Synechococcus*) [52].

La primera estructura elucidada de una ficobiliproteína fue la de la C-ficocianina. Esta se halló en *Mastigocladus laminosus* en 1985. Posteriormente, se reportaron las estructuras de otras C-ficocianinas presentes en diversos organismos, entre ellos: *Agmenellum quadruplicatum*, *Fremyella diplosiphon* y *Cyanidium caldarium* [53].

En general, se ha reportado que dicha proteína está conformada por subunidades distintas llamadas  $\alpha$  y  $\beta$  que pueden formar heterodímeros  $\alpha\beta$ . Esta contiene cuatro trímeros  $(\alpha\beta)_3$ , los cuales se ubican cara a cara para formar dos hexámeros  $(\alpha\beta)_6$  [53].

Recientes investigaciones demuestran que la C-ficocianina presente en *Arthonema africanum* (Cyanophyceae) posee propiedades antitumorales y anticancerígenas. Por otra parte, la de *Spirulina* cuenta con propiedades hepatoprotectoras, neuroprotectoras y antioxidantes. Además, en el caso de la producida por *Spirulina platensis*, se ha observado que tiene propiedades

como: antihiperalgnesia, antiviral, antifúngica, ateroprotectora, antioxidante, antiinflamatoria e inmunomoduladora [51].

Algunas de las formas más comunes para la obtención son la extracción de fuentes como cianobacterias y microalgas. Esto mediante procesos que involucran la ruptura de las paredes celulares y la extracción en medios acuosos de las proteínas solubles en agua [54]. Existen cuatro métodos de producción:

1. *Producción fotoautotrófica*: método de producción al aire libre mediante el uso de estanques abiertos. Se utiliza mayoritariamente *A. platensis* para la producción [55].
2. Producción heterótrofa: no está limitada por la intensidad de luz incidente. Se usa un biorreactor cerrado. La producción depende de medios heterotróficos o suplementos orgánicos. El compuesto orgánico es empleado como fuente de energía y carbono [49]. *Galdieria sulphuraria* es una rodófito unicelular o alga roja marina adecuada para la producción heterotrófica de C-ficocianina [55].
3. *Producción mixotrófica*: se lleva a cabo en un reactor cerrado. Se emplea luz, nutrientes orgánicos y/o inorgánicos como fuente de energía y carbono. La tasa de crecimiento específica de los cultivos mixotróficos es considerablemente más alta que las de crecimiento específicas fotoautotróficas y heterotróficas [49].
4. Producción recombinante: se ha utilizado la Ingeniería Genética para producir C-ficocianina recombinante con funciones novedosas utilizando *Escherichia coli* [55]. Sin embargo, la síntesis completa de las ficobiliproteínas recombinantes es un proceso difícil de lograr, pues depende de la coexpresión de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , así como de la síntesis paralela y la inserción de los cromóforos de ficobilina correctos [54]. Mediante esta técnica, se ha logrado la expresión de la proveniente de *Spirulina subsalsa* en *E. coli* [50].

Debido a que tiene efectos sobre la respuesta inmune [51], se ha estudiado de qué forma se puede regular dicha respuesta para ser utilizada como tratamiento contra el cáncer.

## Efecto de la C-ficocianina sobre el sistema inmune

### Efecto antiinflamatorio

Si bien se busca el desarrollo de un ambiente proinflamatorio cuando el cáncer se ha generado, una medida profiláctica para disminuir el riesgo de desarrollarlo es mediante la administración de sustancias que favorezcan el ambiente antiinflamatorio en personas sanas. Por ejemplo, la ingesta de C-ficocianina promovió la producción de inmunoglobulina A (IgA) y redujo la de IgE e IgG1 en la mucosa intestinal de ratones inmunizados con ovoalbúmina soluble como antígeno. Este comportamiento sugiere que ejerce sus efectos inhibidores contra la alergia (un tipo de inflamación) a través de la amplificación de la producción de IgA en la inmunidad de la mucosa para defenderse contra la invasión de alérgenos. También suprime la producción de IgE e IgG1 en la inmunidad sistémica para minimizar las respuestas excesivas a estas sustancias [56].

Además, disminuye la permeabilidad vascular. Esto quiere decir que puede aliviar la inflamación a través de un proceso que ocurre antes de la activación del sistema, suprimiendo la producción de anticuerpos específicos contra un determinado antígeno [56]. Adicionalmente, se ha observado que el efecto inhibitorio en la respuesta inflamatoria alérgica también se debe a que reduce significativamente la liberación de histamina de los mastocitos. Asimismo, reduce varias citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-6, así como el óxido nítrico (NO) [57].

En el caso del NO, su producción extensiva derivada de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, por sus siglas en inglés) es crucial en la patogénesis de la inflamación. Se ha apreciado

que la C-ficocianina inhibe de forma significativa la producción de nitrito (indicador de NO) y la expresión de la enzima [58].

Junto con ello, la actividad inhibitoria sobre la producción de NO y la expresión de iNOS está asociada con la disminución de la liberación del TNF- $\alpha$  al medio por los macrófagos y la inhibición de la activación del factor de transcripción nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B, por sus siglas en inglés). Este constituye un regulador importante en la expresión de varios genes inflamatorios como iNOS, ciclooxigenasa 2 (COX-2), citoquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión [58].

Abonado a lo anterior, la C-ficocianina es un inhibidor selectivo del COX-2 [59]. La COX-2 contribuye a las reacciones inflamatorias y a la producción de prostaglandinas en el sitio de inflamación, especialmente de la prostaglandina E (PGE2), que desempeña un papel clave en el desarrollo de los tres signos de inflamación: hinchazón-enrojecimiento, dolor y fiebre. Se trata de un potente vasodilatador que incrementa la permeabilidad vascular y el flujo sanguíneo del tejido, contribuyendo a la aparición de edema y de eritema característico. Igualmente, ocasiona la sensibilización de las terminaciones nerviosas sensoriales periféricas ubicadas en el sitio de la inflamación y ejerce una potente mediación en la aparición de la fiebre [60].

Finalmente, el reclutamiento y la liberación de la mieloperoxidasa es parte de la respuesta inflamatoria. Consiste en una enzima oxidante endógena que genera especies reactivas de oxígeno y puede ser liberada fuera de la célula, aumentando el potencial de daño a un objetivo extracelular [61]. La C-ficocianina inhibe tanto la peroxidación lipídica microsomal del hígado como la agregación de plaquetas, disminuyendo la producción de PGE2 y de nitritos, reduciendo la producción de mieloperoxidasa y suprimiendo la activación del NF- $\kappa$ B a través de la prevención de la degradación del inhibidor kappa B alfa ( $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ ) citosólico [62].

### Efecto inmunomodulador

Esta molécula puede promover la expresión de la proteína CD59. Esta funciona como un inhibidor del complejo de ataque a la membrana (MAC, por sus siglas en inglés) CD5b-9 del complemento humano, restringiendo la actividad citolítica del complejo CD5b-9, y protegiendo la sangre humana y las células vasculares del ataque autólogo del complemento [63]. Sin embargo, existen resultados donde se muestra su actividad inhibitoria. La terapia combinada de C-ficocianina y ácido transretinoico total *in vitro* tuvo un efecto inmunomodulador significativo, al disminuir la expresión de la proteína CD59 en células HeLa (células de cultivo celular). Otro aspecto demostrado fue el efecto inhibitorio del ciclo celular con la inducción de apoptosis y la citólisis mediada por el complemento [58].

Adicionalmente, se han realizado estudios con animales. Estos han demostrado un mejoramiento de la actividad de los linfocitos, la inmunidad de un organismo y la capacidad del cuerpo para prevenir y para resistir enfermedades [57].

Las propiedades inmunorreguladoras de la C-ficocianina fueron evaluadas en un modelo de ratas con lesiones agudas de pulmón inducidas por lipopolisacáridos (LPS). Los resultados obtenidos mostraron que posterior al tratamiento con esta molécula, hubo una disminución de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. También, atenuó de forma significativa la actividad de la MPO inducida por LPS, la formación de radicales, y los niveles de expresión y de activación de las enzimas iNOS y COX-2, así como el NF- $\kappa$ B en el pulmón. Por otra parte, logró modular la expresión de enzimas tanto antiapoptóticas (aumentando Bcl-2 y Bcl-xL) como proapoptóticas (disminuyendo caspasa-3 y BAX) en el tejido pulmonar expuesto a la lesión por LPS. Estos resultados indicaron la disminución de la respuesta inmune [58].

Otros estudios se han realizado en macrófagos. Estos desempeñan un papel importante en la defensa inmunológica innata contra las infecciones del huésped en mamíferos y destruyen las células tumorales a través de la secreción de varias citoquinas. En una respuesta inmune, destruyen directamente los microorganismos extraños y las células tumorales al secretar una variedad de mediadores como IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6, entre otras. La IL-1 $\beta$  pueden promover la proliferación de células T, inducir a las células B a producir anticuerpos, y potenciar las funciones citotóxicas de los linfocitos T citotóxicos y células NK. Junto con ello, la IL-6 promueve la proliferación de células B en el hígado, mientras que el TNF- $\alpha$  tiene un efecto citotóxico y supresor del crecimiento de células tumorales [64].

La infección por bacterias patógenas causa un aumento de estas citoquinas o sus factores moduladores. En 2003, un estudio demostró que con dosis crecientes de C-ficocianina se redujo la proliferación de macrófagos RAW 264.7. Asimismo, tuvieron la capacidad de suprimir la producción de citoquinas cuando estos macrófagos fueron estimuladas con LPS [64].

A pesar de este tipo de estudio, en macrófagos J774A.1 mostró bioactividad al aumentar el rendimiento de la inmunomodulación y tuvo la capacidad de inducir la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Estos resultados evidenciaron la modulación de las células del sistema inmune en mamíferos, favoreciendo la respuesta para la destrucción de células tumorales. La diferencia entre estos dos macrófagos se debe a que existe cierta heterogeneidad entre las células [58] [64].

A pesar de estos experimentos, se considera que es capaz de estimular y no inhibir las respuestas inmunes. Esto se ha visto a través de su ingesta. Cuando se usa como adyuvante de la quimioterapia, impulsa al sistema inmune a combatir la propagación de las células tumorales, mejora su respuesta frente a la quimioterapia y reduce el riesgo de que esta dé lugar a un nuevo cáncer [62]. En adición, puede estimular directamente la formación de la unidad formadora de colonias eritroide, incrementando la hematopoyesis de la médula ósea [57]. Adicionalmente, hay estudios que demuestran que suprime la respuesta alérgica de anticuerpos IgE y mejora la de anticuerpos secretores IgA en ratones. Las células inmunes involucradas en el control del cáncer (células NK y linfocitos T citotóxicos) funcionan de manera más efectiva con la ingesta de esta proteína [62].

Por su actividad antitumoral (en la subunidad  $\beta$  de la C-ficocianina), se ha observado que inhibe la proliferación y promueve la apoptosis de las células cancerígenas en líneas celulares. Esta acción se debe al aumento de la actividad de las caspasas 3 y 8, permitiendo la escisión de la poli (ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP-1), incrementando la relación Bcl-2/BAX. Esto genera un grado de apoptosis mayor y evita que las células proliferen, porque permanecen en las fases G0/G1 del crecimiento celular, despolimerizando los microtúbulos y los microfilamentos [65] [66].

Por otra parte, se cree que interactúa con la  $\beta$ -tubulina (participa en la migración intercinética nuclear en el proceso de replicación celular [67]) y con la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (involucrada en la vía central del metabolismo del carbono como lo es la glucólisis y la gluconeogénesis [68]), causando que el ciclo celular se detenga. Este mecanismo aún no se tiene claro, pero se especula que la subunidad  $\beta$  de la C-ficocianina interactúa con la  $\beta$ -tubulina, asociada a la coprecipitación con la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa bajo ambientes de estrés. Junto con promover la apoptosis y evitar la proliferación, se da una inducción de la autofagia [65] [66].

Además, en un estudio realizado en tejidos de ratas con cáncer de colon inducido, la C-ficocianina redujo el número y el tamaño de los tumores, ya que se unió al receptor del factor vesicular de crecimiento endotelial A1, disminuyendo la angiogénesis. Como complemento, decreció el factor inducible de hipoxia 1 $\alpha$ , relacionado con la demanda de oxígeno y la



angiogénesis. Y fue aún más efectivo cuando se combinó con un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) como piroxicam. Ambas sustancias producen un efecto antineoplásico, porque regulan las propiedades de la membrana (potencial, fluidez y cambio de lípidos), aumentan la calpaína-9 (proteasa dependiente de calcio con una cisteína en su sitio catalítico ubicada en estómago e intestino delgado [69]), la concentración de calcio (regulador de múltiples actividades celulares de señalización y de comunicación [70]) y la expresión del receptor activado de la proliferación de peroxisomas (organelas celulares que participan en procesos bioquímicos como metabolismo del peróxido de hidrógeno, síntesis y degradación de colesterol, síntesis de glicerolípidos y beta oxidación de los ácidos grasos), evitando la progresión del cáncer. Este estudio demostró que puede prevenir el cáncer de colon [71] [72].

Otro detalle visto es que tiene mejor efecto en células metastásicas [66]. Estas son más dañinas que el tumor primario, porque tienen la capacidad de diseminarse y actuar como células madre del tumor, propagando la enfermedad a otros tejidos. Dentro de los tipos de cáncer que se ha visto que tiene efecto *in vitro* e *in vivo* son: colon, mama, hígado, pulmón y leucemia [65].

Adicionalmente, se efectuó un estudio en líneas celulares con el fenotipo de resistencia a múltiples drogas anticancerígenas. Estas presentan transportadores que sacan la droga de las células tumorales e incrementan la concentración extracelular del fármaco. Los resultados mostraron que su uso aumentó la sensibilidad a las quimioterapias y evitó la resistencia sin dañar a las células sanas, específicamente macrófagos [73].

Otras posibles propiedades estudiadas sobre estas proteínas son como agentes antioxidantes, en el mejoramiento del sistema inmune, la protección del hígado y de los riñones, la ayuda en el tratamiento de la fibrosis, la remielinización en esclerosis múltiple o luego de un accidente cerebrovascular isquémico, la inhibición de la arteriosclerosis, el tratamiento de la diabetes, la detección de sustancias fluorescentes, como colorante en cosmetología y como aditivo alimentario [57] [65] [66] [73] [74] [75] [76] [77].

Las perspectivas a futuro en el uso de las C-ficocianinas es que se puedan emplear en conjunto con los medicamentos antitumorales actuales, potenciando sus efectos con una menor cantidad de efectos adversos. A pesar de ello, hacen falta estudios *in vivo* y ensayos clínicos para comprobar esta posible utilidad [16]. Como corolario, es necesario proponer un mecanismo de acción acerca de la actividad antitumoral, lo cual está en investigación en este momento [78].

## Conclusiones

Las C-ficocianinas son proteínas obtenidas a partir de diversos microorganismos. A lo largo de los años se han estudiado los efectos que tienen sobre la respuesta inmune. Dichos efectos son principalmente el antiinflamatorio y el inmunomodulador.

Por ello, establecer la respuesta que tienen en el sistema inmune es trascendental para que estas puedan ser utilizadas como una terapia profiláctica o terapéutica contra el cáncer. Hasta el momento, no existe evidencia suficiente para predecir la eficacia y la seguridad de estas proteínas como agentes farmacológicos.

Ante esta situación, es trascendental la información, principalmente hacia otros profesionales de la salud, sobre sustancias naturales como estas. Aunque se ven más atractivas para tratar enfermedades como el cáncer, no existen efectos terapéuticos totalmente comprobados. De esta manera, se debe mantener una actualización constante, de forma que se puedan brindar información útil hacia profesionales, pacientes y público en general.

## Referencias

- [1] C. Moses, B. García-Bloj, A. R. Harvey, and P. Blancafort, "Hallmarks of cancer: The CRISPR generation," *European Journal of Cancer*, 93, 10-18, 2018.
- [2] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424, 2018.
- [3] Ministerio de Salud. (2019, Mayo). Estadística de Cáncer - Registro Nacional Tumores. [en línea]. Disponible en: <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/vigilancia-de-la-salud/estadisticas-y-bases-de-datos/estadisticas/estadistica-de-cancer-registro-nacional-tumores>.
- [4] International Agency for Research on Cancer, "World cancer factsheet," Cancer Research UK, Londres, 2014.
- [5] A. Ramos Molina, "Obtención y Purificación de Ficocianinas Mediante Cromatografía de Adsorción en Lecho Expandido. Escalado del Proceso, Caracterización Fisicoquímica y Aplicación como Colorantes Naturales," tesis doctoral, Universidad de Jáen, Andalucía, España, 2011.
- [6] A. Schwabe and F. J. Bruggeman, "Contributions of Cell Growth and Biochemical Reactions to Nongenetic Variability of Cells," *Biophysical Journal*, 107(2), 301-313, 2014.
- [7] L. A. Loeb, K. R. Loeb, and J. P. Anderson, "Multiple mutations and cancer," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(3), 776-781, 2003.
- [8] A. S. Boyer, D. Walter, and C. S. Sørensen, "DNA replication and cancer: From dysfunctional replication origin activities to therapeutic opportunities," *Seminars in Cancer Biology*, 37-38, 16-25, 2016.
- [9] Organización Mundial de la Salud. (2018, Setiembre 12). Cáncer. [en línea]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- [10] R. de la Peña-López y Y. A. Remolina-Bonilla, "Cáncer," *Gaceta Médica De México*, 152 (supl 1), 63-66, 2016.
- [11] S. M. Parizadeh, R. Jafarzadeh-Esfehani, S. M. Hassani, S. M. R. Parizadeh, S. Vojdani, M. Ghandehari et al, "Targeting cancer stem cells as therapeutic approach in the treatment of colorectal cancer," *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 110, 75-83, 2019.
- [12] F. Nasim, B. F. Sabath, and G. A. Eapen, "Lung Cancer," *Medical Clinics of North America*, 103(3), 463-473, 2019.
- [13] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of Cancer: The Next Generation," *Cell*, 144(5), 646-674, 2011.
- [14] F. Rodríguez Montero, "Cáncer gástrico: Su relación con *Helicobacter pylori*," *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 71(609), 5-7, 2014.
- [15] A. Ghosh, D. Ghartimagar, and S. Thapa, "Oncogenes – the basics," *Journal of Biomedical Sciences*, 3(4), 35-37, 2016.
- [16] E. F. e Silva, F. da Silva Figueira, A. P. Lettnin, M. Carrett-Dias, D. M. V. B. Filgueira, S. Kalil et al, "C-Phycocyanin: Cellular targets, mechanisms of action and multi drug resistance in cancer," *Pharmacological Reports*, 70(1), 75-80, 2017.
- [17] J. C. Arthur, E. Perez-Chanona, M. Mühlbauer, S. Tomkovich, J. M. Uronis, T. J. Fan et al, "Intestinal Inflammation Targets Cancer-Inducing Activity of the Microbiota," *Science*, 338(6103), 120-123, 2012.
- [18] S. M. Crusz and F. R. Balkwill, "Inflammation and cancer: advances and new agents," *Nature Reviews Clinical Oncology*, 12(10), 584-596, 2015.
- [19] L. Zitvogel, F. Pietrocola, and G. Kroemer, "Nutrition, inflammation and cancer," *Nature Immunology*, 18(8), 843-850, 2017.
- [20] L. Zamai, C. Ponti, P. Mirandola, G. Gobbi, S. Papa, L. Galeotti et al, "NK Cells and Cancer," *The Journal of Immunology*, 178(7), 4011-4016, 2007.
- [21] S. M. A. Mahmoud, E. C. Paish, D. G. Powe, R. D. Macmillan, M. J. Grainge, A. H. S. Lee et al, "Tumor-Infiltrating CD8+ Lymphocytes Predict Clinical Outcome in Breast Cancer," *Journal of Clinical Oncology*, 29(15), 1949-1955, 2011.
- [22] J. Hamanishi, M. Mandai, M. Iwasaki, T. Okazaki, Y. Tanaka, K. Yamaguchi et al, "Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(9), 3360-3365, 2007.2006.
- [23] Instituto Nacional del Cáncer. (2019). Tipos de tratamiento. [en línea]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>

- [24] Instituto Nacional del Cáncer. (2019). Diccionario de cáncer. [en línea]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/inmunoterapia>
- [25] D. L. Stanculeanu, Z. Daniela, A. Lazescu, R. Bunghez, and R. Anghel, "Development of new immunotherapy treatments in different cancer types," *Journal of Medicine and Life*, 9(3), 240-248, 2016.
- [26] S. Arshad, D. Baleanu, J. Huang, Y. Tang, and M. M. Al Qurashi. "Dynamical analysis of fractional order model of immunogenic tumors," *Advances in Mechanical Engineering*, 8(7), 1-13, 2016.
- [27] O. Fuge, N. Vasdev, P. Allchorne P, and J. Green, "Immunotherapy for bladder cancer," *Research and Reports in Urology*, 7, 65-79, 2015.
- [28] National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention, "Eliminación de la TB, Vacuna BCG," Center for Disease Control and Prevention, Georgia, 2011.
- [29] N. González Sánchez, Z. Armada Esmores, L. Llopiz Casanova. "Propiedades de los interferones y su acción antitumoral," *Medicentro Electrónica*, 21(3), 192-198, 2017.
- [30] A. A. Tarhini, H. Gogas, and J. M. Kirkwood, "IFN- $\alpha$  in the Treatment of Melanoma," *The Journal of Immunology*, 189(8), 3789-3793, 2012.
- [31] T. Jiang, C. Zhou, and S. Ren, "Role of IL-2 in cancer immunotherapy," *Oncoimmunology*, 5(6), e1163462, 2016.
- [32] D. A. Mata-Espinosa y R. Hernández-Pando, "Interferón gamma: aspectos básicos, importancia clínica y usos terapéuticos," *Revista de Investigación Clínica*, 60(5), 421-431, 2008.
- [33] J. M. Fragoso, G. Vargas Alarcón, S. Jiménez Morales, O. D. Reyes Hernández y J. Ramírez Bello, "El factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) en las enfermedades autoinmunes (EA): biología molecular y genética," *Gaceta Médica de México*, 150(4), 334-344, 2014.
- [34] V. H. Bermúdez-Morales, O. Peralta-Zaragoza y V Madrid-Marina, "Terapia génica con citocinas contra cáncer cervicouterino," *Salud Pública de México*, 47(6), 458-468, 2005.
- [35] T. Chinen, A. K. Kannan, A. G. Levine, X. Fan, U. Klein, Y. Zheng et al, "An essential role for the IL-2 receptor in  $T_{reg}$  cell function," *Nature Immunology*, 17(11), 1322-1333, 2016.
- [36] Chemocare. IL-2 (2019). Chemocare. [en línea]. Disponible en: <http://chemocare.com/es/chemotherapy/drug-info/IL-2.aspx>
- [37] F. Ferriols Lisart, R. Ferriols Lisart y J. Colomina Rodríguez, "Inmunoterapia Tumoral. Vacunas y Terapia Génica," *Farmacia Hospitalaria*, 21(3), 166-170, 1997.
- [38] M. J. de Prado Hidalgo y A. Llanos Méndez. Seguridad y eficacia de los virus oncolíticos en el cáncer avanzado, Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía, Sevilla, Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias, AETSA 2011 / 2-3, 2012.
- [39] L. Lerma, "Virus oncolíticos: un nuevo aliado en la lucha contra el cáncer," *Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular*, 2019.
- [40] G. Köhler, "Derivation and Diversification of Monoclonal Antibodies," *Physiology or Medicine*, 228-243, 1984.
- [41] I. Dávila González, "Generalidades del tratamiento con anticuerpos monoclonales," *Monografías de Archivos de Bronconeumología*, 4(1), 2017.
- [42] G. Falero, B. L. Rodríguez, I. Rodríguez, E. Suzarte, O. Otero, N. Núñez et al, "Generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales contra la proteína de membrana externa U (OmpU) de *Vibrio cholerae*," *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 38(3), 224-227, 2006.
- [43] S. Escrivá-de-Romaní, M. Arumí, M. Bellet, and C. Saura, "HER2-positive breast cancer: Current and new therapeutic strategies," *The Breast*, 39, 80-88, 2018.
- [44] T. Vu, F. X. Claret, "Trastuzumab: Updated Mechanisms of Action and Resistance in Breast Cancer," *Frontiers in Oncology*, 2:62, 2012.
- [45] R. Muthuswamy, L. Wang, J. Pitteroff, J. R. Gingrich, and P. Kalinski. "Combination of IFN $\alpha$  and poly-I:C reprograms bladder cancer microenvironment for enhanced CTL attraction". *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 3(6), 2015.
- [46] Cancer.net. Qué es la inmunoterapia. (2019, Enero). American Society of Clinical Oncology. [en línea]. Disponible en: <https://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atenci%C3%B3n-del-c%C3%A1ncer/c%C3%B3mo-se-trata-el-c%C3%A1ncer/inmunoterapia/qu%C3%A9-es-la-inmunoterapia>
- [47] Instituto Nacional del Cáncer. La terapia con células T y CAR ha sido aprobada para algunos niños y adultos jóvenes con leucemia. (2017, Octubre 19). Instituto Nacional del Cáncer. [en línea]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/noticias/temas-y-relatos-blog/2017/tisagenlecleucel-fda-leucemia-infantil>



- [48] M. Gato, T. Liechtenstein, I. Blanco-Luquín, M. I. Zudaire, G. Kochan y D. Escors. "Inmunoterapia genética con células dendríticas para el tratamiento del cáncer," *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 38(2), 279-288, 2015.
- [49] V. K. Kannaujiya, D. Kumar, J. Pathak, and R. P. Sinha, "Phycobiliproteins and Their Commercial Significance," *Cyanobacteria: From Basic Science to Applications*, A. K. Mishra, D. N. Tiwari, and A. N. Rai, Ed. Londres: Academic Press, 2019.
- [50] X. J. Wu, H. Yang, Y. T. Chen, and P. P. Li, "Biosynthesis of Fluorescent  $\beta$  Subunits of C-Phycocyanin from *Spirulina subsalsa* in *Escherichia coli*, and Their Antioxidant Properties," *Molecules*, 23(6), 1369, 2018.
- [51] E. Manirafasha, T. Ndikubwimana, X. Zeng, Y. Lu, and K. Jing. Phycobiliprotein: "Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent". *Biochemical Engineering Journal*, 109, 282-296, 2016.
- [52] B. Fernández-Rojas, J. Hernández-Juárez, and J. Pedraza-Chaverri, "Nutraceutical properties of phycocyanin," *Journal of Functional Foods*, 11, 375-392, 2014.
- [53] X. Q. Wang, L. N. Li, W. R. Chang, J. P. Zhang, L. L. Gui, B. J. Guo et al, "Structure of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* at 2.2 Å resolution: a novel monoclinic crystal form for phycobiliproteins in phycobilisomes," *Acta Crystallographica Section D Biological crystallography*, 57(Pt 6), 784-792, 2001
- [54] N. T. Eriksen, "Production of phycocyanin — a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine," *Applied Microbiology Biotechnology*, 80(1), 1-14, 2008.
- [55] M. Kuddus, P. Singh, G. Thomas, and A. Al-Hazimi, "Recent Developments in Production and Biotechnological Applications of C-Phycocyanin," *BioMed Research International*, 2013, 742859, 2013.
- [56] C. Nemoto-Kawamura, T. Hirahashi, T. Nagai, H. Yamada, T. Katoh, and O. Hayashi, "Phycocyanin enhances secretory IgA antibody response and suppresses allergic IgE antibody response in mice immunized with antigen-entrapped biodegradable microparticles," *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 50(2), 129-136, 2004.
- [57] Q. Liu, Y. Huang, R. Zhang, T. Cai y Y. Cai, "Medical Application of *Spirulina platensis* Derived C-Phycocyanin," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 7803846, 2016.
- [58] G. Díaz Domínguez, V. Marsán Suárez y L. O. del Valle Pérez, "Principales propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias de la ficobiliproteína C-ficocianina," *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 32(4), 447-454, 2016.
- [59] Ch. Romay, R. Gonzalez, N. Ledon, D. Remirez, and V. Rimbau, "C-Phycocyanin: A Biliprotein with Antioxidant, Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects," *Current Protein and Peptide Science*, 4(3), 207-216, 2003.
- [60] S. Agarwal, G. V. Reddy, and P. Reddanna, "Eicosanoids in inflammation and cancer: the role of COX-2," *Expert Review of Clinical Immunology*, 5(2), 145-165, 2009.
- [61] G. Ding, F. Liu, C. Feng, J. Xu, and Q. Ding, "Asociación entre los polimorfismos de genes de mieloperoxidasa y la susceptibilidad a cáncer de próstata: un estudio caso-control en la población de nacionalidad china," *Actas Urológicas Españolas*, 37(2), 79-82, 2013.
- [62] A. Soni, M. Dubey, M. Verma, R. Dhankhar, V. Kaushal, R. et al, "Revisiting the Role of Phycocyanin in Current Clinical Practice," *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(11), 4588-4600, 2015.
- [63] R. Raja and S. Hemaiswarya, "Microalgae and Immune Potential" *Dietary Components and Immune Function*, R. Watson, S. Zibadi, and V. Preedy, Ed. Nueva Jersey: Humana Press, 2010.
- [64] H. W. Chen, T. S. Yang, M. J. Chen, Y. C. Chang, I. Eugene, C. Wang et al, "Purification and immunomodulating activity of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* cultured using power plant flue gas". *Process Biochemistry*, 49(8), 1337-1344, 2014.
- [65] L. Jiang, Y. Wang, Q. Yin, G. Liu, H. Liu, Y. Huang et al, "Phycocyanin: A Potential Drug for Cancer Treatment". *Journal of Cancer*, 8(17), 3416-3429, 2017.
- [66] H. Wang, Y. Liu, X. Gao, C. L. Carter, and Z. R. Liu, "The recombinant  $\beta$  subunit of C-phycocyanin inhibits cell proliferation and induces apoptosis," *Cancer letters*, 247(1), 150-158, 2007.
- [67] S. Viñas Domínguez, "Enfermedades de tubulinas," tesis, Universidad de Cantabria, Cantabria, España, 2016.
- [68] A. Iddar, F. Valverde, O. Assobhei, A. Serrano, A. Soukri, "Widespread occurrence of non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase among gram-positive bacteria," *International Microbiology*, 8(4), 252-258, 2005.
- [69] M. M. Esparza-Jiménez Morán, "Calpainas," *Revista Médica MD*, 1(2).

- [70] O. Díaz Horta, "El ion calcio: su regulación y función en la célula  $\beta$  pancreática," *Revista Cubana de Endocrinología*, 14(3), 2003. [Internet]. 2003 [citado 2019 Jun 22]; 14(3).
- [71] M. K. Saini and S. N. Sanyal, "Piroxicam and c-phycocyanin prevent colon carcinogenesis by inhibition of membrane fluidity and canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling while up-regulating ligand dependent transcription factor PPAR $\gamma$ ," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 68(5), 537-550. 2014;68(5):537-50.
- [72] M. K. Saini and S. N. Sanyal, "Targeting angiogenic pathway for chemoprevention of experimental colon cancer using C-phycocyanin as cyclooxygenase-2 inhibitor," *Biochemistry and Cell Biology*, 92(3), 206-218, 2014.
- [73] E. Fernandes e Silva, F. S. Figueira, A. D. Cañedo, K. S. Machado, M. T. S. F. Salgado, T. K. Silva et al, "C-phycocyanin to overcome the multidrug resistance phenotype in human erythroleukemias with or without interaction with ABC transporters," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 532-542, 2018.
- [74] G. Pentón-Rol, J. Marín-Prida, and Falcón-Cama, "C-Phycocyanin and Phycocyanobilin as Remyelination Therapies for Enhancing Recovery in Multiple Sclerosis and Ischemic Stroke: A Preclinical Perspective," *Behavioral Sciences*, 8(1), 15, 2018.
- [75] N. B. Gdara, A. Belgacem, I. Khemiri, S. Mannai, and L. Bitri, "Protective effects of phycocyanin on ischemia/reperfusion liver injuries," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 102, 196-202, 2018.
- [76] M. Ichimura, S. Kato, K. Tsuneyama, S. Matsutake, M. Kamogawa, E. Hirao et al, "Phycocyanin prevents hypertension and low serum adiponectin level in a rat model of metabolic syndrome," *Nutrition Research*, 33(5), 397-405, 2013.
- [77] X. Li, L. Ma, W. Zheng, and T. Chen, "Inhibition of islet amyloid polypeptide fibril formation by selenium-containing phycocyanin and prevention of beta cell apoptosis," *Biomaterials*, 35(30), 8596-8604, 2014.
- [78] R. J. Fayyad, A. N. M. Ali, A. S. Dwaish, A. K. A. Al-Abboodi, "Anticancer Activity of *Spirulina platensis* Methanolic Extracts Against L20B and MCF7 Human Cancer Cell Lines". *Plant Archives*, 19(Suppl 1), 1419-1426, 2019.

# Evaluación en casa malla del efecto de cuatro productos biológicos para el combate de jobotos (*Phyllophaga sp.*)

## Evaluation in house mesh of the effect of four biological products for the combat of jobotos (*Phyllophaga sp.*)

Ricardo Acuña-Segura<sup>1</sup>, Jaime Brenes-Madriz<sup>2</sup>

---

Fecha de recepción: 11 de setiembre de 2019  
Fecha de aprobación: 4 de diciembre de 2020

Acuña-Segura, R; Brenes-Madriz, J. Evaluación en casa malla del efecto de cuatro productos biológicos para el combate de jobotos (*Phyllophaga sp.*). *Tecnología en Marcha*. Vol. 33-4. Octubre-Diciembre 2020. Pág 140-154.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v33i4.4376>

1 Bio – Control. Costa Rica. Correo electrónico: racuna@biocontrol.cr  
2 Ingeniero agrónomo. Escuela de Biología, Centro de Investigaciones en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.  
Correo electrónico: jabrenes@tec.ac.cr.  
 <https://orcid.org/0000-0003-2325-8808>



## Palabras clave

Control biológico; *Beauveria sp.*; *Bacillus spp.*; entomonemátodo; *Phyllophaga sp.*

## Resumen

El experimento se desarrolló en casa malla y se evaluó el efecto y las dosis de cuatro productos biológicos y uno químico utilizados en el control de larvas de jobotos (*Phyllophaga sp.*). El experimento se desarrolló en Guadalupe de Cartago. Fue una investigación cuantitativa con un diseño de experimento de bloques completos al azar, con el uso de dos dosis de cinco tratamientos, con tres repeticiones cada uno y cada repetición con diez unidades experimentales. Los productos biológicos utilizados fueron Mycotrol® 11 EW (*Beauveria bassiana*, cepa GHA), Botani Gard® 50 WP (*Beauveria bassiana*, cepa GHA), Agro Gold® (nueve cepas de *Bacillus spp.*), B-Green® (entomonemátodo, *Heterorhabditis bacteriophora*) y un producto químico comercial recomendado para control de jobotos. Se determinó que Mycotrol® 11EW (T1) en dosis de 2,25 centímetros cúbicos por litro de agua fue el producto que proporcionó los mejores resultados. De los otros dos productos que tuvieron efecto sobre el combate de esta plaga, el Agro Gold® (T3) y el B-Green® (T4), se determinó que la dosis utilizada en ambos casos no fue significativa, ya que se obtuvo valores de  $p$  iguales a 0,113 y 0,807, respectivamente. Lo que sí tuvo significancia fue realizar dos aplicaciones con frecuencia semanal con estos dos productos. Con los productos restantes, Botani Gard® 50 WP (T2) (*Beauveria bassiana*, cepa GHA) y T5 (producto químico comercial), no hubo resultados de significancia estadística, ya que el valor de  $p$  para T2 con el factor dosis fue de 0,573 y con el factor aplicación fue 0,094; para T5 el valor de  $p$  con el factor dosis fue 0,260 y con el factor aplicación fue 0,277.

## Keyword

Biological control; *Beauveria sp.*; *Bacillus spp.*; entomonematode; *Phyllophaga sp.*

## Abstract

The experiment was developed at home mesh in order to evaluate the effect and dose of four biological products and one chemical used in the control of larvae of jobotos (*Phyllophaga sp.*). The experiment was carried out in Guadalupe, Cartago, located at the following geographic coordinates: latitude 9,861 884 and longitude -83,939 692, at 1400 m.a.s.l. The type of research was quantitative, with a design of the complete block experiment at random, and use of two doses of five treatments and three repetitions of each treatment, and each repetition with ten experimental units. The biological products used were Mycotrol® 11 EW (*Beauveria bassiana*, strain GHA), Botani Gard® 50 WP (*Beauveria bassiana*, strain GHA), Agro Gold® (nine strains of *Bacillus spp.*), B-Green® (entomonematode, *Heterorhabditis bacteriophora*), and a commercial chemical recommended for control of jobotos. For the biological control of *Phyllophaga sp.*, it was determined that Mycotrol® 11EW, in a dose of 2,25 cc / liter of water, was the product that provided the best results. For the other two products that had an effect on the combat of *Phyllophaga sp.*, Agro Gold® and B-Green®, it was determined that the dose used in both cases was not significant; this was confirmed by the  $p$  values of 0,113 and 0,807, respectively. What did have significance was to make two applications one week apart from each other with these two products. For the remaining products, T2 and T5, there was no statistical significance in their result. This was confirmed by the  $p$  value for T2 and T5, respectively,. For T2 it was 0,573 for the dose factor and 0,094 for the application factor. For T5 the value of  $p$  for the dose factor was 0,260 and for the application factor, 0,277.

## Introducción

Ante la necesidad de nuevas opciones de manejo y control de plagas, el ser humano ha enfocado su conocimiento en la búsqueda de soluciones que cumplan con los requerimientos necesarios para hacer frente a los problemas que las plagas ocasionan en los cultivos. Tradicionalmente se han utilizado los productos agroquímicos, pero el uso indiscriminado de plaguicidas ha generado su resistencia a las moléculas de uso común, además de causar daño al agricultor, al consumidor y al ambiente [1].

Una de las opciones es el Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades (MIPE), que busca un resultado más sostenible de la actividad agrícola que se realiza, abarcando áreas de trabajo como prácticas culturales (propias de manejo del cultivo), manejo químico (con productos de bajo impacto para las personas y para el ambiente), la etológica (utilización de trampas, feromonas), la botánica (extractos de plantas o sus derivados) y la biológica (utilización de hongos entomopatógenos, bacterias, virus, artrópodos).

El género *Phyllophaga*, conocido como joboto, se ha convertido en los últimos años en una de las plagas insectiles más problemática para los agricultores, debido a que facilita el ingreso de enfermedades, ya que al afectar el sistema radicular permite la entrada de hongos y bacterias fitopatógenas que se aprovechan de las heridas dejadas por las larvas al alimentarse.

Este género está asociado a daños de gran magnitud a nivel de raíces en los cultivos, pudiendo llegar a ser devastador. No tiene límite de cultivo y ataca desde pastos, hortalizas y especies forestales hasta ornamentales. El daño ocasionado en las raíces abarca todo el sistema radicular, llegando a provocar en condiciones extremas la muerte del cultivo. El combate se debe enfocar preventivamente, ya que a menor tamaño de las larvas es más probable tener más éxito con la estrategia utilizada [2].

En Costa Rica se realizó un estudio con la finalidad de identificar las especies de *Phyllophaga sp.* presentes en algunas zonas agrícolas y determinar su asociación con diferentes cultivos; se logró determinar que las especies del género *Phyllophaga* predominantes son *P. menetriesi*, *P. obsoleta*, *P. zunilensis*, *P. elenans*, *P. vicina* y *P. valeriana* [3].

*Phyllophaga sp.* es un insecto de metamorfosis completa; su desarrollo tiene cuatro etapas: huevo, larva, pupa y adulto. Si bien el adulto es capaz de alimentarse del follaje de muchos cultivos, es en la etapa de larva cuando más problema presenta por sus hábitos rizófagos. Sus especies pueden completar el ciclo viviendo en el suelo hasta por dos años. En su ciclo biológico tiene tres estadios en forma de larva; el tercero es el que puede causar más daño [4]. Su clasificación taxonómica se define así: clase: Insecta, orden: Coleoptera, familia: Scarabaeidae, subfamilia: Melolonthinae y género: *Phyllophaga*, especie: (*spp.*) (5).

El manejo cultural de esta plaga es importante.; por ejemplo, al mecanizar el suelo, las larvas quedan expuestas al sol y se desecan o son comidas por las aves. Otra estrategia es la captura de adultos machos y hembras utilizando trampas de luz. Sumado a esta lista de opciones para el manejo y control de *Phyllophaga sp.*, se considera el control biológico como una opción que se describe como el uso de microorganismos benéficos con acción nociva contra las larvas de este insecto. Con su empleo se intenta restablecer el perturbado equilibrio ecológico, mediante la utilización de organismos vivos o sus metabolitos, para eliminar o reducir los daños causados por organismos perjudiciales como los jobotos [6].

Para su control y combate tradicionalmente se han usado insecticidas químicos, los cuales deben ser elegidos bajo un concepto de uso racional y sobre todo, efectivo. El precio de estos productos es alto y cada vez son menos menos eficientes, ya que esta plaga ha adquirido resistencia a las moléculas más comunes que existen en el mercado, como por ejemplo las pertenecientes a los grupos piretroides, organofosforados, benzoylurea y neonicotinoides [7].



Aún con el uso de estos agroquímicos las poblaciones de esta plaga siguen incrementándose y para complicar más la situación, estos productos utilizados son muy tóxicos y de difícil degradación, ocasionando problemas de contaminación.

Actualmente la agricultura se está desarrollando con una tendencia hacia la disminución en el uso de productos químicos, especialmente de las moléculas más tóxicas y perjudiciales para todos los involucrados en el proceso productivo. El manejo y combate de plagas y enfermedades está tomando una orientación más amigable con el ambiente, procurando la sostenibilidad de la actividad agrícola.

El control biológico toma un papel relevante dentro de las estrategias MIPE, mediante la utilización de productos derivados de organismos vivos [6] y tiene una aplicabilidad muy amplia en la producción agrícola, ya que no solo se limita al combate de plagas, sino que también se utiliza para combatir hongos, bacterias y nemátodos.

Entre los productos microbiológicos destacan los hongos y bacterias entomopatógenos, siendo los hongos los que más impacto tienen en el proceso de combate de plagas, ya que las condiciones ambientales pueden favorecer o disminuir su acción. Entre las clases de hongos entomopatógenos, tenemos los *Hyphomycetes*, que incluye al a *Beauveria bassiana*, que se utiliza para el control de esta plaga [6].

El mecanismo que aplican los hongos entomopatógenos sobre los insectos plaga consta de varias etapas: la adhesión o fijación sobre el insecto blanco es la primera; posteriormente el biocontrolador produce estructuras capaces de penetrar el insecto y germina para así ingresar al hospedero. Una vez que ha penetrado y llega a su hemocele, viene la etapa de infección, en la que produce las toxinas que causan la muerte del insecto hospedero [8].

Los microorganismos entomopatógenos usados en el control biológicoincluyen los virus, bacterias, hongos, protozoos y nematodos. La comparación entre estos organismos y los insecticidas químicos convencionales se suele hacer en base a la eficacia y el costo [9].

Las bacterias también forman parte de las herramientas microbiológicas y son utilizadas con mucha frecuencia en los programas MIPE. En este grupo, *Bacillus thuringiensis*, *B. sphaericus* y *B. popilliae* presentan un rango de acción amplio para el combate de plagas y pueden atacar órdenes de insectos como Díptera, Ortóptera, Hymenóptera y Coleóptera [3].

Otro grupo importante de microorganismos muy utilizados en la agricultura para combatir plagas son los nemátodos entomopatógenos. Dentro del control biológico sobre larvas de escarabajo, se han evaluado diferentes especies de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae. Estas se caracterizan por estar asociadas a bacterias simbioses que matan rápidamente al insecto parasitado [10].

Esta investigación tuvo como objetivo general evaluar el efecto y las dosis de cuatro productos biológicos utilizados en el control biológico de larvas de jobotos (*Phyllophaga sp.*) en ambientes protegidos.

## Metodología

El experimento se desarrolló en Guadalupe de Cartago, en las coordenadas geográficas latitud: 9,861 884 y longitud: 83,939 692, a 1400 m.s.n.m. Se utilizó una casa malla (ambiente controlado), con malla antiafidos (Mesh 50 x 25). Una casa malla consiste en una estructura fabricada para proteger contra radiaciones solares y altas temperaturas los cultivos que allí se desarrollen, que consta de una estructura de soporte metálica cubierta por todos sus lados con una malla [11]. El tipo de investigación realizada fue cuantitativo, con un diseño experimental de

bloques completos al azar, con cinco modalidades de tratamiento según el producto de control utilizado, aplicados en dos dosis, con tres repeticiones y cada repetición con diez unidades.

En esta investigación se aplicaron cinco productos comerciales con el fin de determinar su efectividad en *Phyllophaga sp.*: Mycotrol® 11 EW (*Beauveria bassiana*), BotaniGard® 50 WP (*Beauveria Bassiana*), Agro Gold® (Nueve cepas de *Bacillus*), B-Green®, entomonemátodo (*Heterorhabditis bacteriophora*) y Clorpirifos® (insecticida químico como testigo comercial).

Los tratamientos utilizados se detallan en el cuadro 1.

**Cuadro 1.** Tratamientos utilizados para determinar el efecto de cuatro productos biológicos en el combate de *Phyllophaga sp.*

Tratamiento	Descripción de los tratamientos
T1	Mycotrol® 11 EW ( <i>Beauveria bassiana</i> , cepa GHA)
T2	Botani Gard® 50 WP ( <i>Beauveria bassiana</i> , cepa GHA)
T3	Agro Gold® (nueve cepas de <i>Bacillus spp</i> )
T4	B-Green® (entomonemátodo <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> )
T5	Producto químico

Para la realización del proyecto se desarrollaron las fases que se detallan a continuación:

### Fase 1: Preparación inicial

Se utilizaron tres casas malla de cuatro metros cuadrados y de tres metros de alto cada una (anexo 1). Dentro de cada casa malla se colocó sarán en el piso y sobre este las bolsas con el sustrato, elaborado con una mezcla de tierra y granza de arroz y esterilizado con vapor.

En cada ambiente controlado se colocaron cien bolsas con plantas de maíz como cultivo soporte, para que las larvas de joboto pudieran tener condiciones para mantener sus actividades. En total se prepararon trescientas bolsas. Una vez colocadas las bolsas en cada casa malla, se organizaron en grupos de 10 y cada grupo (10 en total) se enumeró de manera secuencial del 1 al 10 en la primera casa, del 11 al 20 en la segunda y del 21 al 30 en la tercera (figura 1).

### Fase 2: Diseño del experimento

El diseño del experimento fue  $2^k$ , con k igual a dos factores (Dosis y Aplicación). Cada tratamiento se aplicó respondiendo a una dosis preestablecida, de tal manera que en los tres ambientes controlados se evaluó la respuesta al producto. En el cuadro 2 se presentan los tratamientos y las dosis utilizadas.



**Figura 1.** Distribución de las unidades experimentales, para determinar el efecto de cuatro productos biológicos en el combate de *Phyllophaga sp.*

**Cuadro 2.** Descripción de los tratamientos y dosis utilizadas para determinar el efecto de cuatro productos biológicos en el combate de *Phyllophaga* sp.

Tratamiento	Producto	Dosis 1	Dosis 2
1	Mycotrol® 11 EW	1,5 cc/litro	2,25 cc/litro
2	Botani Gard® 50 WP	1 gr/litro	1,5 gr/litro
3	Agro Gold®	5 cc/litro	7,5 cc/litro
4	B-Green®	300 000/m <sup>2</sup>	450 000/m <sup>2</sup>
5	Producto químico	1 cc/litro	1,5 cc/litro

Una vez establecidos los tratamientos, se procedió a definir la distribución de las dosis en cada casa malla (cuadro 3).

**Cuadro 3.** Distribución de tratamientos según dosis en cada unidad experimental, para determinar el efecto de cuatro productos biológicos en el combate de *Phyllophaga* sp.

Tratamiento	Dosis 1	Dosis 2
1	1 – 11 - 21	6 – 16 - 26
2	2 – 12 - 22	7 – 17 - 27
3	3 – 13 - 23	8 – 18 - 28
4	4 – 14 - 24	9 – 19 - 29
5	5 – 15 - 25	10 – 20 - 30

### Fase 3: Colocación de larvas

Las larvas de *Phyllophaga* sp. fueron recolectadas en un cultivo de caña del Ingenio El Palmar, ubicado en Miramar de Puntarenas. Las larvas se transportaron en bandejas para evitar el canibalismo entre ellas. En la semana treinta y tres se colocaron tres larvas de *Phyllophaga* sp. por cada bolsa, para un total de novecientas larvas utilizadas.

### Fase 4: Aplicación de productos

En la semana treinta y siete se realizó la primera aplicación de los cinco productos seleccionados para el ensayo. En la semana treinta y ocho se realizó la segunda aplicación de los cinco productos.

### Fase 5: Monitoreo

Durante el ensayo se efectuaron tres monitoreos. El primero se realizó diez días después de la primera aplicación de los tratamientos y tres días después de la segunda aplicación. En esa ocasión se evaluaron tres bolsas de cada unidad experimental por cada dosis utilizada.

El segundo se hizo un mes después de la primera aplicación y tres semanas después de la segunda aplicación; al igual que en el primer monitoreo, se evaluaron tres bolsas de cada unidad experimental por cada dosis utilizada. El tercer monitoreo se realizó cinco semanas después de la primera aplicación y cuatro semanas después de la segunda aplicación; se evaluaron cuatro bolsas de cada unidad experimental por cada dosis utilizada. En todos los monitoreos las bolsas fueron abiertas para extraer por completo el sustrato y revisar con detalle la condición de las larvas de joboto.

### Fase 6: Evaluación de las larvas afectadas

Las larvas de *Phyllophaga sp.* obtenidas en el monitoreo fueron llevadas al Laboratorio de Diagnóstico y Evaluación de la empresa Bio Control, S.A., para determinar el efecto por los productos utilizados.

### Fase 7: Evaluación de resultados.

El diseño del experimento fue 2k, con k igual a dos factores (Dosis y Aplicación). Los datos obtenidos se tabularon y se les realizó un análisis de varianza (andeva).

## Resultados y discusión

Según los resultados obtenidos del análisis estadístico, tres de los cuatro productos microbiológicos presentaron efectos para el control de *Phyllophaga sp.* El producto de mejor resultado fue el Mycotrol® 11 EW, con ingrediente activo *Beauveria bassiana*, cepa GHA, hongo entomopatógeno que mostró alta capacidad patogénica. Los otros dos que produjeron resultados significativos fueron Agro Gold®, formulado a base de nueve cepas de *Bacillus*, y el entomonemátodo *Heterorhabditis bacteriophora*, con nombre comercial B - Green®.

En el cuadro 4 se muestra el resumen de los resultados obtenidos al aplicar un andeva a los datos generados por el experimento; estos datos se clasificaron por tratamiento y la condición de las larvas de *Phyllophaga sp.*, vivas y muertas.

**Cuadro 4.** Valores de probabilidad según las diferentes pruebas aplicadas a los datos procedentes de cada tratamiento y según la condición de las larvas de *Phyllophaga sp.*

Valores de probabilidad (p)						
Tratamiento	Condición de larvas	Homocedasticidad (1)	Normalidad de residuos	Prueba GLM (4)		
				Dosis	Aplicación	Dosis y aplicación
T1	Vivas	0,426	< 0,01 (2)	0,629	0,002	0,629
	Muertas	0,919	< 0,01 (2)	0,027	0,123	0,231
T2	Vivas	0,732	> 0,1 (3)	0,258	0,000	0,258
	Muertas	0,766	< 0,01 (2)	0,573	0,094	0,311
T3	Vivas	0,823	< 0,01 (2)	0,544	0,135	0,873
	Muertas	0,658	< 0,01 (2)	0,113	0,004	0,264
T4	Vivas	0,455	< 0,046 (3)	0,659	0,006	0,973
	Muertas	0,414	< 0,01 (2)	0,807	0,014	0,812
T5	Vivas	0,070	< 0,01 (2)	1,00	0,000	1,00
	Muertas	0,898	< 0,01 (2)	0,260	0,277	0,758

(1) Se utiliza la prueba de Levene para encontrar estos valores de homocedasticidad.

(2) Prueba de normalidad de residuos de Kolmogorov – Smirnov.

(3) Prueba de normalidad de residuos de Ryan – Joiner.

(4) Se realiza un análisis de varianza aplicando la prueba GLM con distribución F – Snedecor.

Todas las pruebas se realizaron con un  $\alpha=0,05$

En el cuadro 4 se analizó los factores dosis, aplicación y dosis x aplicación tanto para la condición de larvas vivas como de larvas muertas en cada uno de los tratamientos realizados. Para fines del estudio solo se consideraron los valores de  $p < 0,05$  obtenidos en la condición de larva muerta en cada tratamiento y según cada factor analizado. Se determinó para T1 (Mycotrol® 11 EW) y para la condición de larvas muertas el factor dosis tuvo significancia estadística, con un valor de  $p = 0,027$  y solo en este tratamiento el factor dosis fue significativo. Para el caso de T3 (Agro Gold®) para la condición de larvas muertas el factor aplicación fue significativo, con un valor de  $p = 0,004$ , y para T4 (B-Green®), en la condición de larvas muertas el factor aplicación fue también estadísticamente significativo, con un valor de  $p = 0,014$ . Para los tratamientos T2 y T5, el valor de  $p$  en la condición de larvas muertas en los tres factores fue  $> 0,05$ . También es importante mencionar que la interacción dosis x aplicación no tuvo significancia estadística en ninguno de los tratamientos y en ninguna de las condiciones de las larvas.

### Tratamiento 1 (T1): Mycotrol® 11 EW

Al analizar los resultados del cuadro 1, se determinó que Mycotrol® 11EW es el producto más eficiente, ya que causa la mayor mortalidad de larvas de *Phyllophaga sp.*. Este producto está formado por el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, cepa GHA. Este hongo se puede encontrar de forma natural en el suelo y causa la muerte de varios órdenes de insectos, por lo que se ha utilizado como biocontrolador contra coleópteros, dípteros, heterópteros, homópteros, lepidópteros, tisanópteros y ácaros tetraníquidos [15], [16].

Este hongo tiene un ciclo de vida que se compone de dos fases, una patogénica y otra saprofítica. El proceso de desarrollo de *Beauveria bassiana* se divide en varias etapas. Se inicia con la adhesión, que es el primer contacto del hongo con el insecto y se da cuando la espora (conidio) se deposita en la superficie del insecto objetivo a través de la aplicación foliar o drench. Luego de la adhesión se da la germinación, etapa en la que el conidio comienza a desarrollar el tubo germinativo, el cual mediante una estructura llamada apresorio se sujeta y de esta manera se fija a la superficie del insecto. Con una humedad relativa de 92 por ciento y temperaturas en un rango de 23 a 25 grados centígrados, una espora puede germinar de manera exitosa. Luego de que la espora se ha adherido y ha germinado (mecanismos físicos), se inicia la etapa de penetración por medio de mecanismos químicos producidos por la acción de enzimas, principalmente proteasas, lipasas y quitinasas. La acción de estas enzimas en la superficie del insecto es hidrolítica y su función principal es la de degradar el tejido en el área por donde el hongo penetra al insecto, facilitando así su entrada [12].

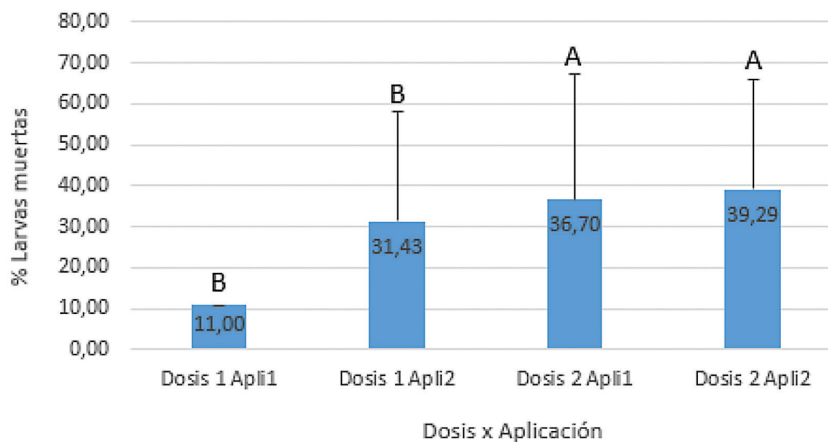
Cuando *B. bassiana* ingresa al hospedero desarrolla estructuras que le permiten colonizarlo; una vez dentro produce toxinas, entre las que destaca la *beauvericina*, la cual favorece la ruptura del sistema inmunológico del insecto, facilitando su entrada en todos sus tejidos. Posteriormente se presenta la muerte de la plaga. Una vez muerto el insecto, el hongo multiplica las hifas (unidades infectivas), las cuales crecen al invadir por completo todo el hospedero. Si las condiciones de humedad relativa y temperatura lo favorecen, el hongo puede crecer sobre el insecto mostrando estructuras de color blanco; si no es así, el insecto muerto mantiene apariencia de momia [12].

Como resultado, la dosis fue significativa, con un valor de  $p = 0,027$ ; se determinaron los datos estadisticodescriptivos para larvas muertas, que se muestran en el cuadro 5.

**Cuadro 5.** Valores en porcentaje y desviación estándar de los datos de larvas muertas, con la prueba GLM, en la interacción de los factores dosis y aplicación, para el producto Mycotrol® 11EW

Tratamiento (T 1)	Media (porcentaje de larvas muertas)	Desviación estándar
Dosis 1 – Aplicación 1	11,00	16,50
Dosis 1 – Aplicación 2	31,43	26,56
Dosis 2 – Aplicación 1	36,70	30,60
Dosis 2 – Aplicación 2	39,29	26,85

En el cuadro 5 se observa que la dosis 2 del tratamiento 1, (2,25 cc/litro), en la segunda aplicación, fue la que causó una mayor mortalidad de larvas. Las dos aplicaciones son importantes debido a que en la primera, el microorganismo tiene que establecerse. Esto implica que el hongo necesita adaptarse a las nuevas condiciones de suelo, humedad, temperatura y radiación. Además, el hongo debe establecerse y multiplicarse para poder actuar como un agente biocontrolador, por lo que de no realizarse un análisis microbiológico para conocer cantidad de esporas presentes por gramo de suelo, lo más recomendable es realizar la segunda aplicación del producto, para asegurar la cantidad de esporas que pueden controlar la plaga.. Por lo que la segunda aplicación viene a reforzar y a incrementar la cantidad de esporas que pueden controlar a la plaga.



**Figura 2.** Gráfico del análisis del porcentaje de larvas muertas según la prueba GLM, con la interacción de los factores dosis y aplicación

Al analizar la figura 2, se determinó que la dosis 2 de T1, (2,25 cc / litro) tuvo efecto sobre las larvas de *Phyllophaga sp.* Con la aplicación 1 se obtuvo un 36,70 % de larvas muertas y con la 2, un 39,29 % de larvas muertas. Aunque la diferencia en cuanto al porcentaje de control entre la primera aplicación y la segunda no fue muy grande, se puede considerar que el incremento en la cantidad de microorganismos en la microbiota del suelo es importante para un mejor control de *Phyllophaga sp.*, por lo que se esperaría que al incrementar las aplicaciones de microorganismos, el control de la plaga sea más eficiente.

El resultado obtenido es consecuente con estudios realizados donde se ha demostrado que *B. bassiana* es un hongo entomopatógeno efectivo para control de plagas [13]. Es importante

considerar que no todas las cepas de hongos entomopatógenos, aunque se hable de un mismo género, tienen la misma virulencia contra una misma plaga [14]. Para el caso de Mycotrol®11 EW, es claro que la cepa de *B. bassiana* GHA sí es virulenta contra larvas de *Phyllophaga sp.*, ya que fue el producto con el que se obtuvo el mejor resultado.

Pese a esa virulencia, las larvas de *Phyllophaga sp.*, al desarrollarse en medios en los que de manera constante están en contacto con una gran diversidad de microorganismos, entre los que se incluyen los hongos entomopatógenos, progresivamente han ido adquiriendo resistencia contra la mayoría de ellos, por lo que cada vez es más difícil encontrar cepas con alta capacidad patogénica.

Mycotrol® 11 EW es un producto de amplio espectro para control de plagas, donde se incluye a los coleópteros. Este producto fue desarrollado por la empresa Mycotech Corp, ubicada en Butte, Montana, USA, la cual utiliza tecnología de avanzada en su biofabricación [17]. La formulación de Mycotrol® 11 EW está basada en tecnología de formulación coloidal, la cual crea una emulsión de transporte coloidal (ETC) que protege los conidios del hongo contra condiciones adversas de clima, como también contra los rayos ultravioleta, lo que permite que la aplicación sea efectiva sin importar el momento del día en que se realice. La ETC también mejora la penetración y la adherencia del producto. La carga iónica que tiene la ETC mueve las conidias de *B.bassiana* al sitio de acción y las adhiere a la cutícula del insecto [18].

### Tratamiento 3 (T3): Agro Gold®

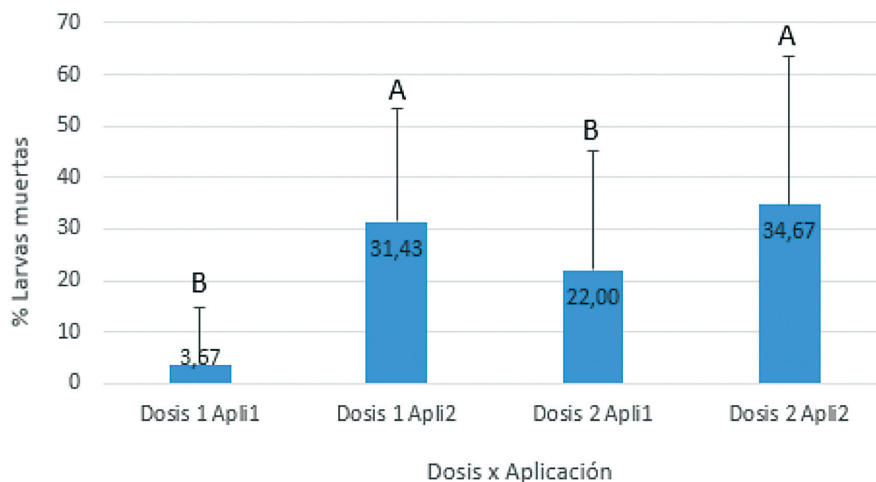
Como se observa en el cuadro 4, para T3, en la condición de larvas muertas la aplicación fue significativa según la prueba GLM, ya que produjo un valor de  $p = 0,004$ . Con este resultado se determinaron los datos estadísticos descriptivos para larvas muertas (anexo 2, figura 8).

Al haber diferencia significativa para el factor aplicación en T3, se procedió a realizar una comparación entre los factores dosis y aplicación con la prueba de Tukey, y se determinó que los porcentajes más altos de larvas muertas se obtuvieron con la aplicación 2, sin importar la dosis utilizada, tal como se observa en el cuadro 6.

**Cuadro 6.** Valores promedio en porcentaje y desviación estándar de los datos de larvas muertas con la prueba GLM, en la interacción de los factores dosis y aplicación para el producto Agro Gold®

Tratamiento (T3)	Media (porcentaje de larvas muertas)	Desviación estándar
Dosis 1 – Aplicación 1	3,67	11,00
Dosis 1 – Aplicación 2	31,43	22,08
Dosis 2 – Aplicación 1	22,00	23,33
Dosis 2 – Aplicación 2	34,67	28,76

Los valores obtenidos, porcentaje de larvas muertas y desviación estándar, se graficaron y tomando el resultado de la prueba de Tukey, se determinó que la aplicación 2 de Agro Gold fue la que tuvo mejor efecto sobre las larvas de *Phyllophaga sp.*



**Figura 3.** Grafico del análisis de porcentaje de larvas muertas según la prueba GLM, con la interacción de los factores dosis y aplicación, para el producto Agro Gold®

Agro Gold® es un producto biológico conformado por nueve cepas de *Bacillus sp.*, una de las cuales es *B. popilliae*; el componente activo *B. popilliae* es grampositivo. Es la bacteria que más éxito ha tenido contra larvas de escarabajos, entre las que se incluye la *Phyllophaga sp.* *B. Papilliae* es un parásito obligado cuyas esporas son muy resistentes a las condiciones adversas que se le pueden presentar en el ambiente, lo que permite que se pueda formular industrialmente y mantener sus características como agente de control biológico. Las larvas de *Phyllophaga sp.* adquieren esta bacteria cuando se alimentan de materiales contaminados con las esporas y estas ingresan al tracto digestivo. Las esporas de *B. popilliae* germinan en el intestino de la larva y las proteínas de cristal paraesporal se liberan y activan, dañando la pared intestinal de este insecto, lo que les permite ingresar fácilmente a la hemolinfa y producirle la muerte [19].

Como cualquier microorganismo, *B. popilliae* necesita de una dosis alta de establecimiento o colonización, para después poder competir con otros por alimento y espacio, como sucede una vez establecido en el suelo, donde competirá con las plagas. La muerte de la larva de *Phyllophaga sp.* es resultado de la acción del esporangio (estructura del *Bacillus*), que está formado por dos partes, la espora y el cristal proteico paraespora, que al germinar en la hemolinfa produce en las larvas una infección conocida como enfermedad lechosa, la cual lesprovoa la muerte [19].

#### Tratamiento 4 (T4): B - Green®

Como se observa en el cuadro 4, para T4, en la condición de larvas muertas la aplicación fue significativa según la prueba GLM, ya que se obtuvo un valor de  $p = 0,014$ . Con este resultado se determinaron los datos estadísticos descriptivos, para las larvas muertas.

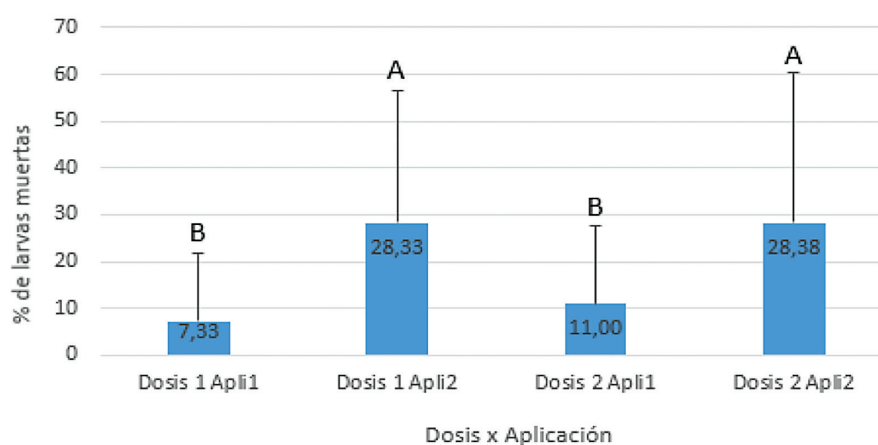
Al haber diferencia significativa para el factor aplicación en T4, se procedió a realizar una comparación entre los factores dosis y aplicación con la prueba de Tukey, y se determinó que los porcentajes más altos de larvas muertas se obtuvieron con la aplicación 2, sin importar la dosis utilizada, tal como se observa en el cuadro 7.

Los valores obtenidos, el porcentaje de larvas muertas y la desviación estándar, se graficaron y tomando el resultado de la prueba de Tukey, se determinó que la aplicación dos (segunda aplicación) de B - Green® fue la que tuvo mejor efecto sobre las larvas de *Phyllophaga sp.*



**Cuadro 7 .** Valores en porcentaje y desviación estándar de los datos de larvas muertas con la prueba GLM, en la interacción de factores dosis y aplicación, para el producto B-Green®

Tratamiento (T4)	Media (porcentaje larvas muertas)	Desviación estándar
Dosis 1 – Aplicación 1	7,33	14,55
Dosis 1 – Aplicación 2	28,33	28,29
Dosis 2 – Aplicación 1	11,00	16,5
Dosis 2 – Aplicación 2	28,38	32,02



**Figura 4.** Gráfico del análisis del porcentaje de larvas muertas según la prueba GLM, con la interacción de los factores dosis y aplicación, para el producto B - Green®

Al analizar la figura 4 se determinó que T4, que corresponde al producto B- Green®, cuyo ingrediente activo es el entomonemátodo *Heterorhabditis bacteriophora* y que está reportado como un agente de control de coleópteros, logró ejercer control sobre el 28,38 por ciento de las larvas de *Phyllophaga sp.* que fueron tratadas. Con las dos aplicaciones que se realizaron del biocontrolador, espaciadas una semana, se logró obtener mejor resultado. Se pudo observar que las dosis no fueron significativas, así que se puede utilizar cualquiera de las dos evaluadas. *H. bacteriophora* vive de manera simbiótica con la bacteria *Photorhabdus luminescens*; el nemátodo transporta la bacteria, que al llegar al hemocele de la larva causa la muerte del hospedero; el estado juvenil 3 de los nemátodos es el que adopta la bacteria para poder actuar sobre nuevos hospederos [20]. La acción de los entomonemátodos se da por la penetración de estos al insecto hospedante. El juvenil que ingresa al insecto lo hace a través de las aberturas naturales ano, boca y espiráculos, o también por puntos o zonas donde la cutícula es muy delgada[21].

La bacteria *P. luminescens* una vez que ha ocasionado la muerte de la larva se encarga de producir antibióticos para evitar que otros microorganismos la invadan; además descompone por completo los tejidos de las larvas, para convertirlas en fuente de alimento para los nemátodos. Los nemátodos se reproducen dentro del cadáver y los juveniles J3, que son los infectivos, migran en busca de nuevas presas [16]. El porcentaje de efectividad de B- Green® fue bajo, lo que se pudo deber a diferentes variables que inciden en la acción del entomonemátodo *H.bacteriophora*, que es el ingrediente activo.

Al considerar todas las posibles vías de ingreso del nematodo, se determinó que entre las variables que afectan la acción del producto sobre la plaga están el acondicionamiento natural de las larvas para repeler la acción de los entomonemátodos, la obstrucción de la boca del hospedero por materia orgánica, el exceso de excretas y esporangios muy estrechos [22]; también la temperatura elevada y una alta radiación solar pueden tener efecto sobre su efectividad [23].

La utilización de los nemátodos entomopatógenos como B-Green® presenta ventajas tales como su fácil aplicación, su disponibilidad comercial, su preparación en agua y su aplicación vía sistema de riego o en *drench* [24]. Los entomonemátodos son inocuos para el ser humano; tras una aplicación masiva y a falta del huésped, permanecen en poblaciones operativas durante meses. En presencia del hospedero se reproducen aumentando sus poblaciones y como son muy específicos en su preferencia por ciertos hospederos, permiten evitar daños secundarios [21].

## Conclusiones

De los cinco productos evaluados en este ensayo (cuatro biológicos y uno químico), cuyo análisis se enfocó en la condición de larvas muertas de *Phyllophaga sp.*, solo tres de los cuatro biológicos tuvieron efecto en el combate de las larvas. Estos productos fueron los correspondientes a los tratamientos T1 (Mycotrol® 11 EW), con  $p = 0,027$  para el factor dosis; T3 (Agro Gold®), con  $p = 0,004$ , y T4 (B-Green®), con  $p = 0,014$ , ambos para el factor aplicación. No se encontró evidencia significativa para los tratamientos T2 (BotaniGard®) y T5 (producto químico) en ninguno de los factores evaluados (dosis, aplicación, dosis x aplicación).

El factor de análisis dosis tuvo significancia estadística, con  $p = 0,027$ , con el producto Mycotrol® 11 EW, T1, que además fue el tratamiento que mejor resultado dio con la dosis dos (2,25 cc/litro). En la primera aplicación se obtuvo un 36,70 % de efectividad y un 39,29 % de efectividad en la segunda aplicación. Este incremento se puede atribuir a un aspecto acumulativo del biocontrolador en el sustrato, por lo que se sugiere realizar aplicaciones periódicas del producto para incrementar su población de esporas en el suelo y así mejorar su eficiencia en el combate de la plaga.

El factor de análisis aplicación tuvo significancia estadística para los tratamientos T3 (Agro Gold®), con  $p = 0,004$ , y T4 (B - Green®), con  $p = 0,014$ . De los dos productos se requirieron dos aplicaciones con una frecuencia semanal para obtener resultado positivo. En el caso del producto Agro Gold®, puesto que se necesitan dos aplicaciones como mínimo y al no haber diferencia significativa entre las dos dosis, se recomienda usar 5 cc/L. En el caso del producto B- Green, se puede aplicar a una dosis de 300 000 nemátodos/m<sup>2</sup>.

Los tres productos evaluados satisfactoriamente para el combate de *Phyllophaga sp.* presentaron porcentajes de control que prueban que pueden ser utilizados en programas de manejo de la plaga. Hay que considerar que estas herramientas deben ser utilizadas bajo criterios técnicos de aplicación siguiendo las recomendaciones apropiadas para el uso de cada una de ellas y teniendo siempre en cuenta que los productos microbiológicos tendrán un mejor impacto desde el punto de vista de control cuando sean utilizados de manera preventiva, o sea iniciando su implementación cuando los niveles de incidencia de la plaga son bajos y esto según el criterio de cada técnico o productor o el umbral económico de cada cultivo.

## Recomendaciones

Los productos, Mycotrol® 11EW, Agro Gold® y B – Green® se pueden utilizar dentro de un programa MIPE para el combate de *Phyllophaga sp.*, ya que se verificó que actúan en el combate de las larvas de esta plaga. Estos productos son una opción en la lucha contra *Phyllophaga sp.*, ya que no tienen impacto negativo para el ambiente ni para los usuarios y permiten que la microflora y la fauna del suelo puedan mantenerse en equilibrio ecológico, mediante un manejo más racional de los recursos.

Es muy importante implementar programas de monitoreo continuo de la plaga para identificar el momento en que están presentes las larvas de *Phyllophaga sp.*, y así poder definir cuándo aplicar alguno de los productos (Mycotrol® 11EW, Agro Gold®, B – Green®), o bien la combinación de ellos, de manera que se pueda lograr que el biocontrolador encuentre las mejores condiciones para realizar su acción sobre el hospedero.

Por ser Mycotrol® 11EW, Agro Gold® y B – Green® productos biológicos, se debe considerar como un requisito importante que su aplicación sea en suelos o sustratos húmedos, ya que la humedad permitirá un desarrollo adecuado de estos organismos, y para el caso particular de B – Green® es fundamental evitar las temperaturas elevadas y la radiación solar alta en el momento de aplicarlo, ya que los entomonemátodos son sensibles a estas variables; lo mejor es aplicar este producto muy temprano en la mañana o bien al atardecer.

## Referencias

- [1] J. Calvo, J. Vargas, M. Araya. "Control químico de *Phyllophaga* en caña de azúcar (*Saccharum officinarum*)". Obtenido de <https://www.atamexico.com.mx/wp-content/uploads/2017/11/5-PLAGAS-2016.pdf>.
- [2] A.B.S. King, "Biología, identificación y distribución de especies económicas de *Phyllophaga* en América Central", en *Biología y Control de Phyllophaga sp.* [Memoria], P.J. Shannon y M. Carballo, eds. CATIE, Costa Rica: 1996, pp. 50 – 61.
- [3] M. G. Klein y H. Kaya, "*Bacillus* and *Serratia* species for scarab control", en *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 90 (1), 87-95, 1996.
- [4] G. Abarca y M. Quesada. "Especies del complejo de jobotos (*Phyllophaga sp.*, *Anomala spp.* y *Cyclocephala spp.*) asociadas a cultivos, en el Valle Central y Pacífico seco de Costa Rica", *Agronomía Mesoamericana* 8 (2), 44-53, 1997.
- [5] T. Cueva M. M., Identificación taxonómica de las especies de *Phyllophaga* (Col. Scarabaeidae) presentes en diez cultivos de importancia económica en la Provincia de Los Ríos, tesis de ingeniería, Universidad de las Fuerzas Armadas, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Carrera de Ingeniería Agropecuaria, Quito, Ecuador, 2014.
- [6] M.H. Badii y J.L. Breu, "Control biológico, una forma sustentable de control de plagas" (Biological control, a sustainable way of pest control), *Daena: International Journal of Good Conscience* 1 (1), 82-89, 2006.
- [7] J. Lorea-Gallardo, J.F. Pérez-Dominguez y L.A. Rodríguez-Del Bosque, "Control químico". Obtenido de [http://recursosbiblio.url.edu.gt/publicjlg/biblio\\_sin\\_paredes/fac\\_agri/2015/plag\\_su/cap/11.pd](http://recursosbiblio.url.edu.gt/publicjlg/biblio_sin_paredes/fac_agri/2015/plag_su/cap/11.pd). [recuperado en 2015].
- [8] R.H. González y P.S. Rojas. Estudio analítico del control biológico de plagas agrícolas en Chile. Santiago: Ed. Universitaria, 1967.
- [9] Maranhão De Albuquerque, Elizabeth Araujo y Eduardo Henrique, "Hongos entomopatógenos: importante herramienta para el control de "moscas blancas"(Homoptera: Aleyrodidae)", en *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica* 5, 2013, 209-242.
- [10] M.P. Quintero, Comparación en laboratorio de la patogenicidad de tres especies de nemátodos entomopatógenos (Rhabditida) sobre larvas de tercer instar de *Phyllophaga menetriesi* (Blanchard)(Coleoptera: Scarabaeidae). tesis en biología, Universidad del Valle, Colombia, 2003.
- [11] C.M. Alvarado, F.A. Díaz y M.R. Hernández, "Tecnología para producir tomate en casa malla para el norte de Tamaulipas", INIFAP, *Folleto para productores*, no. MX-0-310301-49-03-13-10-60, ISBN: 978-607-37-0330-7, 2014.

- [12] G. M. García, G. S. Cappello, G. J. Leshner y M. R. Martínez, "Hongos entomopatógenos como una alternativa en el control biológico", *Kuxulkab* 15 (27), 25-28, 2015
- [13] A. Téllez-Jurado, M. G. Cruz Ramírez, Y. Mercado Flores, A. Asaff Torres y A. Arana-Cuenca, "Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos", *Revista Mexicana de Micología*, 30, 73-80, 2009
- [14] E. Nava-Pérez, C. García-Gutiérrez, J. R. Camacho-Báez y E. L. Vázquez-Montoya, "Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas", *Ra Ximhai*, 8 (3), 17-29. 2012.
- [15] E. Hidalgo, "Uso de microorganismos para el control de *Phyllophaga sp*", *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, 60, i - i v, 2001.
- [16] A. Santamaría, J. Costa-Comelles, A. Alonso, J. M. Rodríguez y J. Ferrer, "Ensayo del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin para el control de la mosca blanca de los cítricos *Aleurothrixus floccosus* (Maskell)(Homoptera: Aleyrodidae) y su acción sobre el parásito *Cales noacki* (Howard)(Hymenoptera: Aphelinidae)", *Bol. San. Veg. Plagas*, 24 (6), 695-706.
- [17] D. Rodríguez, M. Torres, L. Uribe y L. Flores. "Susceptibilidad de los estadios L2 y L3 de *Phyllophaga elenans* a una cepa nativa de *Heterorhabditis sp.* en condiciones de invernadero", *Agronomía Costarricense*, 33 (2), 171-182, 2009.
- [18] J. L. Navas R. Eficacia de *Beauveria bassiana* (Balsamo) vuillemin 1912 como controlador biológico de *Cosmopolites sordidus* Germar 1824 (Coleoptera: Dryophthoridae) en una plantación de banano en la región Caribe de Costa Rica, tesis de licenciatura, Universidad Nacional, Costa Rica, 2011.
- [19] S. P. Wraight and M. E. Ramos, "Application parameters affecting field efficacy of *Beauveria bassiana* foliar treatments against Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*", *Biological Control*, 23 (2), 164-178, 2002.
- [20] Lam International. Ficha Técnica de Mycotrol. Obtenido de <http://lamintl.com/products/bioinsecticides/mycotrol>, 2013.
- [21] J. Zhang, T. C. Hodgman, L. Krieger, W. Schnetter, and H. U. Schairer, "Cloning and analysis of the first *cry* gene from *Bacillus popilliae*," *Journal of Bacteriology*, 179 (13), 4336-4341, 1997.
- [22] T. Ciche, "The biology and genome of *Heterorhabditis bacteriophora*". Obtenido de [http://www.wormbook.org/chapters/www\\_genomesHbacteriophora/genomesHbacteriophora.html](http://www.wormbook.org/chapters/www_genomesHbacteriophora/genomesHbacteriophora.html), 2007.
- [23] A. Sáenz, "Importancia de los nematodos entomopatógenos para el control biológico de plagas en palma de aceite", *Revista Palmas*, 26 (2), 41-57, 2005.
- [24] S. Hazir, H. Kaya, P. Stock, and N. Keskin, "Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests," *Turkish Journal of Biology*, 27 (4), 181-202, 2003.