

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

ESTUDIO FITOCINÉTICO EN UN REACTOR DE INMERSIÓN TEMPORAL PARA LA PROPAGACIÓN *IN* *VITRO* DE ESPECIES VEGETALES

TUTOR ACADÉMICO: Prof. José D. Hernández

TUTOR INDUSTRIAL: Lic. José G. Albarrán

Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela
Por la Br. Gómez F, Maryalba
Para optar al Título
De Ingeniero Químico

Caracas, Diciembre, 2006

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

ESTUDIO FITOCINÉTICO EN UN REACTOR DE INMERSIÓN TEMPORAL PARA LA PROPAGACIÓN *IN* *VITRO* DE ESPECIES VEGETALES

Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela
Por la Br. Gómez F, Maryalba
Para optar al Título
De Ingeniero Químico

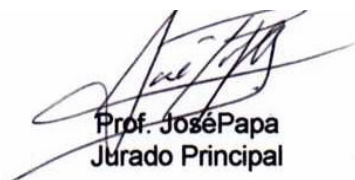
Caracas, Diciembre, 2006

Caracas, Diciembre del 2006

Los abajo firmantes, miembros del Jurado designado por el Consejo de Escuela de Ingeniería Química, para evaluar el Trabajo Especial de Grado presentado por la Bachiller Maryalba Gómez Fermín, titulado:

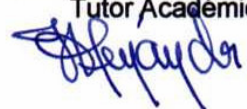
**“ESTUDIO FITOCINÉTICO EN UN REACTOR DE INMERSIÓN
TEMPORAL PARA LA PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE ESPECIES
VEGETALES”**

Consideran que el mismo cumple con los requisitos exigidos por el plan de estudios conducen al Título de Ingeniero Químico, y sin que ello signifique que se hacen solidarios con las ideas expuestas por el autor, lo declaran APROBADO.

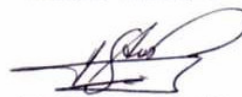


Prof. José Papa
Jurado Principal

Prof. José Domingo Hernández
Tutor Académico



Prof. Humberto Kum
Jurado Principal



Inv. José Albarrán
Tutor Investigador



Facultad de Ingeniería



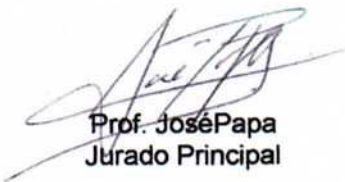
Universidad Central de Venezuela

ACTA MENCIÓN HONORÍFICA

Los abajo firmantes, miembros del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado de la Bachiller **Maryalba Gómez F**, CI: **14.033.233**, cuyo título es **"ESTUDIO FITOCINÉTICO EN UN REACTOR DE INMERSIÓN TEMPORAL PARA LA PROPAGACIÓN IN VITRO DE ESPECIES VEGETALES."** queremos dejar constancia del nivel del trabajo realizado, ya que el mismo en cuanto a su ejecución, presentación y utilidad de los resultados ameritó que se le asignara la nota máxima obtenible en estos casos: **Veinte puntos (20)**.

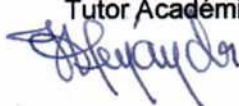
Así mismo, hemos decidido concederle **MENCIÓN HONORÍFICA** como un reconocimiento a la excelencia del trabajo realizado con la aplicación de conocimientos de ingeniería química a la producción agrícola. En este trabajo se integraron disciplinas como el diseño de reactores, modelaje matemático, ingeniería metalúrgica, biotecnología con botánica culminando con una posible patente de un prototipo de reactor de inmersión temporal

Dado en Caracas, a los siete días del mes de diciembre del año dos mil seis.


Prof. José Papa
Jurado Principal


Prof. Humberto Kum
Jurado Principal

Prof. José Domingo Hernández
Tutor Académico




Inv. José Albarrán
Tutor Investigador

Dedicatoria

*A mi Madre... Quien me enseñó que lo importante no es llegar de primero, sino
llegar.*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a Dios por poner en mi camino a todas aquellas maravillosas personas que colaboraron conmigo para llevar a feliz término esta investigación.

A mi querida Universidad Central de Venezuela, por ser la casa que ha albergado mis conocimientos y aspiraciones.

A mi Padre Académico, por sus consejos, correcciones y en especial por brindarme su apoyo en los momentos que más lo necesite. A usted Profesor Humberto Kum, gracias de todo corazón y que Dios lo colme de bendiciones por siempre.

A mis tutores por haber sido unos compañeros de experiencia en este arduo trabajo.

A mi familia, por haber soportado conmigo esta lucha para ser un profesional.

A los señores Juan Esaa y Juan Jiménez (Kinex C.A) por brindarnos su experiencia y grandes ideas en el diseño del prototipo.

En general a todas aquellas personas que para mal o para bien han estado cerca para enseñarme que la pelea es peleando y nunca debemos dejarnos vencer antes las adversidades de la vida.

Gómez F. Maryalba

**ESTUDIO FITOCINÉTICO EN UN REACTOR DE INMERSIÓN
TEMPORAL PARA LA PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE ESPECIES
VEGETALES**

**Tutor Académico: Prof. José D. Hernández. Tutor Industrial: Inv. José G.
Albarrán. Tesis. Caracas, U.C.V. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería
Química. 2006, 117 pag.**

Palabras Claves: Biorreactores, Modelos Matemáticos, Musáceas, análisis multivariable.

Las Musáceas son una especie vegetal de un alto valor agregado para la economía de muchos países tropicales, entre ellos Venezuela, por esta razón ha surgido la necesidad de establecer y diseñar sistemas que faciliten la propagación de estas plantas. El sistema de propagación *in vitro* en medio semisólido es uno de los métodos más utilizados en la actualidad, pero demanda el uso de considerable mano de obra capacitada, alto consumo de reactivos y un amplio espacio físico, entre otros. Otro de los sistemas desarrollados para tal fin son los Biorreactores de Inmersión Temporal, los cuales permiten automatizar los procesos de cultivo de las plantas como ventaja principal. Con base a esto y considerando que no se tiene conocimiento acerca de que en Venezuela se haya desarrollado un Biorreactor de este tipo para la propagación vegetal surgió el interés de diseñar, construir y evaluar un Biorreactor de Inmersión Temporal Prototipo financiado por el proyecto ordinario ID-ARA-05-010 a cargo del INIA-CENIAP. Para ello se utilizaron criterios de diseño para biorreactores como la velocidad del flujo de aire, volumen, diámetro del equipo y condiciones de operación (presión y temperatura); además, se estudiaron todos aquellos materiales que sirvieron para la construcción de cada una de sus partes y el diseño del sistema de inyección de aire que controla la frecuencia y tiempo de inmersión, además de la presión y flujo de aire que entran al biorreactor. Se establecieron como condiciones de operación una presión de 0,2 barg y temperatura de 27 ± 2 °C; Frecuencia de Inmersión de 4h y Tiempo de Inmersión de 5 min. Por otra parte se estudió el comportamiento de la biomasa de la planta en el sistema *in vitro* tradicional en medio semisólido a través de la gráfica de la Curva de Crecimiento Sigmoidal de la planta y se establecieron comparaciones con la curva obtenida mediante la utilización del biorreactor prototipo construido, obteniendo resultados altamente satisfactorios con respecto al aumento de la biomasa de la planta en función del tiempo dentro del biorreactor; además de evaluar el efecto de la deshidratación inicial de la planta y el momento en que esta empieza a adaptarse al medio, en ambos sistemas, generando valores representativos y favorables para el Biorreactor prototipo.

Por otra parte, estudios adicionales respecto a la absorción de nutrientes en la planta utilizando el biorreactor diseñado en este estudio, permitieron determinar el momento

óptimo para el cambio de medio nutritivo líquido, estableciéndose a partir del día 18 respecto a 30 días de duración del experimento.

Los valores correspondientes al análisis de concentración de los nutrientes Fósforo, Calcio, Magnesio y Potasio sirvieron de base para el desarrollo de un modelo matemático, mediante la aplicación del paquete estadístico STATISTICA 7.0, el cual posee técnicas de análisis multivariable necesarias para el caso particular de este estudio; además, del análisis de componentes principales, el cual permitió construir una ecuación de regresión múltiple (dependiente de múltiples variables) que represente el momento en que la planta requiere de un cambio de medio nutritivo para continuar con su desarrollo.

El modelo obtenido es estadísticamente significativo en todas las variables principales involucradas en el estudio; ya que el análisis de varianza arrojó un valor menor al reportado en la bibliografía de 0,0019 ⁽²³⁾

El modelo matemático reportado en este estudio, es un modelo predictivo que puede ser utilizado para evaluar los cambios en alguna de las variables propuestas en esta investigación, con el fin de observar los efectos en la planta y su correspondencia con los valores numéricos obtenidos mediante la aplicación de la ecuación; es decir comparar los resultados teóricos con los experimentales para un instante de tiempo determinado.

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras.....	..iii
Índice de Tablas.....	..vii
CAPÍTULO I. FUNDAMENTOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	...1
I.1 Planteamiento del problema.....	...1
I.2 Objetivos.....	...5
I.2.1 Objetivo General.....	...5
I.2.2 Objetivos Específicos.....	...5
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	...7
II.1 Curva de Crecimiento Sigmoidal.....	...7
II.2 Biotecnología y Propagación <i>in vitro</i>	...9
II.2.1 Definición de Biotecnología y Áreas de aplicación.....	...9
II.3 Propagación <i>in vitro</i>	...11
II.3.1 Ventajas y Mecanismos de la Mipropagación <i>in vitro</i>	...12
II.3.2 Desarrollo del cultivo <i>in vitro</i>	...14
II.3.3 Factores que afectan el sistema de cultivo.....	...15
II.4 Biorreactores.....	...19
II.4.1 Definición y funcionamiento de los Biorreactores.....	...19
II.4.2 Tipos de Biorreactores.....	...21
II.4.3 Aplicaciones de los Biorreactores.....	...27
II.4.4 Diseño de Biorreactores.....	...31
II.5 Modelaje Matemático.....	...38
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	...44
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	...51

IV.1. Estudio del Sistema de Propagación <i>in vitro</i> Tradicional en Medio Semisólido.....	..51
IV.2. Diseño, puesta en marcha y evaluación del biorreactor prototipo.....	..56
IV.2.1. Filtros de Aire.....	..59
IV.2.2 Volumen del Biorreactor.....	..67
IV.2.3. Presión y Temperatura.....	..68
IV.2.4 Selección de materiales de construcción del biorreactor.....	..70
IV.2.5 Tiempo y Frecuencia de Inmersión.....	..70
IV.2.6 Sistema de Inyección de Aire.....	..70
IV.2.7 Estudio del Biorreactor de Inmersión Temporal Prototipo.....	..72
IV.3 Curva de Absorción de Nutrientes.....	..76
IV.4 Construcción del Modelo Matemático.....	..81
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES.....	..97
CAPÍTULO VI. RECOMENDACIONES.....	..100
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	..102
ANEXOS.....	..107

INDICE DE FIGURAS

		Pg
Figura N°1	Banco de Germoplasma de Musa del INIA CENIAP, Maracay.....	4
Figura N°2	Curva de Crecimiento Sigmoidal y su derivada.....	7
Figura N°3	Vista del Banco de Germoplasma de Yuca del INIA–CENIAP (Maracay).....	12
Figura N° 4	(a) Formación de Masas Callosas Blancas, Amarillas y raíces (Organogénesis) a partir de hojas de Cedro, (b) Embriones Somáticos a partir de Hojas de Cedro (Embriogénesis).....	13
Figura N° 5	(a) Callo Embriogénico. (b) Brote vegetal a partir de Callo Embriogénico.....	14
Figura N° 6	Micropropagación <i>in vitro</i> de Orquídeas.....	19
Figura N° 7	Tanque Agitado (el mezclado se realiza mecánicamente).....	21
Figura N° 8	Biorreactor tipo “Air Lift”	22
Figura N° 9	Sistema Automatizado de Cultivo Vegetal.....	24
Figura N° 10	Sistema RITA® de inmersión temporal para la propagación de plantas.....	25
Figura N° 11	Sistema BIT para la propagación masiva de plantas. Desarrollado por la Universidad Ciego de Ávila (Cuba).....	26
Figura N° 12	(a)Biorreactores enzimáticos para la degradación de vertidos industriales contaminados con fenoles. (b) biorreactores utilizados para cultivo de bacterias en el proceso de Fermentación.	28
Firura N° 13	Esquema del reactor anaerobio de flujo ascendente (RAFA), utilizado para evaluar la remoción de plomo de efluente líquido.....	29
Figura N° 14	Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT) para la propagación de plantas elaborado por el Centro de Bioplantas. Cuba.....	30
Figura N° 15	Toma de recolección de muestra.....	32

Figura N° 16	Filtro OptiScale de Membrana de Ester de Celulosa.....	33
Figura N° 17	Efecto "flooding" en los Biorreactores.....	35
Figura N° 18	Parámetros de diseño de un Agitador de Turbina.....	36
Figura N° 19	Esquema de funcionamiento de un Biorreactor en un proceso de Fermentación.....	36
Figura N° 20	Esquema del proceso interactivo para el desarrollo y la validación de modelos apoyados en la formación de experimentos de campo y su utilidad en el manejo de sistemas agrícolas.....	42
Figura N° 21	(a) Soluciones para la preparación del medio de cultivo. (b) Regulación de pH. (c) Agitación y calentamiento del medio de cultivo.....	45
Figura N° 22	(a)Frascos con medio de cultivo para esterilizar, (b) Esterilización del medio de cultivo por medio de Autoclaves.....	46
Figura N° 23	(a) Cormo de Pino. (b) Cormo reducido del tamaño por la eliminación de las vainas foliares externas.....	47
Figura N° 24	Callo de Pino Gigante AAA.....	51
Figura N° 25	Cultivo de brotes de Pino Gigante AAA a diferentes masas iniciales en el sistema de propagación <i>in vitro</i> tradicional en medio semisólido.....	52
Figura N° 26	Curvas de crecimiento sigmoideal para los tres callos de Pino Gigante AAA en estudio.....	53
Figura N° 27	Curva de crecimiento Sigmoideal promedio para el sistema de propagación <i>in vitro</i> en medio semisólido (sistema tradicional).....	55
Figura N° 28	Esquema General del Biorreactor de Inmersión Temporal Prototipo.....	57
Figura N° 29	Partes del Biorreactor de Inmersión Temporal. (a) Tapa del contenedor superior. (b) Contenedor superior.(c) Contenedor inferior con soporte central. (d) Diseño final del biorreactor prototipo.....	58

Figura N° 30	Vista interior del filtro de Aire diseñado para el Biorreactor de Inmersión Temporal Prototipo.....	59
Figura N° 31	Mangueras para transporte de fluidos de alta presión.....	61
Figura N° 32	Ensayo para la elección de los tamaños de partícula del carbón activado destinado a la construcción de los filtros de Aire del Biorreactor prototipo.....	62
Figura N° 33	Envases de vidrio de 125 ml con y sin el filtro seleccionado. Cultivo de cuatro microestacas de yuca en un Medio de Cultivo para Propagación Tradicional en Medio Semisólido.....	64
Figura N° 34	Medición de las variables.(a) Longitud de Vástago y (b) longitud de Raíz principal.....	64
Figura N° 35	Diagrama de Barras. Longitud de Vástagos y Raíces para las experiencias con y sin filtro.....	66
Figura N° 36	Diagrama de Barras. Peso Fresco para las experiencias con y sin filtro.....	66
Figura N° 37	Filtro de aire diseñado para el biorreactor prototipo.....	67
Figura N° 38	Sistema de Inyección de Aire. (a) Controlador de tiempo y Frecuencia de inmersión. (b) válvulas reguladoras del flujo de Aire. (c) Compresor de aire. (d) Regulador de Presión de Precisión.....	71
Figura N° 39	Comparación entre las curvas de crecimiento sigmoideal de la planta en los sistemas <i>in vitro</i> tradicional y para el Biorreactor y etapas de crecimiento de la planta.....	73
Figura N° 40	Fases del crecimiento del callo de Pineo Gigante AAA. (a) Callos en la fase inicial I (t= 0 días). (b) y (c) Callo en la fase II (t= 12 y t= 15 días).(d) Planta totalmente formada (t= 30 días).....	75
Figura N° 41	Comportamiento de la Concentración de los nutrientes Fósforo Potasio, Calcio y Magnesio en el medio nutritivo.....	78
Figura N° 42	Porcentaje de nutrientes fósforo, Potasio, Calcio y Magnesio presentes en el medio nutritivo.....	79

Figura N° 43	Velocidad de absorción de los Nutrientes fósforo, Potasio, Calcio y Magnesio dentro del medio de cultivo del Biorreactor prototipo.....	80
Figura N° 44	Ejemplo de la Gráfica Biplot que muestra el componente principal entre las variables Fósforo y Calcio.....	84
Figura N° 45	Rotación del Componente Principal.....	85
Figura N° 46	Reducción dimensional final, de dos dimensiones a una dimensión.....	86
Figura N° 47	Gráfica Biplot del sistema en estudio, con una reducción dimensional de siete a dos dimensiones.....	87
Figura N° 48	Gráfico Biplot del sistema en estudio, con una reducción dimensional de seis a dos dimensiones, generada al excluir la variable tiempo del estudio.....	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1	Variación de la biomasa de los 3 callos de Pineo Gigante AAA en estudio.....	52
Tabla N°2	Composición de las telas seleccionadas en la elaboración de los filtros de aire.....	61
Tabla N°3	Características de los filtros ensayados. Número de Mech, tamaño de partícula e intersticios del carbón activado, así como su comportamiento ante la contaminación.....	63
Tabla N° 4	Evaluación de efectividad de los filtros de Aire durante 2 meses de prueba.....	65
Tabla N° 5	Comportamiento de la Biomasa de las plantas dentro del Biorreactor y del Sistema <i>in vitro</i> Tradicional.....	72
Tabla N° 6	Variación en el tiempo del contenido de macronutrientes en el medio de cultivo líquido dentro del Biorreactor Prototipo.....	76
Tabla N° 7	Matriz de Estado, correspondiente a la variación de las concentraciones en el medio nutritivo, comportamiento de la biomasa de la planta y definición de estados.....	83
Tabla N° 8	Análisis de los componentes principales.....	86
Tabla N° 9	Significancia estadística de las variables estudiadas.....	88
Tabla N° 10	Análisis de los componentes principales, excluyendo la variable tiempo.....	89
Tabla N° 11	Matriz de Coeficientes de Correlación.....	91
Tabla N° 12	Coeficientes de Regresión, varianzas y errores estándar asociados al Modelo Matemático obtenido del estudio.....	93

CAPÍTULO I

FUNDAMENTOS DE LA INVESTIGACIÓN.

En este capítulo se presentan los fundamentos que motivaron la realización de esta investigación, abarcando el planteamiento del problema, el objetivo general, los objetivos específicos establecidos en este Trabajo Especial de Grado.

I.1 Planteamiento del problema

La agricultura del siglo XXI se enfrenta a problemas sin precedentes, como el desmesurado crecimiento de la población global, con una base de recursos naturales cada vez más frágil. Numerosa es la cantidad de personas que viven en zonas rurales de países pobres, sufriendo de hambre crónica, y millones padecen de carencias nutricionales, debido a la baja calidad en su alimentación habitual. Al mismo tiempo, una población mundial en vías de rápido crecimiento exige a la agricultura una variedad mayor de atributos de calidad, no solo en lo que respecta a los productos en sí, sino también en los métodos empleados para producirlos.

Existen indicios alentadores de que la biotecnología agrícola puede contribuir a afrontar estos retos, permitiendo acelerar los programas convencionales de mejoramiento y ofrecer al agricultor material de plantación libre de enfermedades, en sustitución de productos químicos que son perjudiciales para el medio ambiente y la salud humana. Además ofrece instrumentos de diagnóstico y vacunas que ayudan a combatir enfermedades en los animales de forma significativa y permite mejorar la calidad nutricional de alimentos y frutas básicos como el arroz, maíz, yuca y plátano, entre otros, creando nuevos productos con fines nutricionales, sanitarios y comerciales. Aunado a esto, los países en vía de desarrollo necesitan aumentar la superficie de terrenos cultivados para cubrir la demanda alimentaria en crecimiento

constante, mediante la aplicación de técnicas que no agoten los recursos de la tierra o causen daños permanentes al medio ambiente.

En la actualidad, las personas viven muy preocupadas por su alimentación. El consumidor tiende a asociar alimentos naturales con alimentos sanos y seguros. Centenares de científicos de distintas disciplinas (química, farmacia, ingeniería) trabajan en los centros de investigación de la industria alimentaria para desarrollar productos adaptados a las necesidades de una población, que es cada día más numerosa.

Mediante las técnicas de biotecnología moderna, es posible obtener productos vegetales rápidamente y en mayor cantidad en comparación con la manera tradicional; nuevas variedades de plantas con características mejoradas, tolerancia a condiciones adversas, resistencia a herbicidas específicos, control de plagas, cultivo durante todo el año y control de malezas, entre otros ⁽¹⁾.

La micropropagación de las plantas es una de las técnicas de mayor aplicación en la industria biotecnológica actual, sin embargo su expansión en el futuro está condicionada a la existencia de tecnologías que permitan su automatización y mejoren los protocolos de aclimatización de las plantas ⁽²⁾.

Uno de los sistemas de micropropagación que ha generado grandes avances en el campo, es la aplicación de biorreactores de inmersión temporal, los cuales contribuyen a reducir los costos de producción de las plantas, mano de obra, reactivos y material fungible (materiales y equipos de uso general en laboratorios), niveles de contaminación y manipulación de explantes (parte de una planta que es utilizada para el cultivo *in vitro*), mejorando el porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia de las plantas en la etapa de aclimatización, obteniendo plantas certificadas y de alta calidad, logrando de esta manera automatizar los mecanismos de propagación *in vitro* utilizados en el país.

El reto es transferir el sistema en estudio (Biorreactor de Inmersión Temporal) a los agricultores en las zonas productoras, para mejorar los rendimientos del cultivo, así como la calidad de vida de los mismos, quienes son directamente los mayores beneficiados.

Para ello se pretende diseñar, construir y evaluar un biorreactor de inmersión temporal prototipo, en base a criterios ya establecidos para la propagación *in vitro* de especies vegetales adaptables a las condiciones del ecosistema de cada región.

El aspecto principal a considerar es el estudio cinético de las reacciones que se llevan a cabo dentro del biorreactor (absorción de nutrientes), ya que al ser una nueva tecnología no se han desarrollado modelos que permitan describir el crecimiento de las plantas bajo un ambiente controlado, a diferencia de los ya conocidos estudios para el crecimiento microbiano utilizados en el diseño de reactores para el tratamiento de aguas residuales, la obtención de antibióticos y la fermentación de levaduras.

La variedad de planta utilizada para el estudio es el Pineo Gigante (cambur o banano) que se puede apreciar en la Figura N° 1, genotipo de acuminata AAA; variedad comercial perteneciente a la colección del banco de germoplasma de *Musa* (género vegetal al cual pertenecen los plátanos y cambures) ubicada en el Campo experimental del CENIAP Maracay, Estado Aragua, el cual representa uno de los rubros estratégicos para el país, con fines de seguridad alimentaria. La investigación que pretende llevarse a cabo en este Trabajo Especial de Grado forma parte de una de las líneas de investigación del Laboratorio de Biotecnología del CENIAP-INIA Maracay.



Figura N° 1 Banco de germoplasma de Musa del INIA CENIAP, Maracay

Los plátanos y cambures pertenecen al género *Musa*, familia Musáceae, orden Zingiberales ⁽³⁾, Son usados en la alimentación humana y ocupan el cuarto lugar entre los alimentos a escala mundial, representando el principal alimento para al menos 400 millones de personas en el Trópico y África; sin embargo su expansión en el futuro se ha visto limitada por escasez del material vegetal debido a la proliferación de enfermedades, virus e insectos perjudiciales, entre otros aspectos. Por esta razón la técnica de micropropagación *in vitro* es de gran utilidad para la multiplicación masiva de este tipo de plantas.

Además, de ser útil para el consumo humano y animal, las musáceas son altamente utilizadas en la industria, para la producción de papel, textil, en la construcción de viviendas (para lograr mayor resistencia) y en la elaboración artesanal de esteras, sombreros y sillas ⁽⁴⁾.

I.2 Objetivos

En función del planteamiento anterior, se propone como fin de la investigación un objetivo general, y una serie de objetivos específicos que conjunto pueden llevar a feliz término el desarrollo del proyecto.

I.2.1 Objetivo General

Desarrollar el modelo Fitocinético para la propagación masiva de Pineo Gigante *in vitro* en un biorreactor de inmersión temporal.

I.2.2 Objetivos Específicos

- Diseñar un prototipo de Biorreactor de Inmersión Temporal estableciendo sus parámetros de diseño:
 - Volumen del Biorreactor
 - Tiempo de Inmersión (TI)
 - Frecuencia de Inmersión (FI)
 - Flujo de aire (F)
- Construir un Biorreactor prototipo
- Estudiar experimentalmente la absorción de nutrientes y el crecimiento de la planta
- Elaborar la curva de crecimiento Sigmoidal del Pineo Gigante
- Comparar resultados experimentales con los teóricos generados por el modelo cinético.

- Comparar el desempeño del sistema convencional de propagación *in vitro* con el de Inmersión Temporal.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

En este capítulo se presentan todos aquellos estudios y definiciones que sirven de apoyo para el desarrollo de la investigación.

II.1. Curva de crecimiento Sigmoidal

La curva de crecimiento Sigmoidal corresponde a una función matemática Logística que ejemplifica el comportamiento del tamaño o peso de un organismo en función del tiempo; ajustada a un modelo matemático, útil para interpolar entre datos medidos y estudiar el efecto de un procedimiento experimental sobre el crecimiento de las plantas u órganos vegetales que se están evaluando ⁽⁵⁾. La Figura N° 2 (a) presentada a continuación muestra la curva de crecimiento sigmoidal en la que se pueden reconocer tres fases principales ⁽⁵⁾:

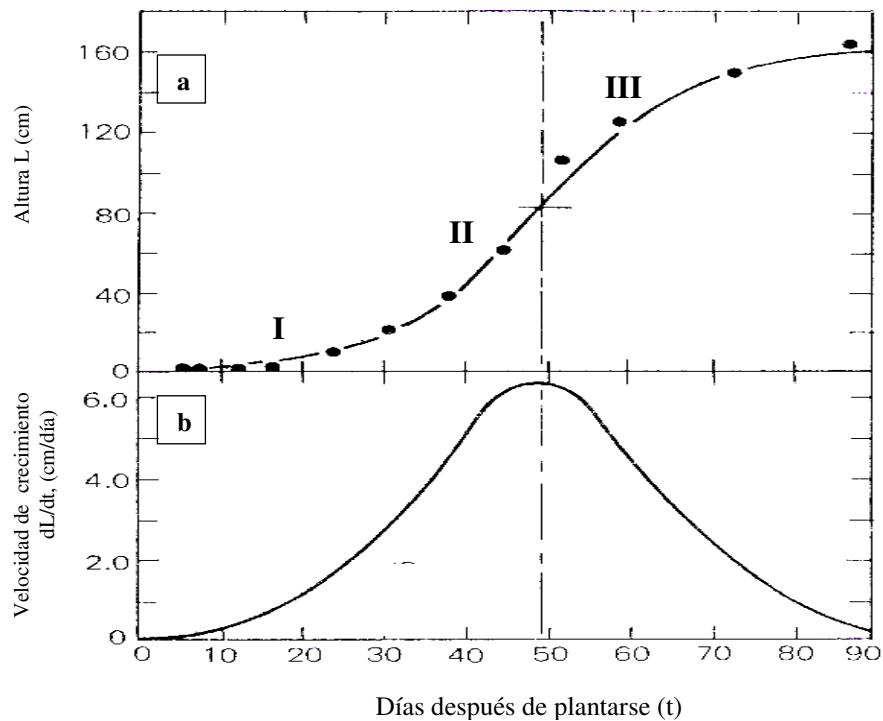


Figura N° 2. Curva de Crecimiento Sigmoidal y su derivada.

- *Fase Exponencial (I)*: Se puede apreciar que el tamaño (L) aumenta de manera exponencial con el tiempo (t). Esto significa que la rapidez de crecimiento $\left(\frac{dl}{dt}\right)$ es baja al principio, pero aumenta en forma continua como se observa en la Figura N° 2 (b). En esta etapa los organismos ya se han adaptado perfectamente al medio.
- *Fase Lineal (II)*: El aumento de tamaño continua a una velocidad constante y usualmente máxima por algún tiempo (Fig. 2-b). La rapidez de crecimiento está indicada por una pendiente constante en las curvas de altura (superiores) y por la parte horizontal de las curvas de rapidez (inferiores).
- *Fase de Senescencia (III)*: Se caracteriza por una curva decreciente del crecimiento como se puede apreciar en la caída de la curva de velocidad de la Figura 2(b) ocurre a medida que la planta alcanza la madurez y comienza a envejecer dejando un registro de su crecimiento, y un indicio de su potencial de crecimiento futuro; se caracteriza por una velocidad constante (nula) como puede observarse en la Figura N° 2. En esta última fase de crecimiento, la planta ha alcanzado su densidad máxima y podría seguir los siguientes caminos:
 - Mantenerse en el mismo tamaño durante largo tiempo.
 - Aumentar lentamente, con una mejor adaptación al medio.
 - Declinar de forma progresiva, hasta llegar a la extinción.
 - Fluctuar regular o irregularmente.

II.2 Biotecnología y propagación in vitro.

A continuación se desarrollan tópicos esenciales para la comprensión de la Biotecnología; como la técnica de cultivo *in vitro*, ventajas y áreas de aplicación, factores preponderantes para su desarrollo, y su importancia en la economía actual.

II.2.1 Definición de biotecnología y áreas de aplicación

La Biotecnología es una actividad multidisciplinaria que incorpora los principios científicos y de la ingeniería, al procesamiento de materiales por agentes biológicos para proveer bienes y servicios. Los agentes biológicos pueden ser células microbianas, animales, vegetales y enzimas. Entendiéndose por bienes a cualquier producto industrial relacionado con alimentos, bebidas, productos medicinales, etc; y por servicios a aquellos vinculados a la purificación de aguas y tratamiento de efluentes ⁽⁶⁾

Por el hecho de considerar a la Biotecnología como una actividad multidisciplinaria, ésta se encuentra intrínsecamente relacionada con distintas áreas del conocimiento científico entre las cuales se pueden mencionar ⁽⁷⁾:

- *Biología Molecular*: Provee información detallada sobre las características moleculares de los sistemas vivientes (ácidos nucleicos, sistemas enzimáticos) y la forma en que se expresan y transmiten sus características individuales de una generación a otra.
- *Ingeniería Genética*: Comprende una serie de técnicas que permiten obtener un organismo recombinante, es decir, portador de un gen extraño a partir de otras células, sean éstas microbianas, vegetales o animales. Es una disciplina derivada de la Biología molecular que está incluida en la Biotecnología como herramienta fundamental para la obtención de microorganismos específicos.

La ingeniería Genética es una herramienta muy poderosa para el desarrollo de alternativas ambientales como productos y procesos que eviten la contaminación del ambiente y el agotamiento de los recursos no renovables ⁽⁸⁾

- *Ingeniería Ambiental:* Actualmente, la principal aplicación de la biotecnología ambiental es controlar o reducir la polución. La limpieza del agua residual fue una de las primeras aplicaciones, seguida por la purificación del aire y gases de desecho mediante el uso de biofiltros. En la actualidad muchas industrias están desarrollando procesos en el área de prevención de la contaminación, con el fin de reducir el impacto ambiental como respuesta a la tendencia internacional hacia el desarrollo de una sociedad sustentable. La biotecnología puede ayudar a producir nuevos productos que tengan menos impacto ambiental.

La biotecnología puede ser utilizada para evaluar el estado de los ecosistemas, transformar contaminantes en sustancias no tóxicas, generar materiales biodegradables a partir de recursos renovables, desarrollar procesos eficientes de producción de bienes y servicios y manejo seguro de desechos ⁽⁷⁾.

- *Bioingeniería:* Tiene por objetivo el diseño de modelos y dispositivos que simulan o se inspiran en objetos, mecanismos o sistemas de la vida. Algunos de sus productos sirven de prótesis o material de recambio (marcapasos, riñones artificiales, audífonos, dializadores, etc). denominándose en este caso "bioingeniería médica". Otro aspecto de interés en la Bioingeniería ha sido el desarrollo de equipos y procesos, donde mediante la propagación de pequeñísimos seres vivos se pueden generar productos beneficiosos para el hombre (antibióticos, alimentos, bebidas, enzimas, productos industriales obtenidos por fermentación, cultivos celulares). Estos casos son los de la "bioingeniería de las fermentaciones" y de cultivos de células o similares, que considera el diseño y operación de biorreactores ⁽⁷⁾.

- *Microbiología Industrial*: Puede definirse como la parte de la Microbiología que se ocupa de las aplicaciones industriales de los microorganismos. También se puede decir que la Microbiología Industrial agrupa aquellos procesos industriales catalíticos basados en el uso de microorganismos. La biorremediación (uso de sistemas biológicos para la reducción de la polución del aire o de los sistemas acuáticos y terrestres) se está enfocando hacia la limpieza del suelo y los residuos sólidos provenientes de las industrias, tratamientos de aguas domésticas e industriales, aguas procesadas y de consumo humano, aire y gases de desecho, lo que está provocando que surjan muchas inquietudes e interrogantes debido al escaso conocimiento de las interacciones de los organismos entre sí, y con el suelo.

Dentro de la biotecnología industrial encontramos la agrícola, la cual está diseñada para resolver problemas en todos los aspectos de la producción y elaboración agrícola, incluido el fito mejoramiento para elevar y estabilizar el rendimiento, resistencia a plagas y a condiciones abióticas adversas como la sequía y el frío, y aumentar el contenido nutricional de las plantas ⁽⁷⁾.

II.3 Propagación in vitro

La micropropagación o propagación vegetal *in vitro* se refiere a la producción masiva de células, tejido u órganos de plantas en un medio aséptico que le aporte los nutrientes necesarios para su desarrollo; consiste en tomar pequeñas secciones del tejido vegetal de una planta o estructuras enteras como yemas y cultivarlas en condiciones artificiales para regenerar plantas completas. Es especialmente útil para conservar plantas valiosas, mejorar especies (en aquellos casos en que es difícil hacerlo por otros medios), acelerar el mejoramiento de las plantas y obtener abundante materia vegetal para investigación ⁽²⁾.

II.3.1 Ventajas y mecanismos de la Micropropagación in vitro

Entre las ventajas que ofrece la técnica de micropropagación vegetal *in vitro* se pueden señalar ⁽⁹⁾:

- Incremento acelerado del número de plantas
- Reducción del tiempo de multiplicación
- Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida como se puede apreciar en la Figura N° 3, a bajos costos y en tiempos económicamente rentables.



Figura N° 3. Vista del Banco de Germoplasma de Yuca del INIA- CENIAP (Maracay)

- Facilidad para transportar el material *in vitro* de un país a otro, con menos restricciones aduaneras.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual sólo existan pocos individuos.

Para el debido conocimiento de la técnica de propagación vegetal *in vitro* es útil conocer los mecanismos de propagación que pueden llevarse a cabo; entre los que se pueden citar ⁽⁹⁾:

- *Organogénesis directa*: Consiste en la generación de plantas sin raíces directamente del explante, como puede obtenerse en la Figura N° 4 donde se muestra la tallos, raíces o flores. Estos órganos son inducidos a partir de una célula o de un grupo de células que, según las condiciones de cultivo, tienen la propiedad de mantenerse en activa división.
- *Embriogénesis directa*: Proceso mediante el cual se desarrolla un embrión a partir de una célula huevo fertilizada o asexualmente desde un grupo de células somáticas; posteriormente estos embriones germinan y regeneran plantas.

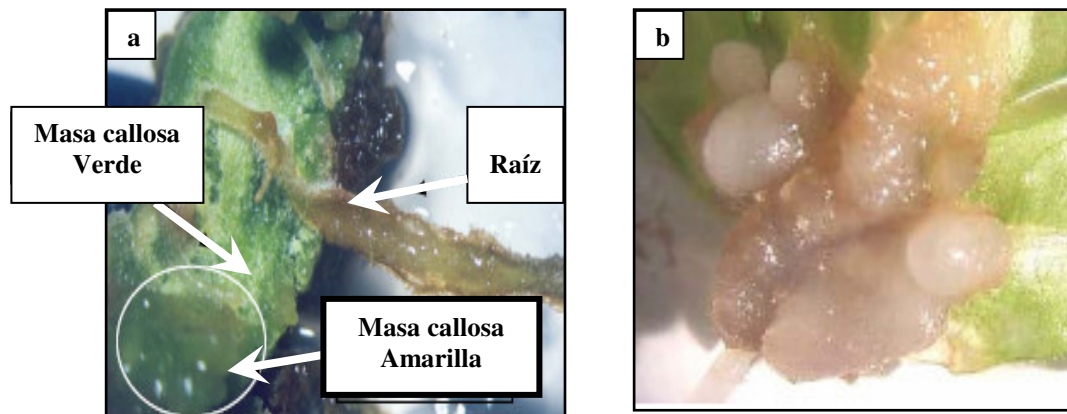


Figura N° 4. (a) Formación de masas callosas blancas, amarillas y raíces (Organogénesis) a partir de hojas de cedro), (b) Embriones somáticos a partir hojas de cedro (Embriogénes)

- *Organogénesis indirecta / Embriogénesis indirecta*: primero la planta genera un tejido amorfo, llamado callo, de donde posteriormente se formaran brotes o raíces como se muestra en la figura N° 5.

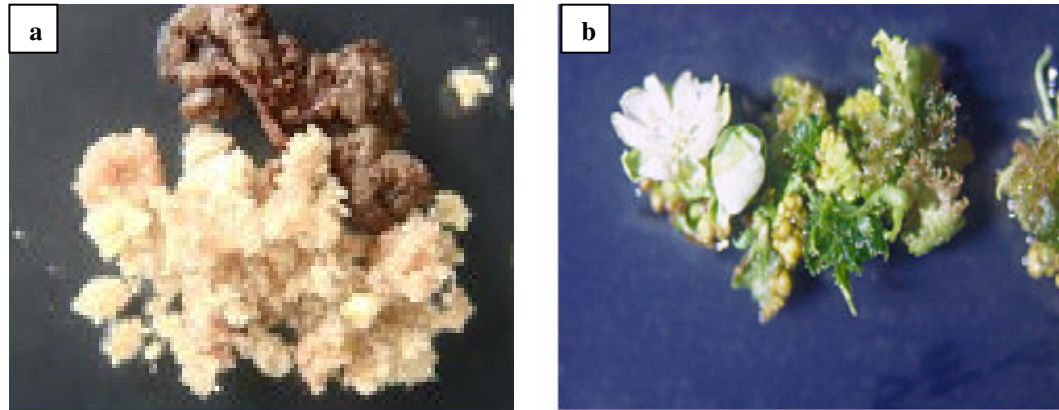


Figura N° 5 (a) Callo embriogénico. Figura N° 5 (b) Brote vegetal a partir de callo embriogénico.

II.3.2 Desarrollo del cultivo *in vitro*

El primer paso es la extracción del explante. Para ello se corta una porción de tejido y se desinfecta. Una vez extraído se coloca en un medio de cultivo adecuado en el cual es mantenido, para su desarrollo, bajo condiciones apropiadas de luz, temperatura y humedad.

El cultivo *in vitro* recorre tres fases, tal como se explica a continuación ⁽⁹⁾:

- *Fase I (Iniciación)*: El objetivo de esta primera etapa es iniciar el desarrollo del explante cultivado en forma aséptica. En general ocurre primero un aumento del tamaño y luego el tejido va adquiriendo lentamente pigmentación verde. Posteriormente irán desarrollándose brotes o plantas completas a partir de las cuales pueden obtenerse yemas axilares.

- *Fase II* (Multiplicación): En esta fase el objetivo es la multiplicación activa del explante para la producción de numerosas plantas a partir de una, constituyendo así un clon proveniente de una planta madre.
- *Fase III* (Acondicionamiento para el transplante a tierra): Frecuentemente las plantas desarrolladas *in vitro* no poseen raíces o, si las tienen, muchas veces no son funcionales. En general tienen malas conexiones vasculares entre la raíz y el tallo. A nivel foliar puede estar alterada la producción de clorofila. Los estomas no funcionan o lo hacen muy lentamente y la capa de cera epicuticular es muy reducida.

La formación de raíces es relativamente fácil de lograr en plantas herbáceas; existe una etapa de inducción de raíces, de iniciación del crecimiento y de elongación de las mismas. En esta fase del crecimiento se suele incrementar la intensidad de luz para favorecer la rusticación de las plantas.

- *Fase IV* (Transplante): En el momento del transplante es importante no dañar las raíces. Es necesario lavarlas cuidadosamente para retirar los restos del medio de cultivo, debido a que los mismos ofrecen un buen sustrato para la proliferación de hongos y bacterias que pueden afectar el desarrollo de la planta en el suelo. El mayor problema en esta etapa es la deshidratación debida a algunas características anatómicas que presentan las plantas obtenidas *in vitro*.

II.3.3 Factores que afectan el sistema de cultivo

Entre los aspectos a considerar para el establecimiento de un sistema de cultivo están: el explante, las normas de asepsia, medios de cultivo y las condiciones ambientales de incubación ⁽⁵⁾.

- *Explante*: el explante es una parte de un tejido u órgano que se aísla del resto de la planta con fines de cultivo. Dependiendo el tipo de respuesta que se

desea generar, se recomienda utilizar explantes jóvenes ya que mientras más joven se encuentre el explante, mejor será su respuesta *in vitro*; el tamaño es otro aspecto que se debe tomar en cuenta para el establecimiento de los cultivos, cuanto más grande sea, mayores serán las posibilidades de obtener una respuesta callosa aunado a una mayor probabilidad de contaminación con microorganismos debido al tamaño del área superficial expuesta. Se debe tener en cuenta la incidencia de otros factores que a menudo pueden alterar las respuestas de los explantes cultivados como la época del año en que se realizan los cultivos, especialmente cuando los explantes se obtienen en plantas de invernadero o campo, además se deben considerar las condiciones de cultivo de las plantas donantes de los explantes.

- *Asepsia*: La relación explante-cultivo y las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos (bacterias y hongos), los cuales los pueden destruir, competir con el explante por el medio de cultivo o modificarlo. Evitar las contaminaciones con microorganismos es un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito, no solamente en el establecimiento de los cultivos sino en su ulterior incubación y manipulación.
- *Medio de cultivo*: Una vez definido el objetivo perseguido con el cultivo *in vitro* de un determinado explante, es necesario elegir un medio apropiado de cultivo para lo que no solo deben considerarse sus componentes, sino también su preparación.

En la actualidad se presentan innumerables formulaciones, cada una de las cuales contiene entre 15 y 35 compuestos químicos que suministran los nutrientes necesarios para el completo desarrollo de las plantas; entre los que se pueden mencionar:

- a) Carbono
- b) Nutrimientos minerales
- c) Vitaminas
- d) Agente gelificante (en caso de ser medio semisólido)
- e) Sustancias reguladoras del crecimiento

Existen cuatro medios nutritivos básicos como se puede apreciar en tabla N° 1 perteneciente a la sección de anexos, donde se puede apreciar que para el cultivo de tejidos *in vitro* la diferencia entre los distintos medios está marcada por las concentraciones de los nutrientes que los componen.

- *Fuentes de Carbono.* Muy pocos cultivos *in vitro* son autótrofos, y por lo tanto es necesario agregar al medio una fuente de carbono. La sacarosa (2% a 5% v/v) es el azúcar que más se utiliza, y se puede reemplazar por glucosa y en menor medida por fructosa.
- *Nutrimientos minerales.* El primer objetivo en la preparación de un medio de cultivo es suministrar los nutrimentos minerales en concentraciones adecuadas para el crecimiento de plantas enteras. Se deben incluir los macronutrientes (C, H₂, O₂, P, K, N, S, Ca y Mg) y los micronutrientes (B, Zn, Mn, Cu, Mo, Fe, Cl, Ni). Las plantas son organismos autótrofos, con un sistema radical altamente especializado para la absorción de nutrientes; las suspensiones celulares, en cambio, son generalmente sistemas heterótrofos, donde el crecimiento y el metabolismo dependen de la disponibilidad de medio nutritivo y reguladores en el medio de cultivo. Puesto que los nutrientes en el cultivo pueden modificar la fisiología de las células, es importante conocer los mecanismos que regulan su absorción. Por otra parte, es importante saber que el intercambio de nutrientes entre los compartimientos de la célula son alterados durante el ciclo de cultivo

- *Vitaminas.* Si bien los medios de cultivo contienen varias vitaminas, en forma general se incorpora tiamina.
- *Agente gelificante.* Para el caso de los medios semi sólidos comúnmente se adiciona agar (0.6% a 1.0%).
- *Reguladores de crecimiento.* En algunos casos se obtienen respuestas *in vitro* deseadas sin la adición de reguladores de crecimiento, sin embargo cuando es necesario utilizarlos, los más comunes son del tipo de las auxinas o las citocininas.
- *Otros componentes.* Ocasionalmente se adicionan otros componentes al medio de cultivo como fuentes de nitrógeno reducido, carbohidratos, sustancias antioxidantes especialmente para el cultivo de explantes con alto contenido de polifenoles (causantes del oscurecimiento y eventualmente la muerte de los explantes). En ocasiones se incorpora carbón activado (0.1% a 5% p/p) para absorber metabolitos tóxicos si fuera el caso.
- *Condiciones Ambientales para la Incubación:* Es conveniente que los cultivos sean incubados en ambientes controlados, por lo menos en lo que se refiere a luz y temperatura; debido que las respuestas morfogenéticas pueden ser alteradas por la temperatura de incubación, así como por la calidad, intensidad y duración de la luz.

Para propósitos generales se sugiere utilizar, en el establecimiento de los cultivos, una fuente luminosa compuesta de lámparas fluorescentes y lámparas incandescentes que brinden entre 1000 a 4000 lux de iluminación. Comúnmente se utiliza un ciclo de fotoperíodo de 16 h y se recomiendan temperaturas entre 25 a 28 °C.

Cada brote se mantiene en frascos individuales como se puede observar en las Figura N° 6, los cuales deben transferirse manualmente cada 20 o 30 días a medios nutritivos frescos con el objeto de evitar el agotamiento en concentración de nutrientes y el crecimiento excesivo de los brotes en los frascos individuales ⁽¹⁰⁾.



Figura N° 6. Micropropagación *in vitro* de orquídeas

Todo ello significa mantener una cantidad de frascos proporcional al número de plantas producidas y un número importante de personal para la preparación periódica de medios de cultivo y manejo de los brotes en sus diferentes etapas lo que se traduce en un alto costo⁽¹⁰⁾.

II.4 Biorreactores

El uso de los biorreactores está muy difundido en la actualidad, debido a los beneficios que esta tecnología aporta en diversas áreas de la ciencia. Este estudio se enfoca principalmente al uso de biorreactores en el cultivo de especies vegetales, tipos de biorreactores y parámetros de diseño.

II.4.1 Definición y funcionamiento de los Biorreactores

Un biorreactor es un recipiente generalmente cilíndrico, de acero inoxidable o polímero, que mantiene un ambiente biológicamente activo. En algunos casos, como

el tratamiento de aguas residuales o la fermentación; un biorreactor es un recipiente en el que se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos; dicho proceso puede ser aeróbico o anaeróbico ⁽¹¹⁾.

Es sin duda, uno de los equipos fundamentales de la microbiología industrial y su diseño debe ser tal que asegure un ambiente uniforme y adecuado para los microorganismos.

Los requerimientos que debe poseer un biorreactor pueden resumirse a continuación ⁽⁷⁾:

- a. Mantener las células uniformemente distribuidas en todo el volumen de cultivo a fin de prevenir la sedimentación o la flotación.
- b. Mantener constante y uniforme la temperatura.
- c. Minimizar los gradientes de concentración de nutrientes mediante la utilización de un sistema de agitación.
- d. Suministrar oxígeno a una velocidad adecuada, que satisfaga el consumo y asegure el incremento de la biomasa.
- e. El diseño debe ser tal que permita mantener el cultivo puro; una vez que todo el sistema ha sido esterilizado y posteriormente sembrado con el organismo deseado.

II.4.2 Tipos de Biorreactores

Existen tres tipos de biorreactores de uso muy difundido: el tanque agitado, de elevación de aire (air lift) y biorreactores de inmersión temporal. En el primero de ellos como se muestra en la Figura N° 7, la agitación se realiza mecánicamente mediante un eje provisto de turbinas accionado por un motor.

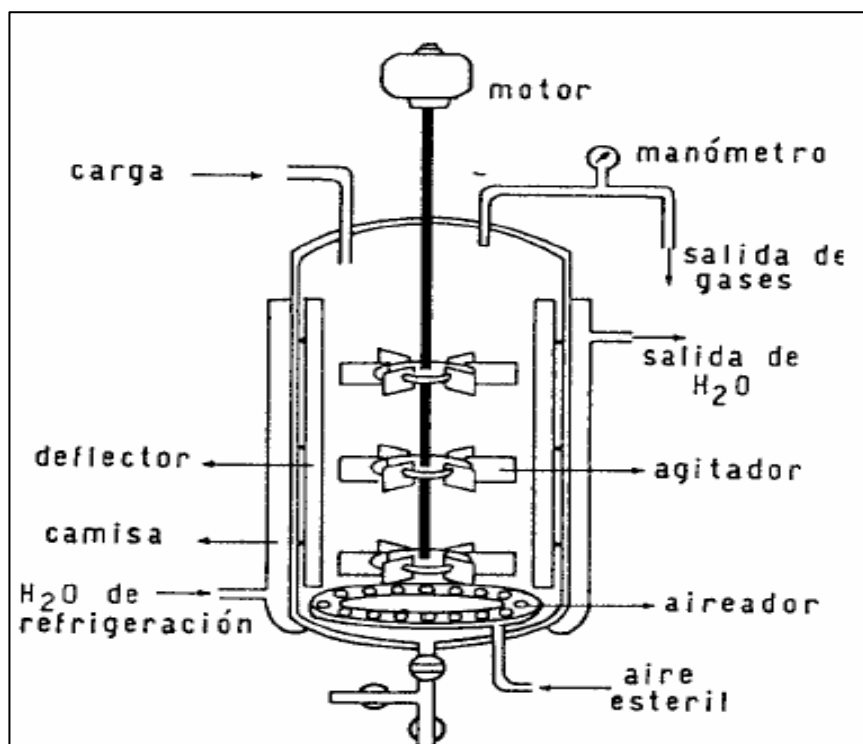


Figura N° 7. Tanque agitado (el mezclado se realiza mecánicamente)

El aire se inyecta por la parte inferior del tanque y es distribuido por una corona que posee pequeños orificios espaciados regularmente. El aire que sale de cada orificio choca con las paletas de la turbina inferior generándose de este modo miles de pequeñas burbujas de aire, desde las cuales difunde el oxígeno hacia el seno del líquido. El sistema de agitación se completa con deflectores que tienen por finalidad cortar o romper el movimiento circular que imprimen las turbinas al líquido, generando de este modo mayor turbulencia, evitando vórtices y promoviendo un

mezclado homogéneo. El tanque está rodeado por una camisa de enfriamiento por la que circula agua, lo que permite controlar la temperatura ⁽⁷⁾.

Para tanques mayores que a 2000 litros este sistema ya no es eficiente y es reemplazado por un serpentín que circula adyacente a la pared interior del tanque. Debe tenerse en cuenta que a medida que es mayor el volumen de cultivo también lo es la cantidad de calor generado por lo que se hace necesario un sistema de refrigeración de mayor capacidad. Los tanques son construidos en acero inoxidable pulido, lo que garantiza la inocuidad del sistema, facilita su limpieza y posterior esterilización del equipo por medio de altas temperaturas ⁽⁷⁾.

En los biorreactores de tipo "air lift" como la figura N° 8 mostrada a continuación; el aire inyectado al cultivo es el que promueve la agitación y oxigenación del medio, garantizando un mezclado homogéneo dentro del sistema.

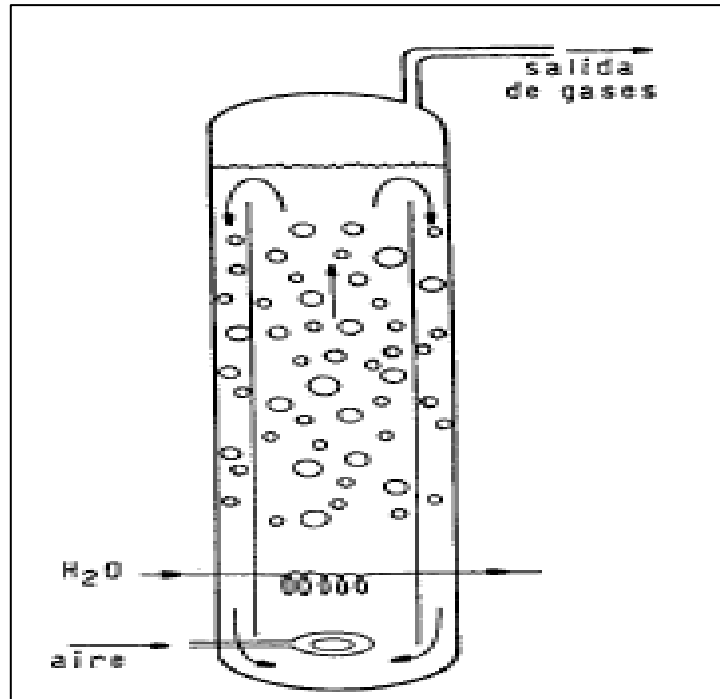


Figura N° 8. Biorreactor tipo "Air Lift"

Basicamente está constituido por dos cilindros concéntricos. El cilindro interior posee una base cilíndrica perforada, mediante la cual se inyecta aire; de este modo se genera la circulación de líquido de forma ascendente en el compartimiento interno y descendente en el externo (cilindro exterior), favoreciendo el mezclado y evitando vórtices dentro del sistema ⁽⁷⁾.

Los Biorreactores de Inmersión Temporal son aquellos donde las células o tejidos se encuentran en contacto con el medio de cultivo líquido a través de frecuencias y tiempos de inmersión diarias definidos, durante el proceso de crecimiento y desarrollo.

Se han clasificado en cuatro categorías dependiendo el tipo de operación en ⁽⁹⁾:

- *Sistema Inclinado o de Eje Móvil*: Los investigadores Harris y Masón en el año 1983 desarrollaron dos sistemas en los cuales no se considera la renovación del medio nutritivo. El primero consta de matraces Erlemeyers colocados en un ángulo de 30° en direcciones opuestas, con una capacidad de 400 frascos de 50 ml cada uno o 320 frascos de 125 ml cada uno. Este sistema se diseñó para 7 frascos con una capacidad de 900 ml cada uno. Un sistema mecánico agita el material vegetal colocado en su interior cada 30 segundos con una inclinación entre 30 a 40 °.
- *Inmersión completa del material vegetal con renovación del medio nutritivo*: Tisserat y Vandercook en 1985 implementaron un dispositivo elevado y con capacidad de 10 L, donde el medio de cultivo es drenado periódicamente para ser sustituido por un medio fresco en un ambiente estéril

El sistema automatizado de cultivo vegetal mostrado en la Figura N° 9, consiste en una tubería de silicona, 2 bombas para llevar el fluido, 2 envases de vidrio para depositar el medio de cultivo, una válvula de tres vías en acero

inoxidable, un tanque para el cultivo vegetal y un sistema de control automatizado para la manipulación de los flujos y el tiempo de bombeo.

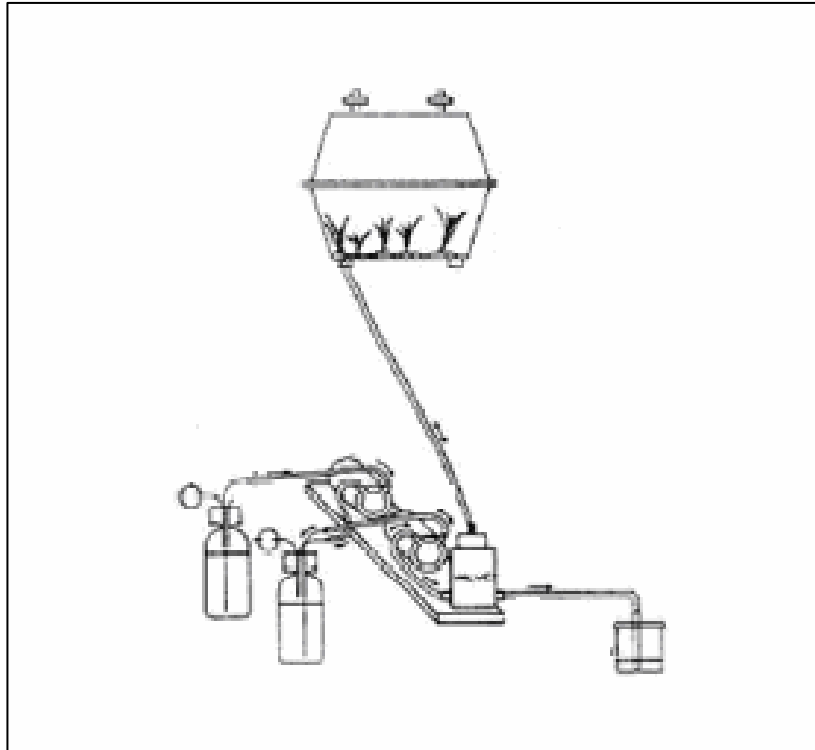


Figura N° 9. Sistema automatizado de cultivo vegetal.

- *Inmersión parcial con mecanismo para la renovación del medio nutritivo:* El tejido vegetal se coloca sobre un soporte sólido o semisólido (agar, membrana de propileno o celulosa). Un sistema de bombeo transfiere un medio líquido que contiene los nutrientes necesarios para el desarrollo de la planta hasta los tejidos, por lapsos de tiempo y frecuencia previamente establecidos; luego este líquido es drenado por un sistema de succión hasta un envase contenedor donde se almacena hasta la próxima transferencia.

En el año 1995 los científicos franceses Teisson y Alvard desarrollaron un sistema de propagación masiva de plantas, al cual llamaron RITA (Reactor de Inmersión Temporal), que permite reducir considerablemente el laborioso trabajo que implica el sistema de propagación *in vitro*. El sistema consiste en

un recipiente plástico dividido en dos compartimientos. En el superior se coloca el tejido vegetal o explante sobre un soporte permeable, y en la parte inferior el medio de cultivo líquido (Murashige & Skoog 1962). Este sistema cuenta con dos filtros hidrófobos de $0.2\mu\text{m}$ reutilizables: uno central (entrada de aire) y uno lateral (salida de aire) ⁽¹²⁾.

El filtro central se conecta al sistema de aireación (bomba) a una presión de salida de 0.2 bar para que impulse el medio del compartimiento inferior al superior durante un periodo corto (Tiempo de Inmersión). Este baño temporal que reciben los explantes se regula por un temporizador que permite la apertura de una electro-válvula que controla el sistema de Inmersión. Obteniendo de esta manera la propagación masiva de las plantas ⁽¹²⁾.

En la Figura N° 10 se muestra de manera esquemática el funcionamiento del RITA, donde los explantes son sumergidos en un medio nutritivo líquido por un periodo de tiempo (determinado por el investigador), mediante la utilización de un sistema de bombeo que luego es apagado para que el líquido sea retirado de los explantes por gravedad.

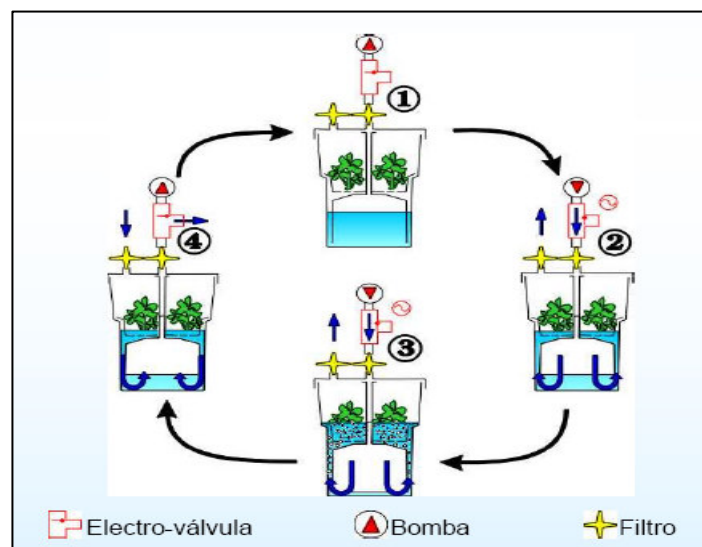


Figura N° 10. Sistema RITA® de Inmersión Temporal para la propagación de plantas

- *Inmersión completa con mecanismo neumático para la transferencia del medio nutritivo*: El sistema relativamente simple y fácil de utilizar. Permite el contacto directo de los explantes con el medio líquido, además de la renovación de la atmósfera gracias a un sistema de ventilación forzada, es decir, una bomba impulsa el líquido de un tanque contenedor hacia el tanque de cultivo y luego en sentido contrario como se muestra en la Figura N° 11, generando el movimiento de los gases presentes en la atmósfera de las plantas, para su posterior renovación.

Como estos sistemas no cuentan con un tanque de almacenamiento de medio fresco, es necesario renovarlo cada 4 a 6 semanas con la finalidad de evitar el agotamiento de los nutrientes.

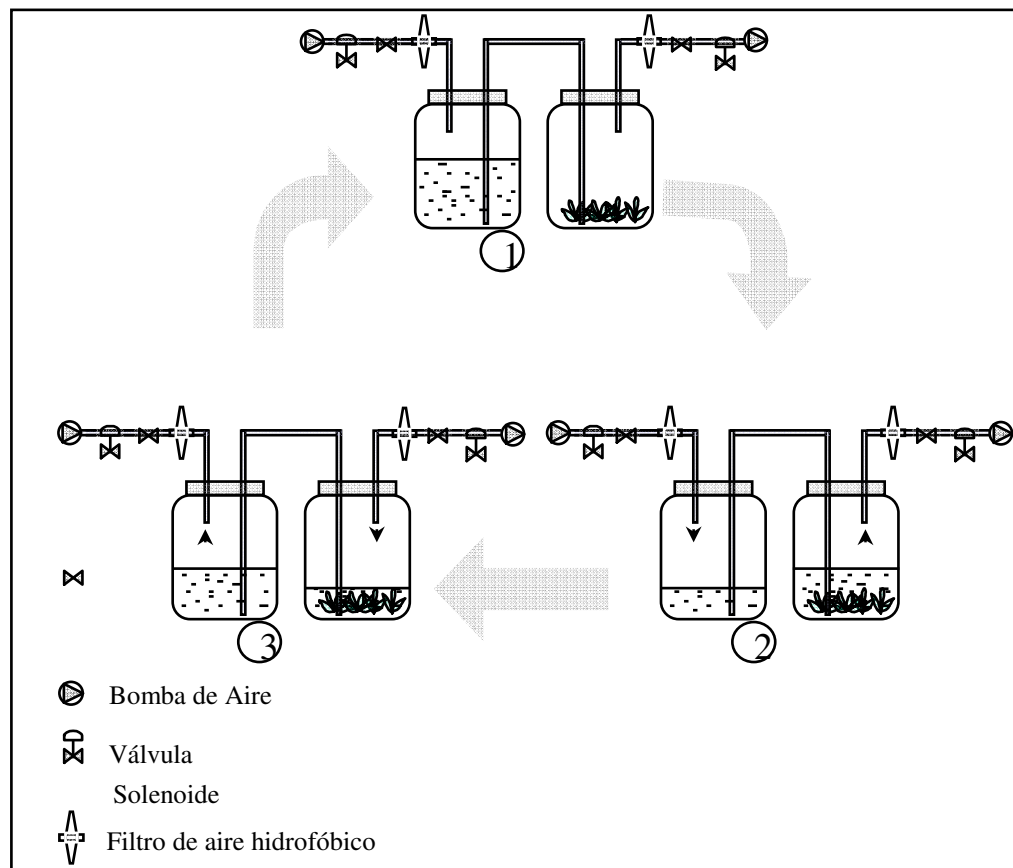


Figura N° 11. Sistema BIT para la propagación masiva de plantas. Desarrollado por la Universidad de Ciego de Ávila (Cuba)

La duración y frecuencia de inmersión son los parámetros más importantes que determinan la efectividad del sistema. La optimización del volumen de medio nutritivo y la capacidad del envase de cultivo elevan considerablemente la eficacia del sistema, especialmente en la etapa inicial de crecimiento de la planta ⁽⁹⁾.

La inmersión temporal también mejora la calidad de las plantas obtenidas. El resultado se traduce en mayor vigor para la etapa de iniciación y disminución de la hiperhidricidad, siendo esta controlada ajustando los tiempos de inmersión; logrando de esta manera que el material vegetal resultante posea una tasa de propagación mucho mayor (resistente a la etapa de aclimatización) que por el sistema de micropropagación en cultivos semisólidos ⁽⁹⁾.

Los parámetros relevantes que contribuyen a la reducción en los costos de producción para el sistema de inmersión temporal son:

- Reducción de la mano de obra.
- Disminución del espacio requerido para el área de trabajo.
- Menor cantidad de envases utilizados.
- Alta calidad en el material vegetal producido.

II.4.3 Aplicaciones de los biorreactores

En el área de servicios se utilizan biorreactores con microorganismos para la purificación de efluentes, aspecto fundamental para el mantenimiento de la calidad del agua y por ende la salud de las personas.

Por otra parte se debe destacar la importancia de los Biorreactores en la investigación, desarrollo y manufactura de productos destinados al mantenimiento de

la salud y tratamiento de enfermedades, fundamentalmente por su aplicación en la producción de compuestos de actividad farmacológica y vacunas.

La figura N° 12 muestra algunas aplicaciones de los biorreactores en la industria, para procesos de fermentación y en el tratamiento de vertidos de efluentes industriales.



Figura N° 12 (a) Biorreactores enzimáticos para la degradación de vertidos industriales contaminados con fenoles. (b) biorreactores utilizados para cultivo de bacterias en el proceso de Fermentación.

En la industria de alimentos es también significativa la aplicación de esta tecnología para la producción de bebidas, enzimas, saborizantes y productos lácteos, entre otros. El área de aplicación minera y ambiental (biorremediación de suelos) está relacionada con la biolixiviación microbiana, es decir, la utilización de microorganismos en la extracción de minerales o concentrados que los contienen.

Un sistema simple y efectivo utilizado por la industria de la lixiviación para la extracción de metales (en este caso Plomo) son los Reactores Anaeróbicos de Flujo Ascendente (RAFA) mediante el uso de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR) como se puede observar en la Figura N° 13, este sistema logra precipitar los metales que posteriormente serán retirados del líquido para su disposición adecuada o reutilización ⁽¹³⁾.

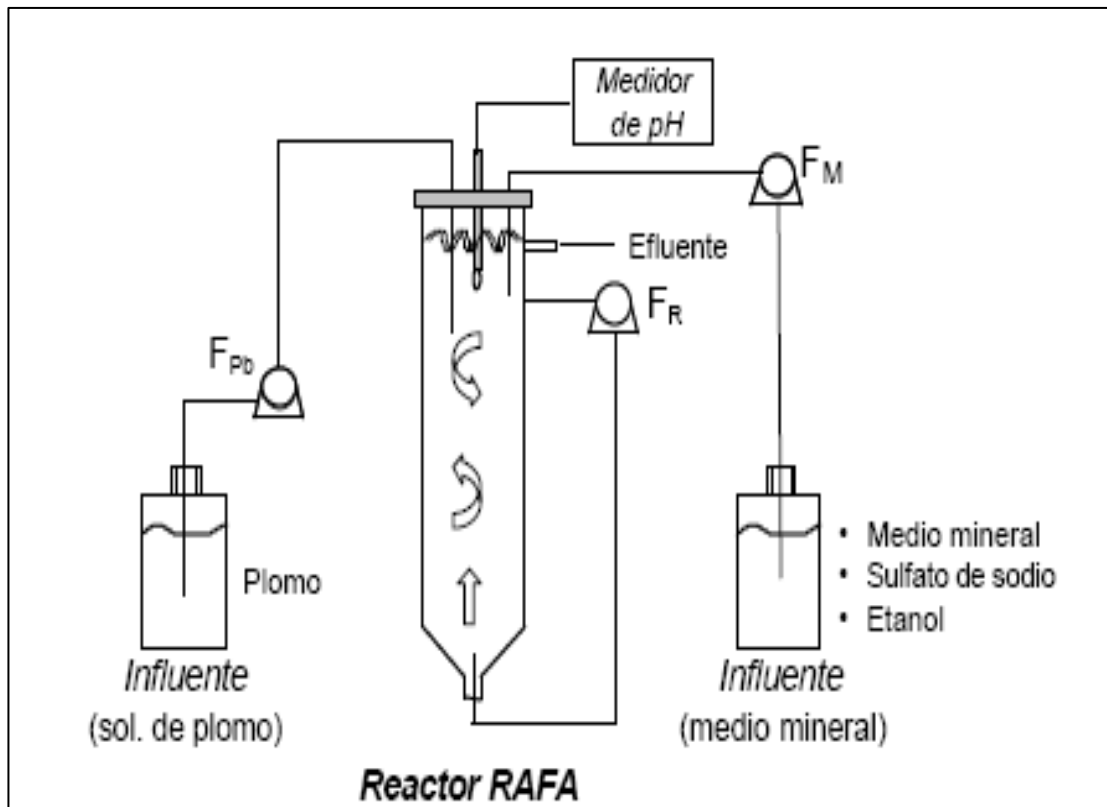


Figura N° 13. Esquema del reactor anaerobio de flujo ascendente (RAFA), utilizado para evaluar la remoción de plomo de efluente líquido

La recirculación del líquido dentro del biorreactor se realiza por medio de una bomba de desplazamiento positivo con velocidad variable para manipular flujos de 10 a 180 L/h. Mediante la adición de NaOH 0.5 N es controlado el pH (pH 7). El medio nutritivo está constituido por una fuente de carbono (etanol) sulfato y plomo en solución ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ de manera independiente del líquido a tratar) ⁽¹³⁾.

Este sistema utiliza las BSR con el objetivo de producir sulfuro, a partir de la reducción de sulfato, el cual actúa como aceptor de electrones, en ausencia del oxígeno. El sulfuro producido biológicamente, reacciona químicamente y de manera instantánea con el plomo soluble alimentado al reactor, para formar sulfuro de plomo (PbS). El PbS es una forma no tóxica y muy insoluble que tiende a sedimentar o a mantenerse en suspensión para retirado posteriormente del equipo ⁽¹³⁾.

La producción agrícola se ve también favorecida en sus aspectos de producción y micropropagación masiva de plantas, mediante el uso de biorreactores como puede apreciarse en la Figura N° 14, donde se obtiene una alta producción de material vegetal en el sistema de Inmersión Completa con Mecanismo Neumático para la transferencia de medio nutritivo (discutido anteriormente).



Figura N° 14 Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT) para la propagación de plantas elaborado por el Centro de Bioplasmas. Cuba

II.4.4 Diseño de Biorreactores

El diseño de biorreactores es una actividad de ingeniería bastante compleja, debido a la cantidad de aspectos a considerar como la fluidinámica, geometría y capacidad del reactor, material para su construcción, cinética de la reacción, sistema de intercambio gaseoso, mecanismo de agitación, volumen de medio nutritivo líquido, tiempo y frecuencia de inmersión entre otros aspectos relevantes. Los microorganismos o células son capaces de realizar su función deseada con gran eficiencia bajo condiciones óptimas. Las condiciones operacionales de un biorreactor tales como flujo de gases desprendidos o absorbidos por el sistema (oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono, etc.), temperatura, pH, oxígeno disuelto y velocidad de agitación o circulación, deben ser cuidadosamente monitoreadas y controladas; para ello se utilizan recipientes, sensores, y un sistema de control interconectados para garantizar el funcionamiento adecuado del sistema de reacción.

Una de las características comparativas que definen la calidad de los biorreactores es su esterilidad, especialmente cuando se trabaja con organismos biológicos sensibles a la contaminación bacteriana. Los factores de riesgo de mayor relevancia que afectan la esterilidad del equipo son descritos a continuación ⁽¹⁴⁾.

- *Llenado o cambio de medio líquido, sellado de sensores y puntos de muestreo:*
Una de las formas más comunes para la contaminación del sistema (biorreactor) es el llenado del mismo. No siempre es fácil asegurar la hermeticidad o sellado efectivo del equipo. En los casos en que los biorreactores dispongan de sensores o tomas de muestreo, la unión entre estos dispositivos y el equipo debe ser de un material que garantice su adherencia e impida el paso de microorganismos; además, que no se deforme mediante las altas temperaturas presentes en la etapa de esterilización del sistema. Materiales como caucho son recomendables mientras la temperatura de esterilización no exceda 150 °C (temperatura de degradación del material).

En los lugares de toma de muestra es recomendable una vez realizada que sea esterilizado con vapor de agua, llama directa o alcohol; con el objetivo de impedir la entrada de bacterias al sistema; y la colocación de una abrazadera que ajuste el tapón al sitio de muestreo como se puede observar en la figura mostrada a continuación.

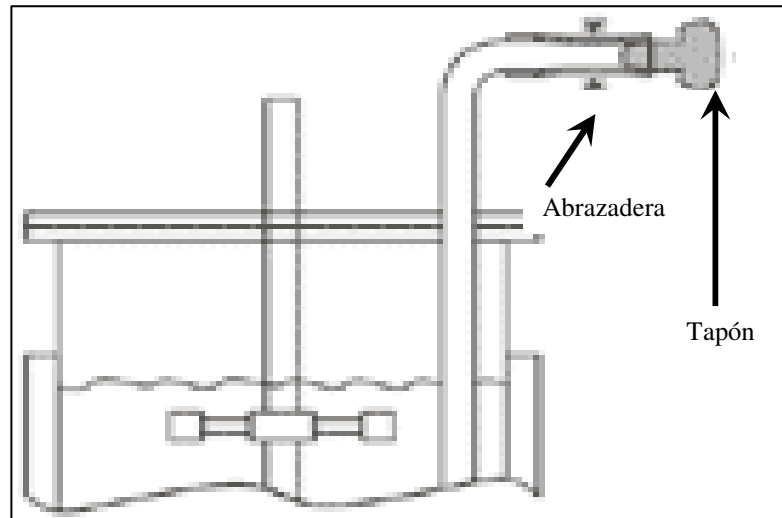


Figura N° 15 Toma de recolección de muestra

- Acumulación de medio nutritivo dentro del recipiente contenedor: La acumulación de medio nutritivo en alguno de los componentes que conforman el reactor es uno de los principales factores que afectan la esterilidad del sistema. Para evitarlo, el biorreactor debe ser construido con acabados que aseguren su inocuidad y proporcionen fácil limpieza; por ello es recomendable la utilización de estructuras cilíndricas o redondeadas, pulidas (evitando ángulos agudos) disminuyendo la posibilidad de formación de volúmenes muertos y acumulación de medio nutritivo en el equipo. Dependiendo de la función del biorreactor, el recipiente contenedor es comúnmente elaborado en acero inoxidable (316 L), vidrio (100 % borosilicato, Pirex o Kimax) gracias a su comprobada esterilidad.
- Filtración de flujos de aire en las entradas y salidas del sistema: El aire que ingresa o sale del biorreactor debe ser completamente estéril para prevenir

cualquier tipo de contaminación; por ello se recomienda la utilización de filtros de aire hidrófilos cuyo diámetro de poro sea 0.45 micrones (tamaño que impide el paso de microorganismos y esporas) ⁽¹⁴⁾.



Figura N° 16. Filtro OptiScale de membrana de Éster de Celulosa

Generalmente los filtros son fabricados de polímeros homogéneos de ésteres de celulosa sobre una malla de poliéster, obteniendo un filtro versátil con una reproducibilidad y eficacia elevadas debido a su medio que no libera fibras y de elevada retención ⁽¹⁵⁾.

En los biorreactores el control de la fase gaseosa depende del flujo de gas suministrado y puede ser fácilmente manipulado para cumplir con los niveles deseados de O₂ y CO₂. En un proceso aeróbico, la transferencia óptima de oxígeno es el objetivo más difícil de lograr. El oxígeno se disuelve muy poco en el agua (y aún menos en caldos fermentados). La transferencia de oxígeno usualmente se facilita por la agitación, que se requiere también para mezclar los nutrientes y mantener la fermentación homogénea. Sin embargo, existen límites para la velocidad de agitación,

debidos tanto al alto consumo de energía como al daño ocasionado a los organismos debido a un esfuerzo de corte excesivo ⁽¹⁴⁾

Las condiciones límite de velocidad para el sistema de agitación se determinan de manera empírica, ya que dependen del sistema en estudio y las características del fluido. Se recomienda que la rotación del agitador sea mayor que el límite crítico mínimo, fijado o determinado por la observación de parámetros como la sedimentación de sólidos disueltos y la aparición de zonas muertas dentro del reactor ⁽¹⁴⁾.

Ahora bien, el límite crítico máximo para la velocidad del agitador se determina mediante la aparición de fenómenos como la espuma y fluctuaciones superficiales del líquido, es decir que la agitación promueva la evaporación del mismo (efecto no deseado).

Para asegurar que la aireación sea estable es recomendable que el flujo de aire que entra al reactor (Q) sea definido como 1vvm, es decir que la cantidad de aire suministrado por unidad de tiempo sea proporcional al volumen manejado por el reactor; por ejemplo, si definimos el consumo de aire en l/min, entonces la cantidad del aire introducido Q será igual a la capacidad del reactor en litros ⁽¹⁴⁾.

Si las velocidades de rotación son bajas se debe evitar un aumento brusco en la cantidad de aire suministrado al equipo, con el objetivo de prevenir el efecto “flooding” o acumulación de burbujas de aire; como se ejemplifica en la figura N° 17 mostrada a continuación, donde se puede observar que en la etapa de carga del equipo (loading) la agitación moderada provoca una dispersión homogénea de las burbujas de aire en todas direcciones dentro del reactor; caso contrario cuando el flujo de aire sufre un aumento brusco provocando la acumulación de burbujas en la zona central del equipo lo que ocasiona una baja dispersión del aire y en consecuencia un mezclado deficiente del fluido ⁽¹⁴⁾.

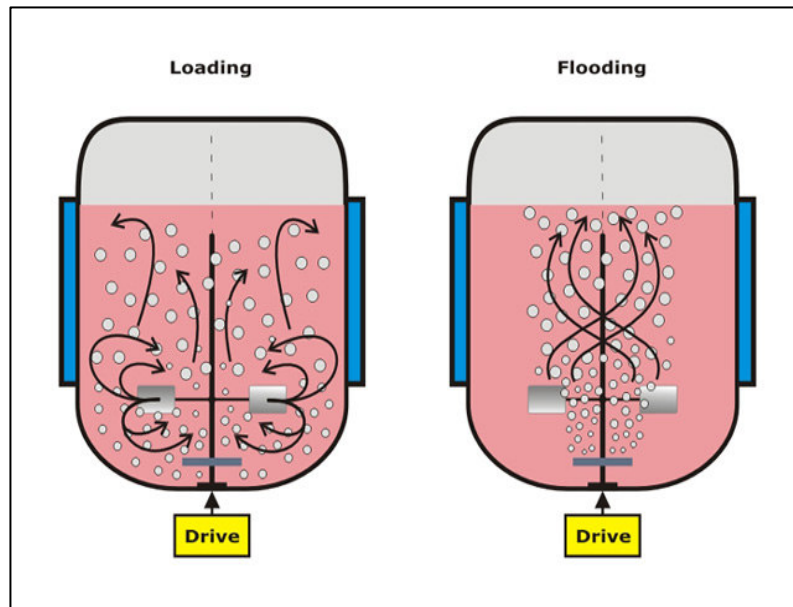


Figura N° 17. Efecto “flooding” en los Biorreactores

Se disponen de un gran número de elecciones sobre el tipo y localización del agitador, las proporciones del tanque, el número y dimensiones de las placas deflectoras, etc. Cada una de estas decisiones afecta a la velocidad de circulación del líquido, los modelos de velocidad y el consumo de potencia. Generalmente se recomienda la utilización de agitadores de turbina, como se muestra en la Figura N° 18. Las proporciones típicas son ⁽¹⁶⁾

$$\begin{array}{lll} \frac{D_a}{D_t} = \frac{1}{3} & \frac{H}{D_t} = \frac{7}{10} & \frac{J}{D_t} = \frac{1}{12} \\ \frac{E}{D_a} = 1 & \frac{W}{D_a} = \frac{1}{5} & \frac{L}{D_a} = \frac{1}{4} \end{array}$$

Donde:

D_a : Diámetro del aspa.
 D_t : Diámetro del Reactor.
 E : Altura del Agitador sobre el fondo del tanque.
 H : Altura del líquido en el tanque.
 W : Ancho del aspa..
 L : Altura del las aspa.
 J : Ancho de las placas deflectoras

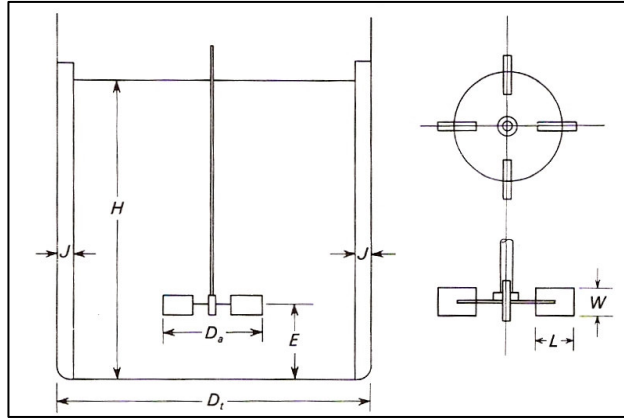


Figura N° 18. Parámetros de diseño de un agitador de turbina

La aplicación de un sistema de control y monitoreo es un aspecto de gran relevancia para el diseño de biorreactores ya que al trabajar con sistemas biológicos se necesita mantener variables como agitación, temperatura y aireación perfectamente constantes.

La figura N° 19 muestra un ejemplo ilustrativo de un biorreactor diseñado para un proceso de fermentación típico. Las variables relevantes a controlar en este equipo son la temperatura, pH, velocidad del agitador, presión parcial de oxígeno, y la concentración de la espuma.

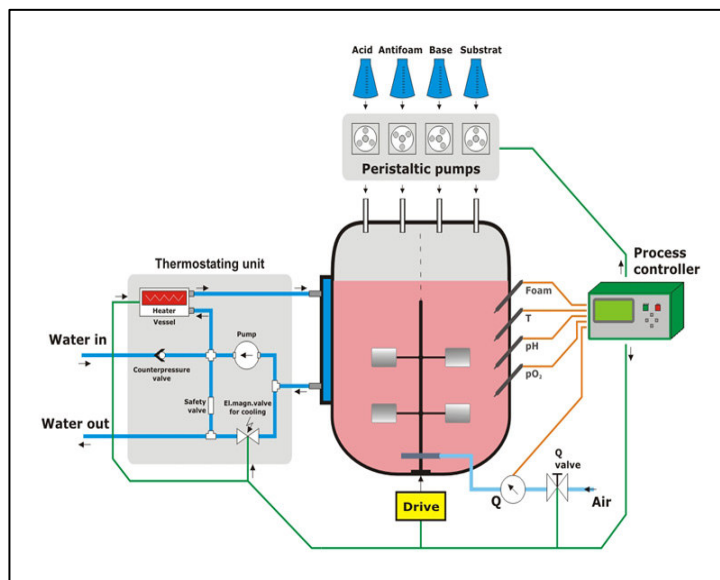


Figura N° 19. Esquema de funcionamiento de un Biorreactor en un proceso de Fermentación

Por ello se requiere la implementación de un sistema de intercambio y control de temperatura para mantener el proceso a temperatura constante (25 a 27 °C es recomendable). Se utilizan sensores generalmente de acero inoxidable (Pt 100) que mantiene la temperatura constante con una apreciación de $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

La fermentación biológica es una fuente importante de calor, por lo que en la mayoría de los casos, los biorreactores requieren de agua de enfriamiento. Pueden ser enfriados con una chaqueta externa conectada a una electro válvula (para regular el flujo de agua) o mediante serpentines internos para recipientes sumamente grandes ⁽¹⁴⁾

Por otro lado, para el control de pH se utilizan electrodos esterilizables con una apreciación en su lectura de ± 0.02 pH (Mettler-Tolede-Tolede son recomendados), ellos comparan el valor medido de pH con un “set point” establecido dependiendo el sistema en estudio. El pH regulado mediante la adición de ácido o álcali (dependiendo el caso).

Una de las variables a controlar exclusivamente en un proceso de fermentación es la presión parcial de oxígeno ($p\text{O}_2$), mediante la combinación del flujo de aire con la velocidad de rotación del agitador considerando los valores limites definidos para la agitación. La $p\text{O}_2$ se ajusta a un valor fijo (determinado por el operador) entre un máximo y mínimo cuya diferencia generalmente se encuentra de 10 a 20% ⁽¹⁴⁾.

La concentración de la espuma es otra variable a controlar ya que es un fenómeno indeseable en los procesos de fermentación a que el nivel aumenta no es posible realizar los análisis correspondientes para determinar la calidad del caldo de fermentación producido. Se utiliza un sensor de espuma, el cual mide su concentración y la compara con un valor límite.

Para caso de los Biorreactores de inmersión temporal es importante controlar los siguientes factores: tiempo y frecuencia de la inmersión, cantidad de medio nutritivo, capacidad del recipiente, tiempo de restitución de medio nutritivo, fotoperíodo, presión interna, temperatura interna del reactor, gases presentes y condiciones de esterilidad; con el objetivo de crear un medio ideal para un rápido y eficiente desarrollo de las plantas.

II.5 Modelaje Matemático

El Modelaje es el proceso mediante el cual se construye una función o algoritmo, capaz de explicar el comportamiento observado del sistema y de predecir respuestas desconocidas. Una vez establecido el modelo general del sistema en estudio, se estará en condiciones de ajustar los parámetros del mismo a los datos experimentales ⁽¹⁷⁾.

Una de las aplicaciones más extensamente utilizadas en Química Analítica es el ajuste de datos experimentales a una función matemática, a denominada Modelo Matemático, el cual relaciona las variables experimentales que se consideran significativas con el sistema en estudio, por medio de coeficientes ajustables o parámetros. Los modelos matemáticos ofrecen el modo más conveniente y compacto de reducir la información experimental, y un medio para la simulación de experiencias hipotéticas a partir de muy pocos datos experimentales.

Una metodología altamente utilizada en el manejo estadístico de datos es la ecuación de regresión múltiple en sistemas no lineales, considerando el caso que los valores de una variable dependen de los valores que tomen las otras variables involucradas en el estudio. Esta técnica, que explora todo tipo de relaciones dependientes tiene como objetivos establecer el valor de los parámetros del modelo, el intervalo de confianza de los mismos, evaluar la bondad del ajuste y principalmente predecir los cambios en una variable dependiente o regresora

(variable directamente afectada por el proceso) en respuesta a los cambios en las distintas variable independientes o predictoras. Elaborar un modelo de regresión múltiple es un trabajo complejo, debido a esto es de suma importancia que todas las variables regresoras sean señaladas y que la metodología experimental que se lleve a cabo sea lo suficientemente confiable para generar una buena respuesta, haciendo hincapié en el comportamiento físico del sistema en estudio para verificar las teorías que han conducido a la expresión matemática final ⁽¹⁷⁾.

La ecuación de regresión es una combinación lineal o no (dependiendo del comportamiento del sistema en estudio) de las variables que mejor predicen la variable dependiente. La selección de variables de mayor relevancia se realiza mediante aproximaciones secuenciales, llamadas estimaciones “stepwise” (pasos inteligentes). Mediante los coeficientes de regresión es posible determinar la importancia relativa de cada variable predictora. Las variables dependientes deben ser cuantitativas y tener en cuenta una cantidad adecuada de datos biológicos experimentales para la construcción del modelo y corroboración de los resultados arrojados ⁽¹⁸⁾.

Los modelos de regresión constituyen la base para la estimación de parámetros en genética cuantitativa. Son ejemplos de su aplicación el cálculo de la estabilidad de los genotipos mediante la descomposición de la interacción genotipo-ambiente y el parecido entre parientes.

Un estudio realizado por Bugarin y colegas (2002) permitió generar un modelo para estimar la acumulación diaria de materia seca y potasio en la biomasa aérea (hojas) total de tomate entre la fecha de plantación y cosecha, cuya aplicación se espera que sea valida indistintamente del hábito de crecimiento del cultivo, manejo o condiciones ambientales.

Un modelo matemático, generalmente con fines científicos tiene como objetivo cuantificar las relaciones e interacciones que se presentan al interior de un sistema, este tipo de modelo usualmente se presenta como un conjunto de ecuaciones en la forma de un programa de computadora. Los modelos computacionales del sistema suelo cultivo-atmósfera son comúnmente utilizados para profundizar en el entendimiento de los procesos que determinan la respuesta de un cultivo y mejorar la habilidad para predecir el desempeño del mismo en diferentes áreas, bajo situaciones de manejo del clima ⁽¹⁹⁾.

Para la construcción de un modelo se necesita tener conocimientos e información detallados tanto de cada una de las partes individuales que forman el sistema como de las interacciones existentes entre ellas, aproximándose tanto más el modelo a la realidad cuanto más detallado sea dicho conocimiento y mas información se disponga. Sin embargo, en muchos casos, para que un modelo sea manejable es necesario renunciar a algunos elementos que componen el sistema y/o a algunas de las interrelaciones entre ellos.

Si los elementos que se han conservado y las interrelaciones que se han establecido son correctas y abarcan los aspectos más relevantes del sistema, el modelo será útil. Así pues, puede decirse que la clave para la construcción de un modelo radica, esencialmente, en identificar de manera adecuada y sin ambigüedades los elementos cruciales, definirlos de forma precisa y operativa y establecer las principales relaciones entre ellos.

Para la creación formal de un modelo se debe establecer una serie de etapas; éstas son ⁽¹⁹⁾:

1. Descripción del sistema. Se trata de estudiar el sistema real con el fin de identificar sus elementos, las relaciones entre ellos y los efectos que la variación de cada uno de ellos puede tener sobre los demás.

2. Definición de cada magnitud y variable. Teniendo en cuenta sus dimensiones y unidades; estimando en lo posible sus intervalos de variabilidad.
3. Planteamiento y desarrollo de las ecuaciones
4. Análisis de sensibilidad. Efecto de la variación de cada parámetro sobre las variables a estudiar. Si se encuentra que una variable es muy sensible a un parámetro determinado, habrá que poner especial cuidado en su manejo.
5. Evaluación del modelo. Estudiar si el modelo es capaz de dar respuesta a cuestiones concretas, es decir, si los resultados obtenidos con él se ajustan razonablemente a las observaciones realizadas.

Una medida de la bondad del modelo puede cuantificarse por medio de la variable estadística chi cuadrado:

$$\sum_{i=1}^N \frac{(y_i - f_i)^2}{y_i} \leq \varepsilon$$

Donde N es el número de puntos experimentales, f_i es la respuesta calculada por el modelo, mientras y_i es el valor verdadero de la variable observada en el punto i.

Un ejemplo sencillo de cómo las actividades de experimentación y simulación pueden enlazarse se muestra en la figura N° 20 donde se observa que el modelo conceptual de un sistema de cultivo, provee de hipótesis que pueden ser probadas de modo experimental en el campo. Si se tiene la capacidad de describir el modelo conceptual en términos cuantitativos, se puede entonces producir un modelo matemático que puede ser introducido en un programa de computadora y obtener así un estimado simulado. El modelo puede ser simple y describir solamente un proceso, o puede ser muy complejo donde obtenga la interacción de varios procesos, tales como la fotosíntesis, fenología, partición del carbón, contribución de nutrientes,

disponibilidad de agua del suelo, y el crecimiento y desarrollo de la planta en función de los déficit de agua y de nitrógeno. Independientemente de la complejidad del modelo, es siempre posible comparar los resultados simulado con datos medidos, y determinar que tan correctamente el modelo se aproxima a la realidad. Cuando existen discrepancias entre los datos medidos y simulado, se debe determinar el porqué, lo cual puede involucrar experimentación futura y refinamiento subsiguiente del modelo conceptual y matemático. Este proceso representa un ciclo clásico de investigación, pensado no solamente en mejorar el entendimiento, sino también en proveer de modelos dinámicos que apoyen en la toma de decisiones.

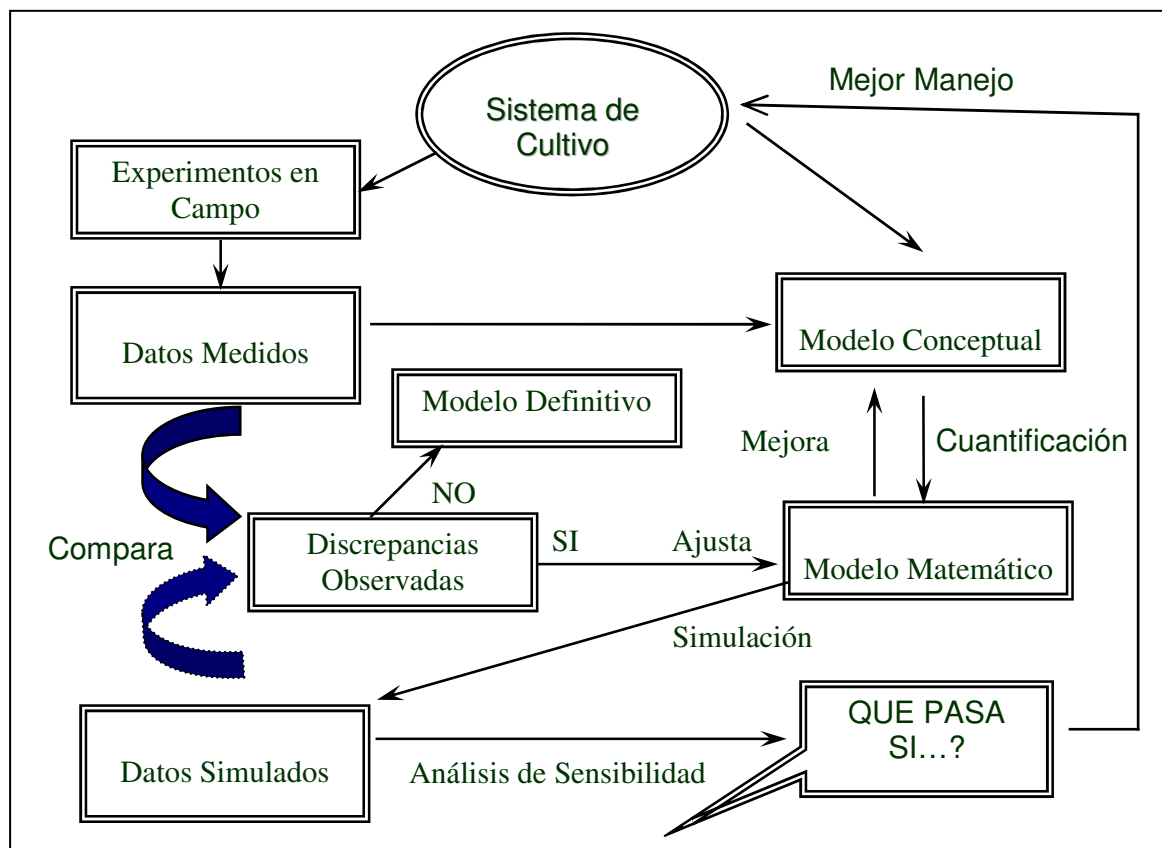


Figura N°20. Esquema del proceso interactivo para el desarrollo y la validación de modelos apoyados en la información de experimentos de campo y su utilidad en el manejo de sistemas agrícolas (Keen y Spain 1992)

Una vez que se tiene un modelo suficientemente probado es una herramienta poderosa de análisis, la cual permite evaluar diferentes estrategias de manejo, contestando a la pregunta ¿Qué pasa si....? la cual permite estudiar nuevas opciones como cambio de fechas de cosecha, variación en los nutrientes o sus cantidades; cualquiera que fuesen las variables de las cuales depende el modelo diseñado; a manera de optimizar el sistema.

Los objetivos de un modelo generado para el estudio de la ciencia son tres ⁽¹⁹⁾:

1. Mejorar la comprensión de un sistema o probar teorías científicas
2. Predecir el resultado de una combinación de situaciones en un sistema
3. Controlar el sistema estudiado y producir resultados anticipados.

Un aspecto práctico importante es si existe o no, la cantidad adecuada de datos para alimentar y evaluar un modelo. Maloszweski y Zuber (1992) mencionan que los modelos con una gran cantidad de parámetros generalmente proveen una mayor resolución de procesos complejos, que aquellos modelos con menos cantidad de parámetros. De todos modos, los modelos más complejos no siempre son los mejores en términos de precisión o exactitud debido a la pobre aplicabilidad en un medio con pocos datos disponibles.

Los modelos de simulación son un medio importante para aumentar la eficiencia de la investigación ya que éstos pueden auxiliar a los investigadores en la asimilación del conocimiento adquirido mediante la experimentación y proporcionan un marco de referencia para aportaciones de carácter multidisciplinario.

CAPITULO III
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

Esta Sección está constituida por la metodología utilizada para la realización del presente Trabajo Especial de Grado.

1. *Revisión Bibliográfica:* Esta primera etapa consistió en investigar las bases conceptuales que sustentaron la investigación, en el área de Biotecnología aplicada a la agricultura, biorreactores para el cultivo de células vegetales y análisis estadístico para el manejo de datos.
2. Práctica de inducción para el cultivo *in vitro* de especies vegetales, familiarización con los equipos, técnica de cultivo, reglamentos, personal e infraestructura de los laboratorios donde se va a llevar a cabo la investigación.
3. Cultivo *in vitro* de Ápices de Pino Gigante en medio semisólido utilizando los protocolos aplicados en el laboratorio de Biotecnología del INIA explicados a continuación:
 - 3.1 En un beaker de 1000 ml se agregaron en estricto orden las soluciones para preparar el medio de cultivo (ver Anexo N° 2). Una vez agregados todos los componentes del cultivo se completa el beaker con agua destilada hasta 1000 ml y se regula el Ph de la solución (5.7-5.8). Posteriormente se calentó la solución (90° C) en una plancha caliente con agitación hasta que el agar se disuelva completamente; en este punto la solución se torna cristalina.

A continuación se pueden apreciar algunas de las etapas para la preparación del medio de cultivo



Figura N°21. (a) Soluciones para la preparación del medio de cultivo. (b) Regulación de Ph. (c) Agitación y calentamiento del medio de cultivo

3.2 Cuando el agar se ha disuelto se detuvo la agitación y calentamiento y se dejó reposar la solución por un lapso de 5 minutos. Posteriormente se agregaron aproximadamente 25 ml por frasco de vidrio, los cuales poseen una capacidad de 125 ml cada uno

3.3 Una vez llenos los frascos se taparon con papel de aluminio (solo la tapa) y se colocaron dentro del autoclave a una temperatura de 121°C por un lapso de 30 min, con la finalidad de esterilizar el frasco y su contenido; convirtiéndolo en un reservorio óptimo para las plantas.

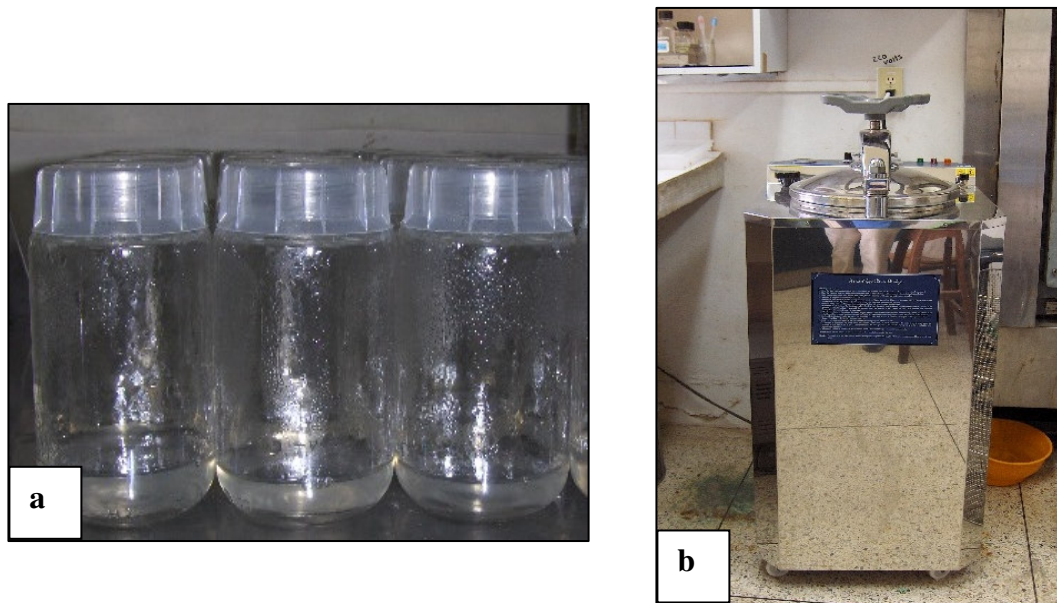


Figura N° 22. (a) Frascos con medio de cultivo para esterilizar. (b) Esterilización del Medio de Cultivo por medio del Autoclave

3.4 Transcurridos 30 minutos se sacan los frascos del autoclave y se dejan enfriar aproximadamente 5 horas antes de llevarlos a la cámara de flujo laminar para el cultivo.

3.5 Se procede a limpiar la cámara de flujo laminar con alcohol etílico al 70 % y encendiendo el sistema para recircular el aire y purificarlo. Por otro lado, el

instrumental utilizado en la etapa de cultivo como se observa en la tabla perteneciente al Anexo N° 3 es previamente esterilizado en el autoclave.

3.6 Para el cultivo *in vitro*, Las partes externas del cormo que se observan en la Figura N° 21(a) se eliminan hasta obtener secciones aproximadamente de 5 cm de largo y diámetro, que encierran el ápice vegetativo mostrado en la Figura 21(b). La desinfección del material vegetal se realiza lavando las secciones obtenidas con jabón detergente comercial durante 5 min. Seguidamente, se hace una segunda desinfección durante 10 min con alcohol absoluto (90%); finalmente se sumergen los ápices en hipoclorito de sodio comercial 2,5 % (V/V) durante 30 min. En condiciones asépticas, bajo campana de flujo de aire laminar y utensilios estériles, se practican tres lavados con agua destilada y se procede a reducir el tamaño del explante hasta obtener un ápice de aproximadamente 10 mm de altura por 5 mm de diámetro, seguidamente se coloca un ápice dentro de cada frasco contenedor del medio semisólido.

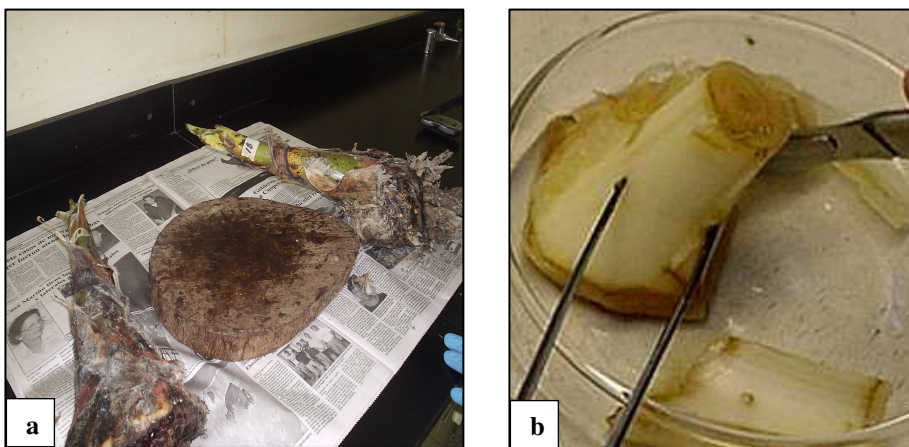


Figura N° 23 (a) Cormo de Pino. (b) Cormo reducido de tamaño por la eliminación de las vainas foliares externas.

Por último, se cierran los frascos de nuevo con el papel de aluminio y se sellan con papel plástico evitando así que entren bacterias y esporas de hongo al medio de cultivo.

3.7 Se trasladan en un carrito metálico todos los frascos ya cultivados a un cuarto climatizado, donde van a permanecer por un período 1 mes bajo un ambiente controlado de 25 °C y luz fluorescente blanca fría, con un fotoperíodo de 16 horas

4. Cada semana se registraron datos de crecimiento y se almacenaron en una tabla, para su análisis posterior.

4.1 Transcurrido 1 mes de experimento se observaron las plantas, se tomaron las últimas mediciones de peso

4.2 Construcción de la Curva de Crecimiento Sigmoidal para el sistema tradicional.

5. Diseño y construcción del prototipo de Biorreactor de inmersión Temporal. (esta etapa realizó en conjunto con el Bachiller Adrián González estudiante de Ingeniería Metalúrgica de la UCV ya que el diseño y construcción del equipo corresponden a su Trabajo Especial de Grado).

Para ello se establecieron las siguientes actividades:

5.1 Estudiar el mecanismo de funcionamiento de los Biorreactores de Inmersión Temporal y determinar las variables de diseño.

5.2 Hacer un estudio de los materiales disponibles (física y económicamente) para la construcción del prototipo.

5.3 Construcción del biorreactor prototipo.

6. Evaluación y puesta en marcha del prototipo. Se llevaron a cabo los siguientes pasos para el cumplimiento de esta etapa:

6.1 Se coloca dentro del biorreactor el medio nutritivo líquido con ápices de pino extraídos mediante el mismo sistema utilizado para el cultivo *in vitro* en medio semisólido y se procedió a observar el crecimiento de las plantas por un período 1 mes verificando que no exista contaminación del líquido nutritivo por bacterias provenientes del medio ambiente.

6.2 Se fijan los tiempos, frecuencia y flujo de aire que entra al biorreactor y se procedió a extraer semanalmente muestras del líquido nutritivo que fueron enviadas al laboratorio de suelos del INIA para el análisis de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S). De igual forma que en el cultivo semisólido se tomaron datos de altura en función del tiempo y se construyó una tabla de datos para el manejo eficiente de los resultados.

6.3 Transcurrido 1 mes de experimento se procede a descargar el sistema y tomar las últimas mediciones y muestras para ser analizados posteriormente.

6.4 Con los datos suministrados de altura en función del tiempo se construyó la curva de crecimiento sigmoide de la planta mediante la técnica de micropropagación *in vitro* en un sistema de Inmersión Temporal.

7. Mediante el análisis de los datos arrojados de concentración de nutrientes en el medio líquido se procedió a la elaboración de un modelo matemático mediante la utilización de un software estadístico.

8. Comparación de resultados experimentales con los teóricos arrojados por el modelo. En esta etapa con ayuda de un análisis de varianza se observó el porcentaje de error obtenido mediante la correlación respecto a los valores obtenidos experimentalmente.
9. Discusión de resultados. Se compararon ambos métodos y se discutieron variables como masa, cantidad de brotes, peso final y tiempo de propagación; con la intención de corroborar la eficiencia del sistema diseñado.
10. Optimización del prototipo. Se discutieron las conclusiones en cuanto a material, diseño y capacidad del equipo y se generaron mejoras o recomendaciones para lograr una mayor eficiencia.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En esta etapa se presentan y discuten todos los resultados obtenidos del Trabajo de Grado siguiendo la metodología descrita en el capítulo anterior para cumplir con los objetivos planteados.

El análisis de las experiencias se dividió en cuatro partes; la primera es el estudio de las curvas de crecimiento sigmoideal que involucra el estudio del sistema *in vitro* tradicional, la segunda; el diseño, puesta en marcha, evaluación del biorreactor prototipo y comparación de ambos sistemas, la tercera curvas de absorción de nutrientes y la cuarta etapa la construcción y validación del modelo matemático.

IV.1. Estudio del Sistema de Propagación in vitro Tradicional en Medio Semisólido.

Siguiendo el protocolo establecido en el Laboratorio de Biotecnología del INIA para el cultivo *in vitro* de ápices de Pinoe se procedió a evaluar el desarrollo de la experiencia.

Luego de un mes de cultivo estos ápices se convirtieron en una estructura



constituida por brotes como se puede apreciar en la figura N° 24 listos para el cambio de medio nutritivo (debido a su agotamiento) o para ser colocado dentro de Biorreactores con la finalidad de continuar su crecimiento.

Figura N° 24. Callo de Pinoe Gigante AAA.

Como se muestra en la figura N° 25, Se tomaron 3 brotes de diferente masa y se transfirieron cada uno a un frasco con medio semisólido fresco. En este punto se tomó la masa inicial de los brotes y se registró su variación cada 3 días por espacio de un mes. Estos valores se registraron en la tabla N° 1, a partir de los cuales se pudo extraer la información suficiente para construir la curva de crecimiento sigmoideal para cada muestra (figura N° 26) observando la tendencia de las curvas de crecimiento para brotes con pesos iniciales distintos, según se muestra en la figura N° 24.

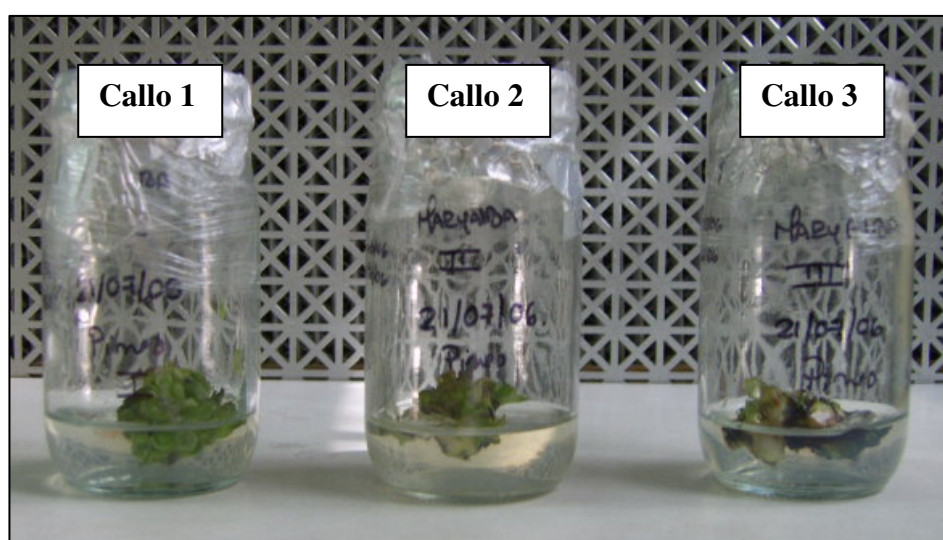


Figura N° 25 Cultivo de Brotes de Pineo Gigante AAA a diferentes masas iniciales en el Sistema de Propagación *in vitro* Tradicional en Medio Semisólido

Tabla N°1. Variación de la biomasa de los 3 callos de Pineo Gigante AAA en estudio.

tiempo (días)	BIOMASA (g)			
	Callo 1	Callo 2	Callo 3	Promedio
0	14	27,33	23,2	21,51
3	12,24	20,08	19,02	17,11
6	9,82	16,77	14,48	13,69
9	8,12	12,44	10,71	10,42
12	7,25	11,79	6,99	8,68
15	8,53	9,14	7,65	8,44
18	9,45	10,57	8,43	9,48
20	10,08	11,34	10,62	10,68
23	11,03	11,77	10,79	11,20
26	11,56	12	11,2	11,59
30	11,6	12,05	11,32	11,66

En la figura N° 26 se puede observar que para las tres muestras de callos de Pineo Gigante AAA en estudio aunque la masa inicial es distinta en cada caso, todas poseen la misma tendencia de decrecimiento en los primeros 12 a 15 días y luego de crecimiento hasta el momento del cambio de medio nutritivo (cuando se agotan los nutrientes) observado en el día 30 del estudio

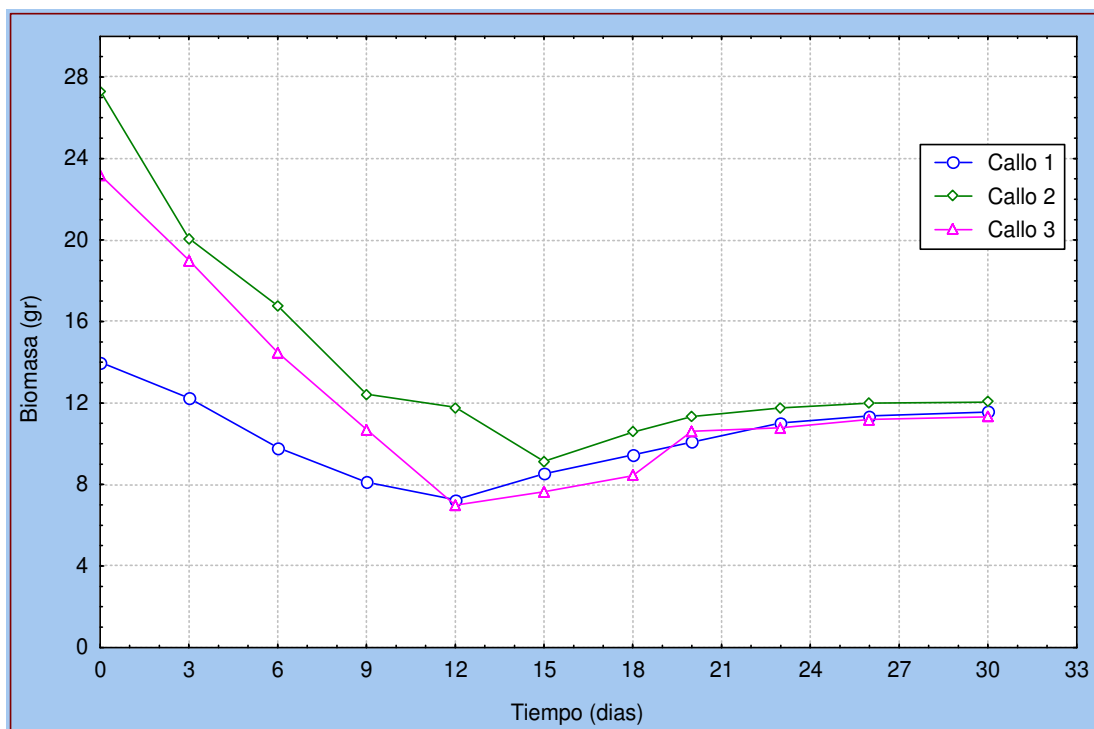


Figura N° 26. Curvas de crecimiento sigmoideal para los tres callos de Pineo Gigante AAA en estudio

De acuerdo con la tabla N° 1, el callo 2 con una biomasa inicial de 27,33 g sufrió una disminución de peso equivalente a un 67% aproximadamente, empezando a recuperar biomasa a partir del día 15, hasta alcanzar en el día 30 apenas un 44 % de su peso inicial.

Ahora bien, para el caso del callo 3 se observó que su biomasa inicial fue de 23,2 g, con una disminución del 70% en masa; empezando a partir del día 12 a recuperarla, hasta el día 30 donde se obtuvo una recuperación de un 49% de su peso inicial.

Por último en el caso del callo 1, con una biomasa inicial de 14 g, esta disminuyó en un 48% empezando a recuperarla a partir del día 12 para posteriormente recuperar al final del estudio (día 30) el 82% de su biomasa inicial.

Para el día 30 en todos los casos se determinó que este fue el momento para el cambio de medio nutritivo debido al agotamiento de mismo, que para el caso de medio semisólido se evidencia físicamente por el desgaste del medio y observaciones en la planta como por ejemplo caída de sus hojas o marchitamiento de las mismas.

Resumiendo la experiencia se encontró el siguiente orden para el caso de disminución de biomasa: callo 1(48 %), callo 2 (67%), callo 3 (70%) y en cuanto a la recuperación de la misma: callo 1(83%), callo 3(49%) y callo 2(44%).

Se puede concluir que en callos de menor tamaño, la adaptación al nuevo medio es más fácil, porque al ser un callo más joven en comparación a los de mayor tamaño, sus células están en activa división lo que genera un crecimiento más rápido y el aprovechamiento de nutrientes es mayor, lo que es altamente beneficioso para la planta.

Ahora bien, con el objetivo de explicar de manera más detallada cada una de las fases o etapas de crecimiento de la planta, se tomo el promedio de la biomasa de los callos por cada tiempo y se construyó una curva de crecimiento sigmoideal promedio, bajo la consideración antes mencionada de que todas las demás curvas presentan la misma tendencia de crecimiento.

En la figura N° 27 se muestra la curva de crecimiento sigmoideal promedio para los 3 brotes y se puede observar que presentó tres etapas durante los 30 días del presente estudio.

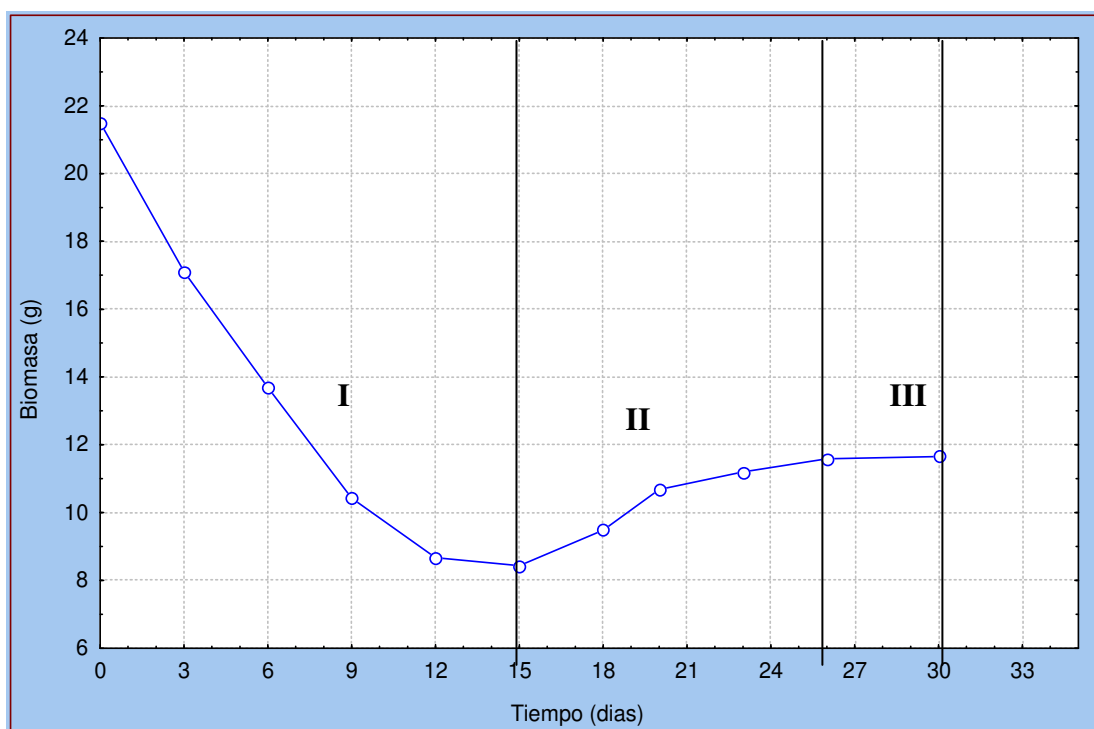


Figura N° 27. Curva de Crecimiento Sigmoidal promedio para el Sistema de propagación *in vitro* en Medio Semisólido (Sistema Tradicional)

La primera etapa (I) tuvo un período de duración de 15 días durante los cuales se notó una disminución considerable de la biomasa debido a un fenómeno de estrés abiótico a causa de traspasar los callos o brotes del medio semisólido inicial donde permanecieron por espacio de 1 mes (antes de este estudio) a un medio semisólido fresco. Una vez que los brotes se adaptan a su nuevo ambiente inicia una segunda etapa (II) donde el crecimiento de los brotes es poco pronunciado con una duración de 5 días. En esta fase (II) la planta ha consumido la mayor parte de los nutrientes disponibles en el medio para luego pasar a la fase III donde la masa de los brotes se mantiene prácticamente constante hasta el punto donde se han consumido la mayor parte de los nutrientes (día 30) presentes en el medio semisólido, por esta razón la planta usa sus reservas internas de energía para continuar con su proceso metabólico, pero no cuenta con la suficiente cantidad de medio nutritivo para continuar creciendo. En este punto es necesario el cambio de medio nutritivo.

IV.2. Diseño, puesta en marcha y evaluación del biorreactor prototipo.

En esta etapa se explican los criterios generales utilizados para el diseño del Biorreactor de Inmersión Temporal, ya que el diseño en detalle de cada componente corresponde al Trabajo Especial de Grado del Br. Adrián González de la Escuela de Ingeniería Metalúrgica de la Universidad Central de Venezuela.

Las variables de diseño consideradas relevantes para este tipo de sistemas son el volumen del biorreactor, altura, diámetro, frecuencia y tiempo de inmersión, flujo de aire, presión y temperatura de operación.

Por otro lado se estudiaron los materiales para su construcción, así como los utilizados en la elaboración de los filtros de aire.

A continuación se presenta el esquema (figura N° 28), descripción general y consideraciones básicas, utilizadas en el diseño y construcción del Biorreactor de Inmersión Temporal prototipo utilizado en esta investigación.

El reactor está dividido en tres partes principales:

Contenedor superior para el crecimiento vegetal: Cuyo objetivo es servir de depósito a las plantas y facilitar el intercambio de oxígeno entre las plantas y el ambiente.

Soporte central: Sirve como soporte o base del material vegetal a propagar, posee una boquilla conectada a un filtro de aire y al sistema de tuberías de inyección de aire. Posee un tubo vertical que atraviesa el compartimiento inferior transportando el medio líquido al compartimiento superior mediante el aire que entra por la boquilla, e impulsa el líquido a través de él.

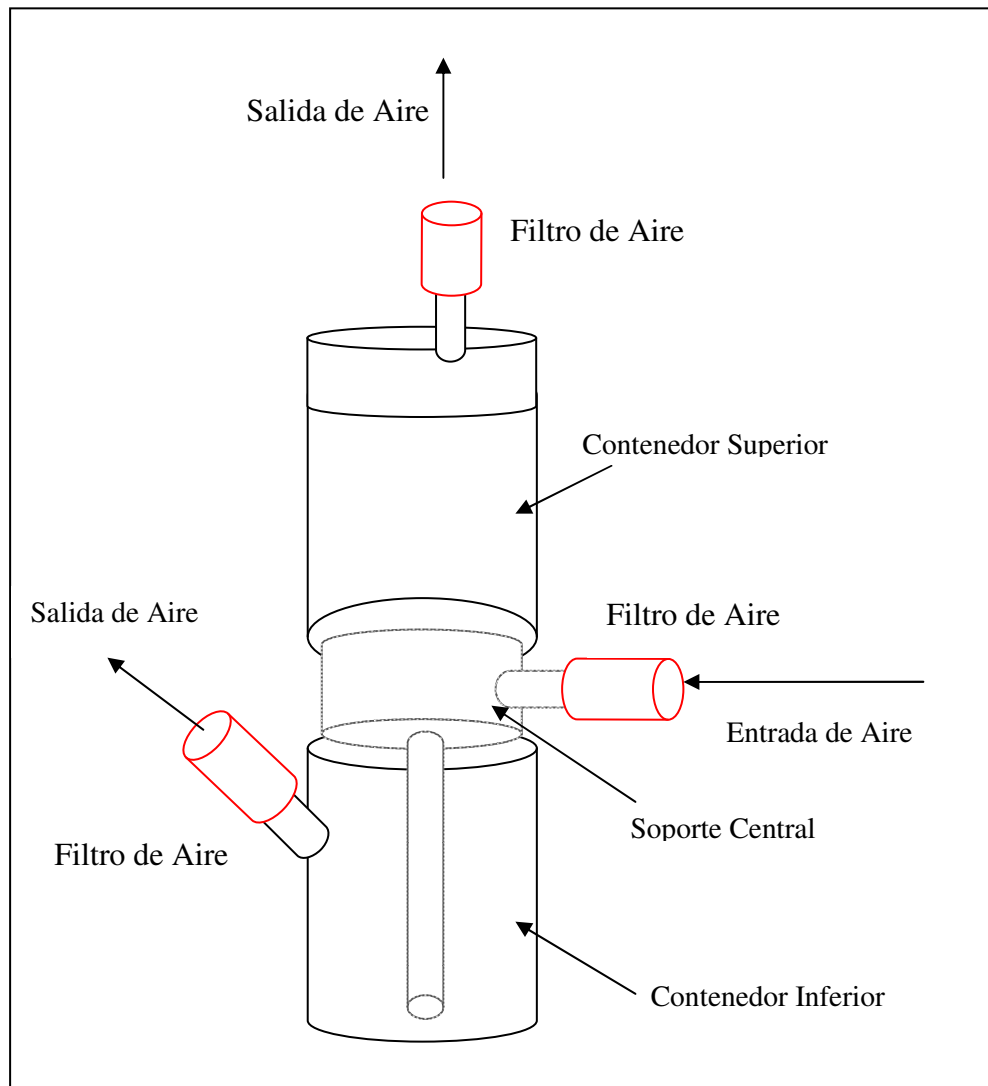


Figura N° 28. Esquema General del Biorreactor de Inmersión Temporal Prototipo

Contenedor inferior para el medio nutritivo: Diseñado para el almacenamiento o depósito del medio de cultivo líquido. Posee una toma de muestra para la extracción de medio nutritivo en el análisis de nutrientes. En esta toma de muestra, está colocado un filtro de aire para el intercambio gaseoso del sistema.

En la figura N° 29 se muestran el diseño final obtenido para el biorreactor prototipo, así como cada una de sus partes:

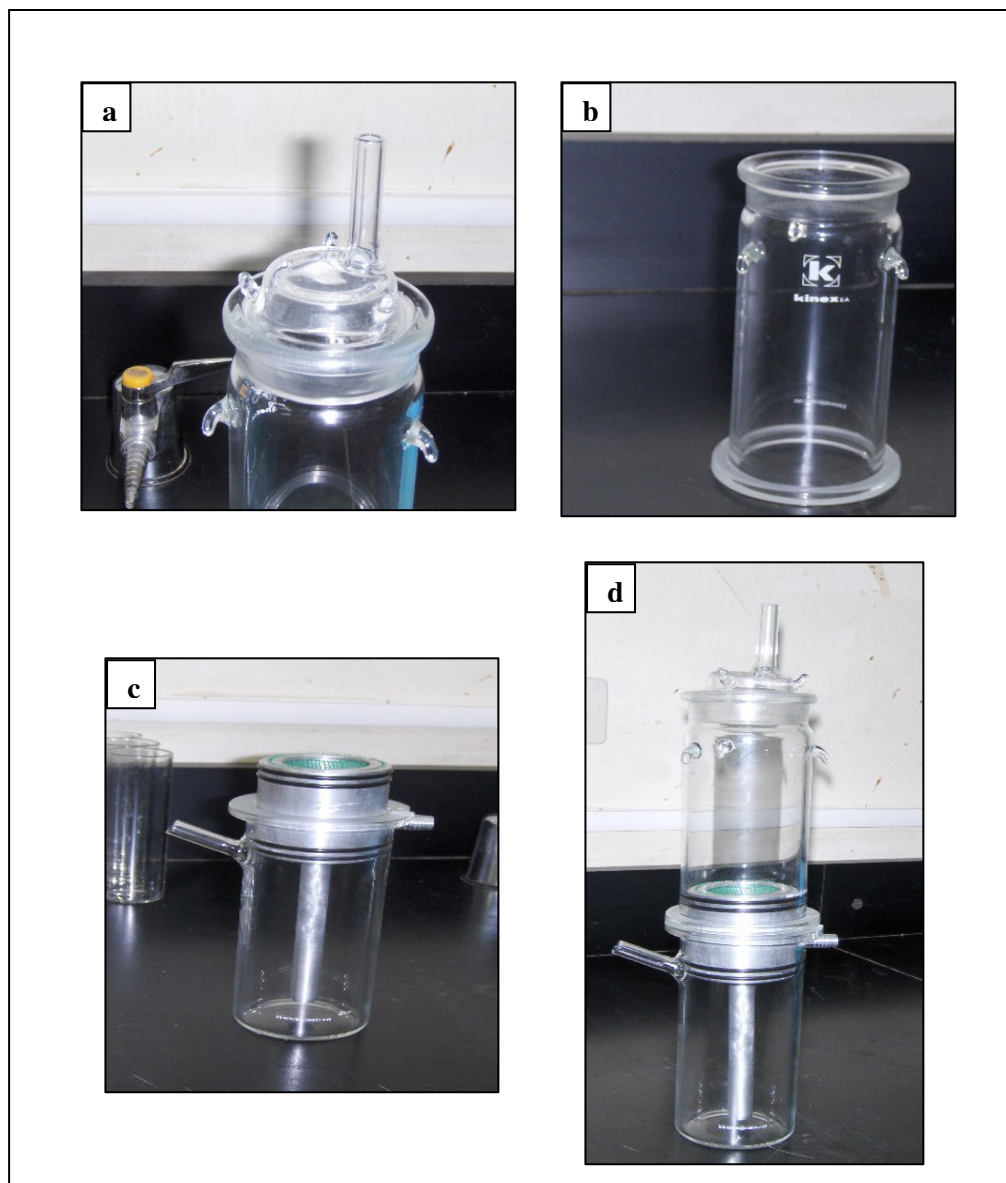


Figura N° 29. Partes del Biorreactor de Inmersión Temporal. (a) Tapa del contenedor superior. (b) Contenedor superior. (c) Contenedor inferior con soporte central (d) Diseño final del biorreactor prototipo

IV.2.1. Filtros de Aire.

El Biorreactor dispone de tres filtros de aire, colocados en el compartimiento superior, central e inferior respectivamente; con el objetivo de impedir el paso de bacterias o microorganismos al medio de cultivo y evitar la contaminación de las plantas. Cada cartucho tiene forma cilíndrica para facilitar el paso eficiente del aire a través de toda el área superficial del medio filtrante. Estos filtros son reciclables, es decir, que pueden ser limpiados con agua y jabón y además deben esterilizarse en un autoclave. Los filtros están contruidos con materiales de características específicas que garantizan la inocuidad del sistema biológico que se encuentra dentro del equipo.

Cada filtro está constituido por 4 capas filtrantes como se puede observar en la figura N° 30, cada una de un material distinto y colocado en un orden específico a fin de cumplir con los requerimientos de un filtro de aire. A continuación se explican los materiales utilizados y las consideraciones que se tomaron en cuenta para lograr el objetivo deseado.

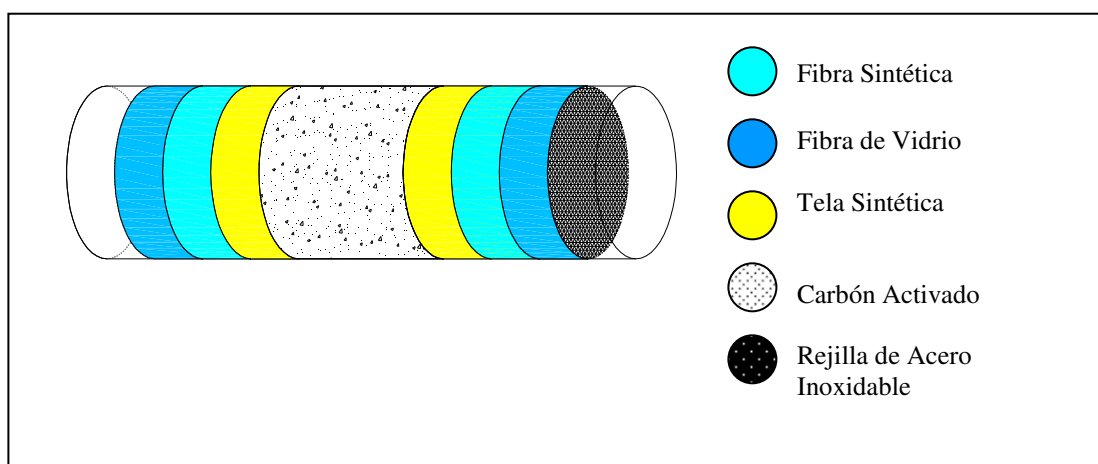


Figura N° 30. Vista Interior del filtro de Aire diseñado para el Biorreactor de Inmersión Temporal prototipo

Uno de los componentes más relevantes seleccionado para la elaboración de los filtros es el carbón activado ya que entre algunas de sus características está la de poseer millones de poros microscópicos dispuestos en su superficie, los cuales facilitan la adsorción de partículas, bacterias, microorganismos, entre otros; lo que se traduce en un área de intercambio considerable.

El carbón activado tiene una fuerte capacidad adsorbtiva para otras moléculas basadas en el carbono (orgánicas), y es excelente para retener firmemente moléculas más pesadas tales como compuestos orgánicos aromáticos ⁽⁶⁰⁾

Otro aspecto importante que se consideró en el diseño del filtro, fue reducir el tamaño de las partículas de carbón activado a un diámetro menor que $0,18\ \mu\text{m}$ y su distribución apropiada dentro del cartucho para facilitar el proceso de adsorción y que las partículas o bacterias queden retenidas en los intersticios del carbón; además como las partículas a retener son tan pequeñas (en el orden de $0,45\ \mu\text{m}$ para microorganismos y esporas) la tasa de adsorción mayor debido a que existe una distancia más corta entre ellas y los lugares de adsorción⁽⁶⁰⁾.

Con el fin de aumentar la efectividad de los cartuchos filtrantes, se procedió a estudiar los materiales de diversos filtros utilizados en la industria, en aplicaciones como sistemas de aire acondicionado, filtros estériles para hospitales e industrias de producción de alimentos, en las cuales se requiere un ambiente aséptico libre de microorganismos. Con esta información se procedió a seleccionar algunos tipos de telas sintéticas como se puede apreciar en la tabla N° 2 las telas seleccionadas que fueron colocadas en capas dentro de los cartuchos (figura N° 28).

Tabla N° 2. Composición de las telas seleccionadas en la elaboración de los Filtros de Aire

Telas Seleccionadas	Composición (%)
MELBOX (1 capa)	Polipropileno 100 %
Medelin 3 (3 capas)	50% Polipropileno, 30% Algodón, 20% resinas naturales
MEDELIN (4 capas)	50% Polipropileno, 30% Algodón, 20% resinas naturales

Una vez determinados que tipos de materiales serían utilizados como medio filtrante y definida la forma cilíndrica de los cartuchos, se procedió a estudiar las distintas opciones de mangueras disponibles en el mercado que pudieran soportar las condiciones de esterilización a las que serán sometidos los filtros:

- Soportar altas presiones y temperaturas (121 °C, 1,5 kg-f/m²)
- Resistencia al desgaste físico
- Maleables
- Químicamente Inerte

Con base a lo anteriormente expuesto se decidió utilizar mangueras para transporte de fluidos de alta presión como se muestra en la figura N° 31

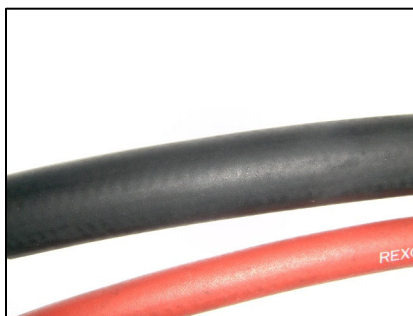


Figura N° 31. Mangueras para transporte de fluidos de alta presión

Una vez seleccionados los materiales apropiados, se procedió a realizar una prueba experimental con el objetivo de verificar la eficacia de los filtros diseñados ensayando con diferentes combinaciones de telas y granulometrías para el carbón activado. Para ello se construyeron ocho contenedores, cuyas tapas poseían filtros con diferentes características como se puede apreciar en la figura N° 32 y tabla N° 3.

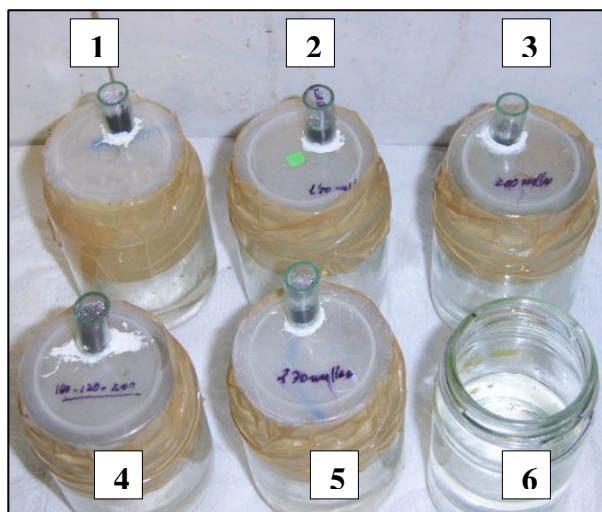


Figura N° 32. Ensayo para la elección de los tamaños de partícula del carbón activado destinado a la construcción de los filtros de Aire del Biorreactor Prototipo

Posteriormente se esterilizaron en autoclave, y se llenaron con una solución de medio de cultivo nutritivo MS y fueron colocados en observación por siete días.

Transcurrida una semana del experimento se observó la respuesta ante la contaminación en cada uno de los frascos tal como se registra en la tabla N° 3 y con los datos arrojados se procedió a escoger cual filtro presentaba el mejor comportamiento y es más fácil de construir.

Tabla N° 3. Características de los filtros ensayados. Número de Mesh, tamaño de partícula e intersticios del carbón activado, así como su comportamiento ante la contaminación

Filtros	1	2	3	4	5	6
Número de Mesh (Carbón activado dispuesto en capas de 2 g).	140	200	279	100 120 200	----	Sin filtro
Mezcla de carbón	----	----	----	----	140 270 325 400	----
Tamaño de Partícula (μm)	106	75	53	Variable	----	----
Intersticio (μm)	38,8	27,45	19,54	variable	----	----



Contaminado



No Contaminado

Se puede apreciar que los filtros de prueba 1 y 2 y la muestra 6 (sin filtro) no tuvieron resultados satisfactorios, lo que indica que dichas granulometrías en el caso de los filtros no son adecuadas para filtrar las bacterias, microorganismos y esporas. Sin embargo se observa que las fabricadas con diferentes granulometrías como la 4, y la de mayor granulometría como la 6 no se contaminaron. Por otra parte el filtro 5 donde el carbón activado no esta dispuesto en forma de capas tampoco presentó contaminación por lo cual se concluyó que los filtros 3, 4, 5, son idóneos para el sistema en estudio. Si embargo, dado que la preparación del filtro 5 es más sencilla por no tener que distribuirse el material en capas ni requerir un control sobre el tamaño de los intersticios creados por la mezcla de materiales permite el paso del aire y ofrece mayor resistencia a la entrada de bacteria y hongos al interior del recipiente, la distribución del filtro 5 fue la seleccionada para el diseño definitivo de los filtros de aire dispuestos en el Biorreactor prototipo.

Una vez determinado qué el filtro 5 puede ser utilizado, se decidió poner en marcha una prueba final antes de instalarlos en el biorreactor. Esta prueba consistió en cultivar dentro de dos frascos cuatro microestacas de yuca (planta seleccionada por su rápido crecimiento) uno con filtro 5 y otro sin el, como se puede apreciar en la

Figura N° 33 y se procedió a evaluar el crecimiento de las plantas y la presencia o ausencia de bacterias y hongos.



Figura N° 33. Envases de vidrio de 125 ml con y sin el filtro seleccionado. Cultivo de cuatro microestacas de yuca en un Medio de Cultivo para Propagación Tradicional en Medio Semisólido.

Al cabo de 2 meses de iniciada la prueba se procedió a construir una tabla comparativa entre ambas experiencias (tabla N° 4) donde se miden variables como la longitud de vástago, longitud de raíces, peso seco y peso fresco de las plantas; en la Figura N° 34; se puede observar la medición de las longitudes de las raíces y vástagos de las plantas.

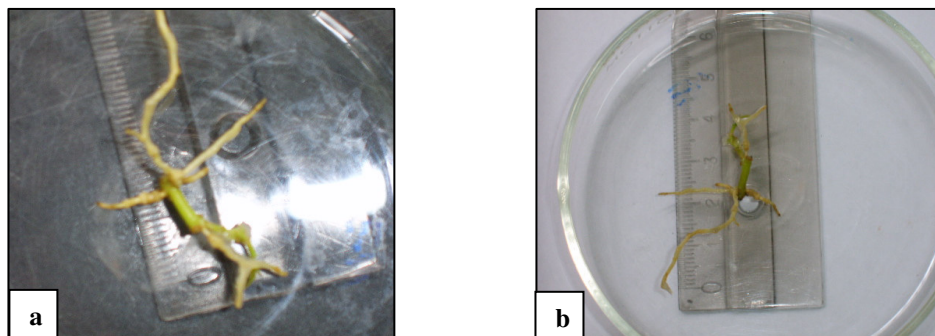


Figura N°34 Medición de las variables. (a) Longitud de Vástago y (b) longitud de Raíz principal

Tabla N° 4. Evaluación de efectividad de los filtros de Aire durante 2 meses de prueba.

Frasco Contenedor Sin Filtro				Frasco Contenedor Con Filtro			
Planta N°	Lv (cm)	Lr (cm)	Pf (mg)	Planta N°	Lv (cm)	Lr (cm)	Pf (mg)
1	5.50	13.50	289	1	7.00	13.00	482
2	4.00	6.00	121	2	4.00	10.00	190
3	5.00	9.00	186	3	2.50	6.00	63
4	1.50	2.50	63	4	1.50	4,00	97
Promedio	2.25	7.00	165	Promedio	2.75	8,50	208

Donde:

Lv: Longitud de Vástagos (cm)

Lr: Longitud de Raíces (cm)

Pf: Peso Fresco (mg)

Los resultados de este análisis fueron altamente satisfactorios ya que demuestran la efectividad del filtro al no observarse la presencia de bacterias o microorganismos durante todo el período de prueba (2 meses), y obtener mayores valores en las variables longitud de vástago y raíces y peso fresco con respecto a las reportadas en ausencia de filtro a excepción de los valores obtenidos en la variable peso seco los cuales fueron mayores en este caso. A continuación en las figuras N° 35 y N° 36, se muestran los diagramas de barras correspondientes al análisis de estas variables. Puede observarse claramente el incremento en la longitud de los vástagos, raíces y aumento del peso fresco, en un 22%, 21% y 26% respectivamente; valores considerados relevantes en plantas de apenas dos meses de cultivo.

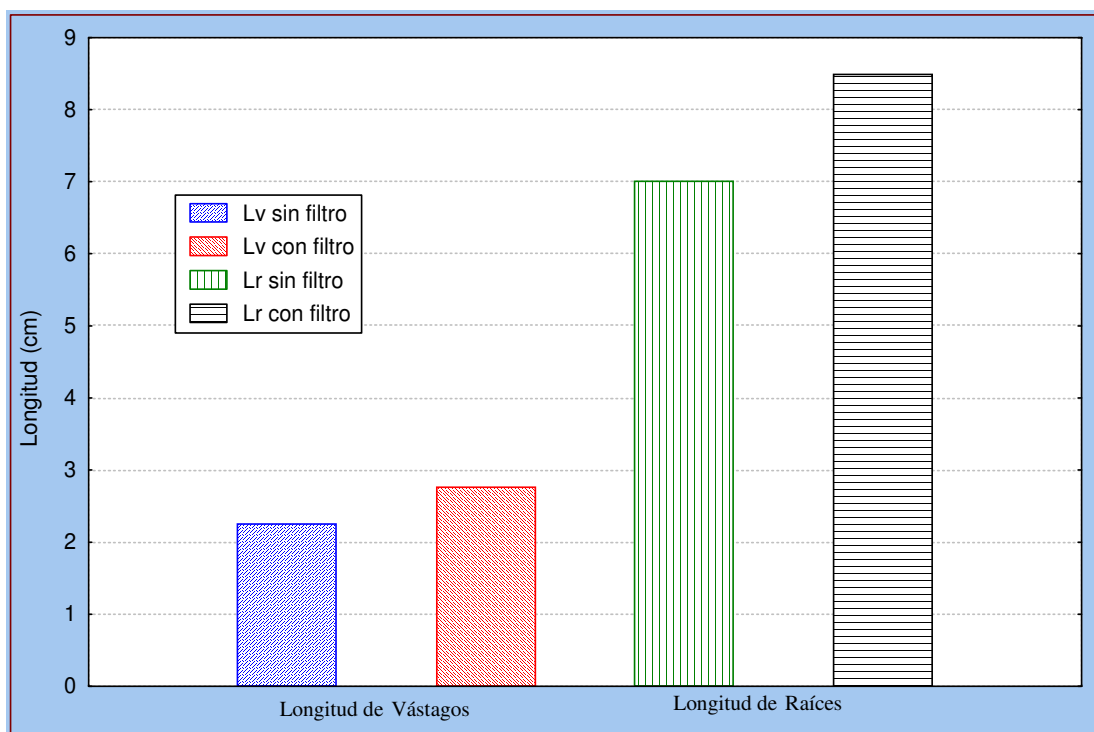


Figura N° 35. Diagrama de Barras. Longitud de Vástagos y Raíces para las experiencias con y sin filtro.

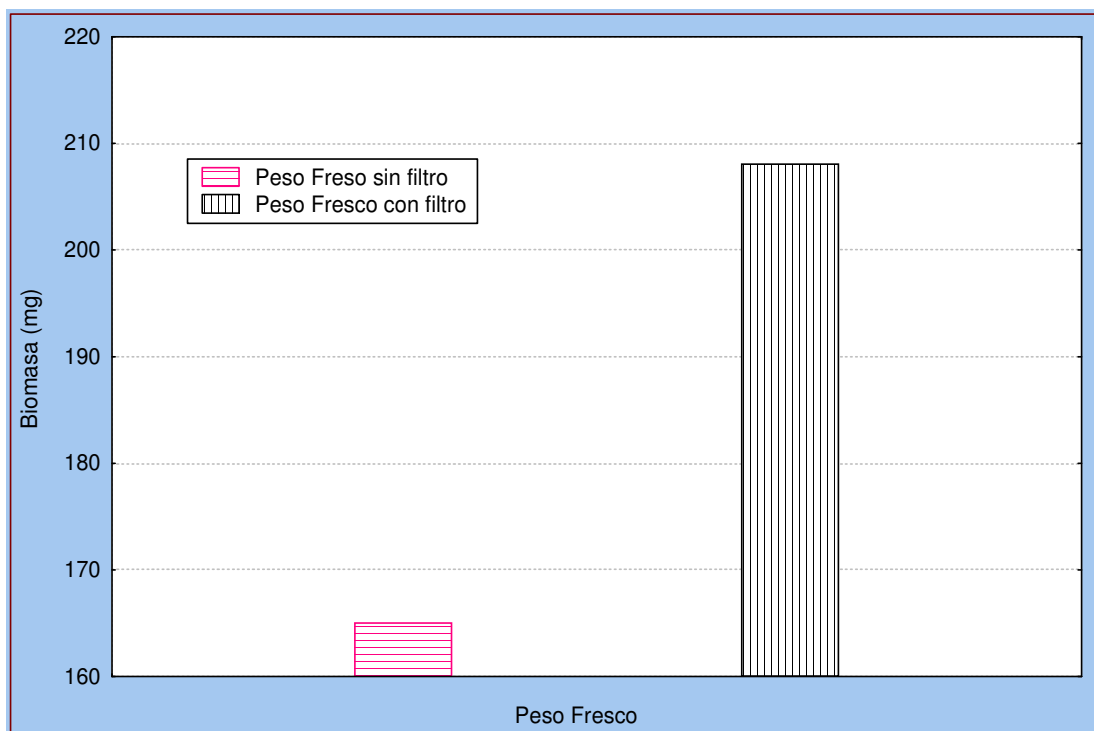


Figura N° 36. Diagrama de Barras. Peso Fresco para las experiencias con y sin filtro

El aumento de la variable peso fresco se debe a la aireación proporcionada por los filtros, ya que al existir una buena transferencia de oxígeno, la planta libera suficiente energía para su crecimiento, mejora el intercambio gaseoso y tiene una mejor asimilación de los nutrientes; además disminuye la acumulación de toxinas como los gases Etileno y Dióxido de carbono; lo que promueve la fotosíntesis y transferencia de carbohidratos desde el medio nutritivo hacia la planta; lo cual incide en mejorar la calidad de las plantas obtenidas *in vitro* ⁽³²⁾

En la figura N° 37 se muestra el prototipo final del filtro de aire construido para el sistema en estudio, con base a los criterios de diseño y consideraciones antes expuestas.

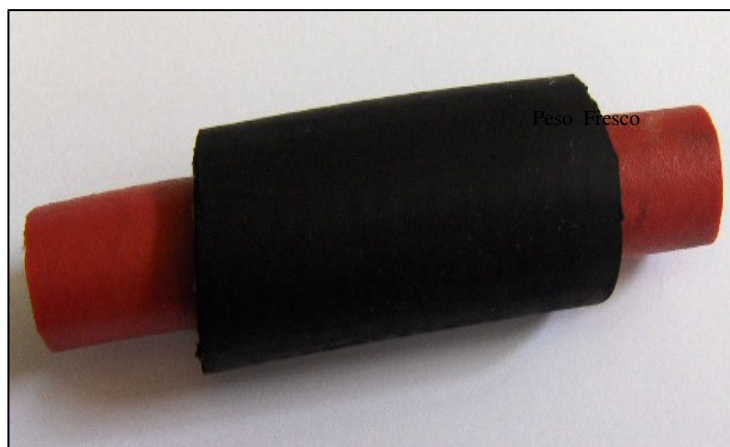


Figura N° 37. Filtro de Aire diseñado para el biorreactor prototipo

IV.2.2 Volumen del Biorreactor:

Con base a lo recomendado en la bibliografía, el volumen del biorreactor está determinado por la cantidad de medio nutritivo disponible en relación al número de explantes colocados dentro del equipo. Con base en lo que recomienda la bibliografía al respecto se estableció una relación de 65ml/explante ⁽²⁴⁾ considerando una cantidad

adicional de medio nutritivo de 88 ml que requieren ser extraídos para el análisis químico de nutrientes.

Por otro lado se utilizó el criterio de diseño mostrado en el marco teórico para la relación longitud diámetro, estableciéndose en $\frac{L}{D} = 1,870$ para el tanque superior y $\frac{L}{D} = 1,876$ para el inferior. Por otro lado se estableció una cantidad de medio de cultivo líquido aproximadamente un 70 % de su capacidad.

$$V_{\text{tanque superior}} = 0,231 \text{ L}$$

$$V_{\text{tanque inferior}} = 0,232 \text{ L}$$

$$V_{\text{total}} = 0,463 \text{ L}$$

IV.2.3. Presión y Temperatura.

De acuerdo con los resultados de Escalona ⁽³¹⁾ quedó demostrado que los sistemas de inmersión temporal funcionan de manera eficiente, sin causar estrés abiótico en las plantas, a presiones de 0,2 barg y temperatura de en el orden de los 27 ± 2 °C. Con base en estos resultados se escogieron estos valores como condiciones de operación del biorreactor.

Como se explicó en el Marco Teórico la velocidad del aire en los biorreactores se determina de manera empírica. En este caso se estableció como límite superior crítico un valor de 0,3 barg, el cual genera una velocidad del aire de 0,385m/s. Las pruebas realizadas a esta presión permitieron observar efectos negativos para la planta como exceso de aireación la cual ejerce una fuerza considerable sobre las plantas impulsándolas a golpearse contra las paredes del reactor dañando sus tejidos. El límite crítico mínimo de velocidad del aire se fijó para 0,1 barg con una velocidad de 0,064m/s, para lo cual la velocidad del aire

suministrado es tan baja que el medio nutritivo no alcanza a subir completamente al compartimiento superior y por lo tanto no se logra sumergir las plantas. Una vez fijados estos parámetros se decidió trabajar a una velocidad constante de 0,259 m/s, a la cual mediante criterios de observación, no se presenta sólidos disueltos, sedimentación ni zonas muertas dentro del equipo.

Para el cálculo de caudal de aire se utilizó la ecuación de Bernoulli y para el cálculo de la presión interna del biorreactor y la verificación de la elevación del medio de cultivo desde el tanque inferior hasta el tanque superior se utilizaron las ecuaciones para el cálculo de variación de presiones en fluidos incompresibles de estática de los fluidos ⁽²⁶⁾

Los valores arrojados fueron:

Caudal de Aire: $20,58 \times 10^{-7} \text{ m}^3/\text{s}$

Presión Interna; 0,2 barg

Las dimensiones y condiciones de operación a las cuales trabaja el biorreactor se encuentran resumidas en la hoja de especificaciones del equipo que se encuentra en la sección de apéndices.

Con los valores de estos parámetros se procedió a estimar el Número de Reynolds antes y después, de los filtros con el fin de asegurar un flujo laminar dentro del equipo, necesario para evitar el daño a los tejidos de las plantas.

Número de Reynolds después del filtro: 0,964

Estos valores confirmaron que el régimen de flujo dentro del biorreactor es laminar; el Número de Reynolds después del filtro disminuyó debido a que los materiales dentro del mismo ejercieron una barrera que redujo el paso del aire.

IV.2.4 Selección de materiales de construcción del biorreactor.

Para la construcción del cuerpo (los contenedores superior e inferior) del biorreactor de inmersión temporal prototipo se utilizó vidrio tipo PYREX[®] debido a su utilidad, y resistencia a los cambios bruscos de temperatura, y a que posee alta resistencia al impacto y es cristalino⁽²⁵⁾; lo que permite el paso de luz en las longitudes de onda necesarias para el proceso fotosintético de las plantas favoreciendo su crecimiento. Para el soporte central se utilizó aluminio Al-6063 resistente a la corrosión y a las condiciones de proceso a las cuales el sistema es sometido.

IV.2.5 Tiempo y Frecuencia de Inmersión.

En estudios previos realizados por Colmenares y Jiménez ⁽³⁰⁾ demostraron que el sistema de inmersión temporal es eficiente para valores de tiempo y frecuencia de inmersión que varían entre 2 a 5 min para los tiempos de inmersión y 4 a 5 horas para sus frecuencias, en función de esto se escogió uno de 5 minutos de tiempo de inmersión con una frecuencia de 4 horas, garantizando una adecuada inmersión y aireación de la planta.

IV.2.6 Sistema de Inyección de Aire

Como se puede observar en la figura N° 38 el biorreactor está conectado a un sistema maestro para la inyección de aire, en el cual controla el tiempo y la frecuencia de inmersión, así como la presión y el flujo de aire que entra al biorreactor.

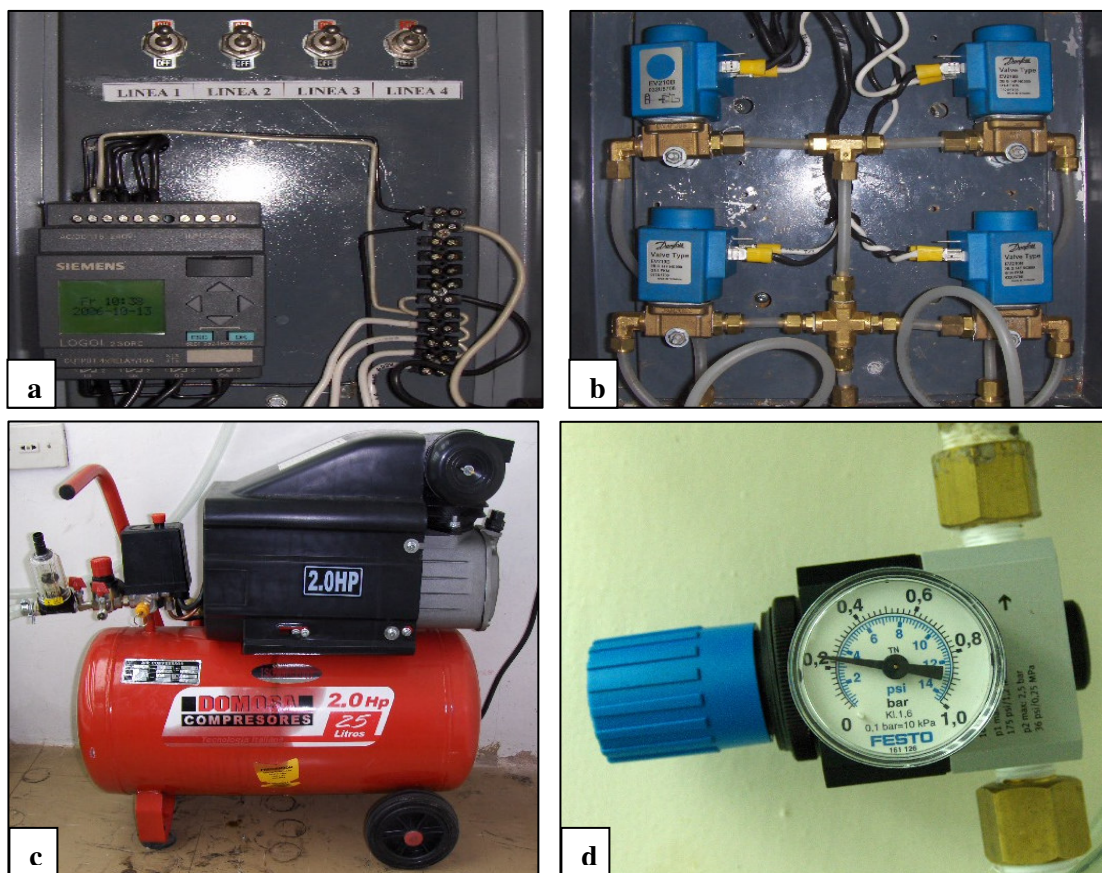


Figura N° 38. Sistema de Inyección de Aire. (a) Controlador de Tiempo y Frecuencia de Inmersión. (b) Válvulas Reguladoras del Flujo Aire. (c) Compresor de Aire. (d) Regulador de Presión de Precisión

Un compresor de aire de 2 Hp con un tanque el cual tiene una capacidad de 25L como se observa en la figura N° 35 (c), es el encargado de suministrar el aire necesario para el funcionamiento del equipo y un regulador de presión de precisión mantiene la presión constante en 0.2 bar, suficiente para garantizar un eficiente mezclado del medio y una adecuada inmersión de las plantas. Una vez fijado el flujo de aire, éste se pasa a través de una válvula solenoide (figura N° 35 b) conectada a un reloj controlador donde están prefijados los tiempos de frecuencia e inmersión. Posteriormente el aire es distribuido al biorreactor mediante un sistema de tuberías, las cuales disponen de válvulas difusoras de aire.

IV.2.7 Estudio del Biorreactor de Inmersión Temporal prototipo.

Una vez construido el Biorreactor, es puesto en marcha y se colocaron en su interior 2 brotes de Pino Gigante AAA por un lapso de 30 días (tiempo del estudio) como se observa en la figura N° 39, con el fin de comparar el crecimiento de la planta entre el sistema propuesto (Biorreactor) y el Sistema *in vitro* de Propagación tradicional en medio semisólido.

En la tabla de resultados (tabla N° 5) mostrada a continuación, se muestra el comportamiento de la biomasa de la planta para ambos sistemas en función del tiempo. Con base a los datos obtenidos se construyó la figura N° 36, en la cual se observan tendencias de las curvas de crecimiento sigmoideal para ambos sistemas

Para este análisis se escogió de los tres callos colocados en medio semisólido, aquel cuya biomasa fuera lo más cercana posible a la utilizada dentro del biorreactor, con el fin de lograr la mayor semejanza posible entre las condiciones iniciales para ambos sistemas, es decir, se utilizó el callo 1 con una biomasa correspondiente a 14g.

Tabla N°5. Comportamiento de la Biomasa de las plantas dentro del Biorreactor y del Sistema *in vitro* Tradicional

Tiempo (días)	Biomasa de la planta (Biorreactor) (g)	Biomasa de la planta (sistema tradicional) (g)
0	15,70	14,00
3	9,00	12,24
6	11,34	9,82
9	13,00	8,12
12	15,01	7,25
15	20,75	8,53
18	25,00	9,45
21	25,21	10,08
24	25,20	11,03
27	24,80	11,56
30	23,42	11,60

En la tabla N° 5, claramente se observa un aumento considerable de la biomasa para el sistema propuesto (Biorreactor). Estos datos permitieron graficar las curvas de crecimiento sigmoidal de la planta en ambos sistemas como se observa en la figura N° 39 con el fin, de comparar cual de ellos es mucho mas eficiente respecto al aumento de la biomasa en función del tiempo.

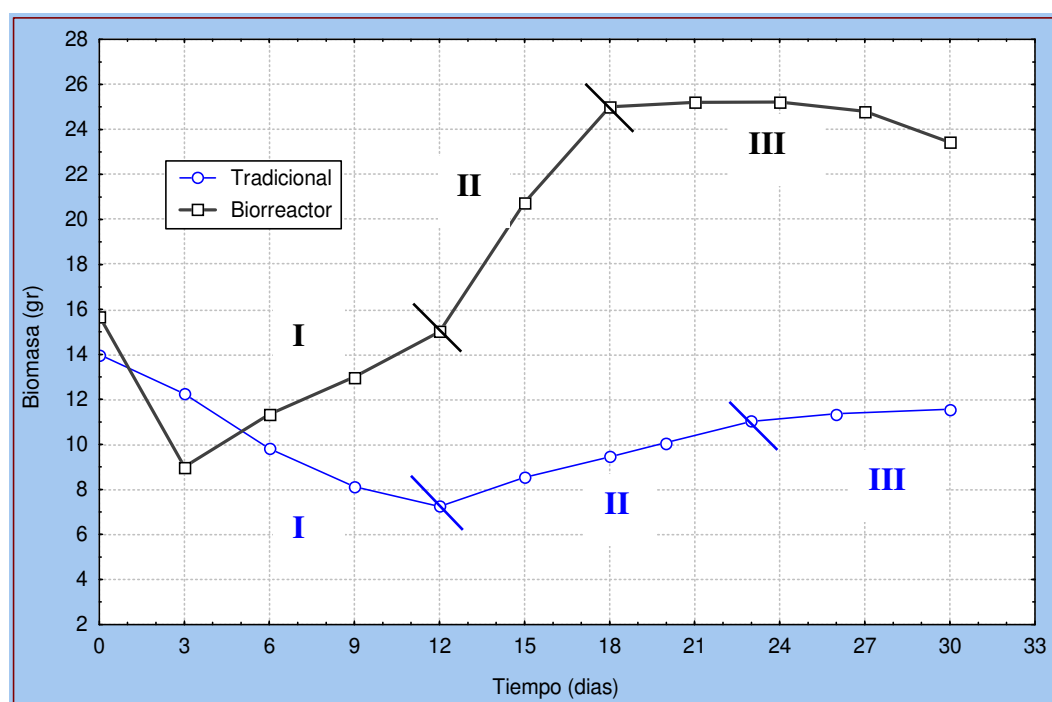


Figura N° 39. Comparación entre las curvas de crecimiento sigmoidal de la planta en los sistemas *in vitro* tradicional y para el Biorreactor y etapas de crecimiento de la planta.

Como se puede observar en la figura N° 39, la tendencia de las Curvas de Crecimiento Sigmoidal de la planta para ambos sistemas es similar, aunque es determinante el aumento de la biomasa de la planta obtenido en del biorreactor (efecto altamente deseado); donde la planta aumenta de peso y más rápidamente que en el Sistema de Propagación *in vitro* Tradicional.

Por otro lado en la figura N° 39 se pueden apreciar cada una de las etapas de crecimiento de la planta y el efecto respecto al aumento de biomasa que ocurre en ellas, a través del uso de ambos sistemas.

Un aspecto muy importante a analizar es el momento de máximo crecimiento de la planta, observando que ocurrió en el día 18 para el biorreactor, donde la biomasa es considerablemente mayor (1,65 veces), que para el sistema tradicional donde el punto de máximo crecimiento se observa en el día 21.

También se observa que aunque para ambos sistemas la planta sufre de un estrés abiótico una vez que es traspasada del medio donde estuvo contenida antes de comenzar con este estudio a un medio fresco (medio nutritivo nuevo para el comienzo del análisis), este es menos intenso dentro del biorreactor que en el sistema tradicional; evidenciándose en el porcentaje de pérdida de peso de la planta con un valor 38 % para el biorreactor y un 48% en el sistema tradicional. Por otro lado se observó que en las etapas I y II, la planta empieza a aumentar de peso en el día 3 para el biorreactor y apenas en el día 12 para el sistema tradicional. Esto radica en una diferencia respecto al tiempo de 9 días de ventaja a favor del biorreactor prototipo.

Luego en la etapa III se aprecia un valor aproximadamente constante de la biomasa de la planta para ambos sistemas a partir del día 21, con un porcentaje de aumento de la biomasa del 61% respecto a la biomasa inicial de la planta desarrollada dentro del Biorreactor, mientras que la planta extraída del Sistema *in vitro* Tradicional solamente alcanzó a recuperar el 82% de su masa inicial.

Posteriormente, luego del día 21 en el biorreactor y 30 para el Sistema *in vitro* Tradicional, la planta empieza a perder peso producto del agotamiento del medio nutritivo, utilización de sus reservas de energía por parte de la planta y su posterior deshidratación.

Ahora bien, en la figura N° 40 se muestran algunas de las etapas en el desarrollo de la planta dentro del biorreactor. La primera figura corresponde a la fase inicial (I) de la experiencia donde los brotes o callos son colocados dentro del equipo (t=0)

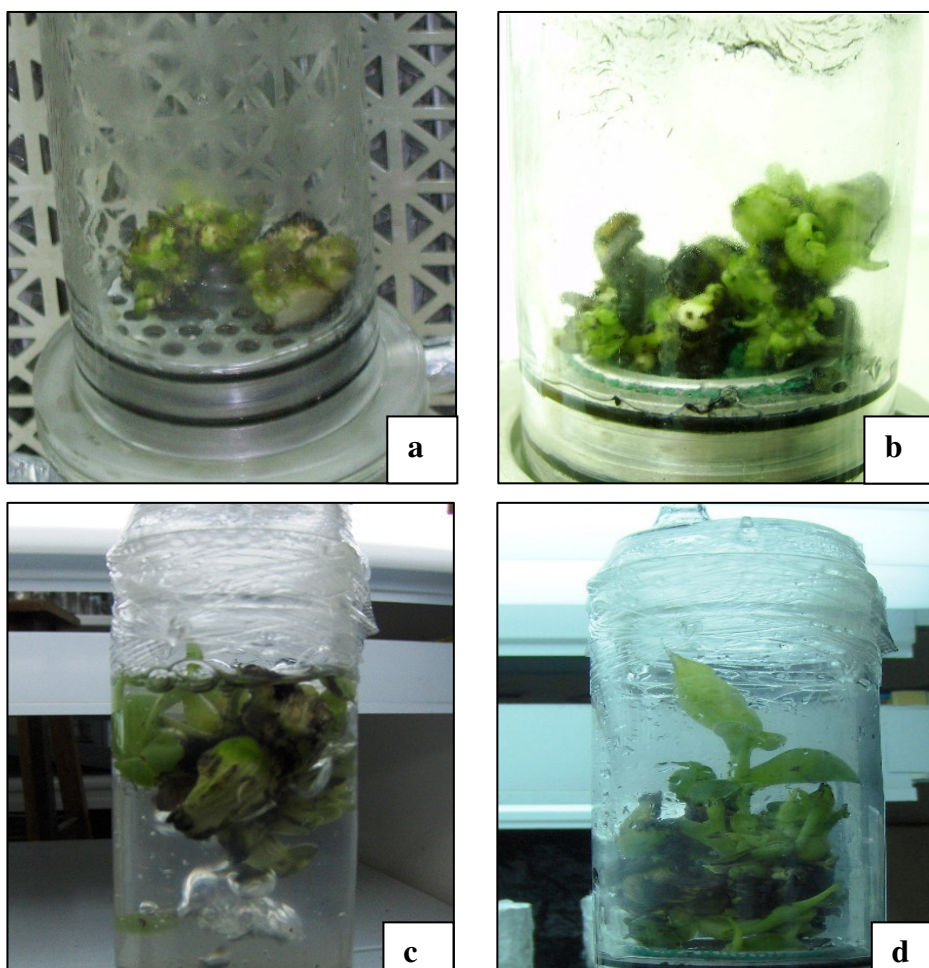


Figura N° 40. Fases del crecimiento del callo de Pineo Gigante AAA. (a) Callos en la fase inicial I ($t=0$ días). (b) y (c) Callo en la fase II ($t=12$ y $t=15$ días). Planta totalmente formada ($t=30$ días)

En las Figura N° 40 b y c, se muestran los brotes para un tiempo entre 12 a 15 días (fase II), así como el proceso de aireación dentro del biorreactor. Se observa claramente el incremento en el tamaño, respecto a la fase inicial.

Finalmente en la Figura N° 40 d, se observa la planta perfectamente formada en un tiempo aproximado de 24 días. En este momento la planta ha alcanzado su máximo crecimiento (Figura N° 30); En este período que corresponde a la etapa III (entre los 18 a 30 días), la planta empezará a disminuir su biomasa, a consecuencia de las premisas consideradas en este análisis acerca de la deshidratación.

IV.3 Curva de Absorción de Nutrientes.

Para la construcción de las curvas de absorción de los nutrientes se utilizaron los resultados de la concentración de macronutrientes (P, K, Ca, y Mg) realizados por el laboratorio de suelos del INIA-CENIAP, mediante la técnica de absorción atómica. Estos datos fueron almacenados en la tabla N° 6 mostrada a continuación para su posterior análisis.

Tabla N° 6. Variación en el tiempo del contenido de macronutrientes en el medio de cultivo líquido dentro del Biorreactor Prototipo

Tiempo (días)	Concentración (ppm)				Porcentaje de Nutrientes en el medio nutritivo (%)				
	P	K	Ca	N	Mg	P	K	Ca	Mg
0	641,10	757,00	619,20	0,01	166,40	100,0	100,0	100,0	100,0
3	533,40	753,60	221,20	0,01	136,30	83,2	99,6	35,7	81,9
6	281,80	672,10	216,60	0,01	128,10	44,0	88,8	35,0	77,0
9	196,80	663,90	215,60	0,01	96,90	30,7	87,7	34,8	58,2
12	182,60	635,10	191,80	0,01	82,10	28,5	83,9	31,0	49,3
15	73,30	336,75	187,80	0,01	81,90	11,4	44,5	30,3	49,2
18	55,67	332,65	182,82	0,01	79,84	8,7	43,9	29,5	48,0
21	28,34	300,98	165,42	0,01	72,24	4,4	39,8	26,7	43,4
24	10,12	250,21	137,52	0,01	60,05	1,6	33,1	22,2	36,1
27	7,29	229,87	126,34	0,01	55,17	1,1	30,4	20,4	33,2
30	5,03	200,08	109,96	0,01	48,02	0,8	26,4	17,8	28,9

Así mismo, en la figura N° 41 se puede observar la tendencia decreciente de las curvas de absorción de los macronutrientes, Fósforo, Potasio, Calcio y Magnesio (considerados como los macronutrientes más relevantes en este estudio). Cabe destacar que no se observaron resultados del análisis de Nitrógeno ya que los equipos utilizados por el laboratorio de suelos del INIA-CENIAP no arrojaron variaciones respecto al Nitrógeno, por lo cual no fue considerado para el análisis; ya que al ser el Nitrógeno uno de los macronutrientes mas importantes en el crecimiento vegetal es imposible que no reportara variación alguna; con base a esto se presume que hubo

errores en la manipulación de las muestras lo cual afectó los resultados de este análisis en particular.

El estudio fue realizado desde el momento inicial del experimento por un período de un mes, con la finalidad de determinar en que momento los nutrientes empiezan a agotarse y es necesario un cambio de medio líquido.

En la figura N° 41 se observa evolución de la absorción de los nutrientes, pudiendo separar el análisis de los mismos en dos fases, para su estudio más detallado. Una primera fase de latencia, la cual ocurre en un período de 0-3 días donde la absorción fue baja (inferior a un 25%) a excepción del Calcio siendo el más absorbido al principio por ser uno de los macronutrientes más consumidos por las Musáceas, aunque posteriormente su consumo sea casi constante⁽²⁸⁾. Luego se encontró una segunda fase de absorción lineal por el resto del tiempo (4-30 días) para todos los elementos, sin que se estableciera un equilibrio en el medio de cultivo, ni tampoco una liberación de los elementos al medio (aumento de la concentración del elemento en el medio nutritivo)

Por otra parte, se aprecia una fuerte absorción neta del elemento Fósforo, ya que para el día 30 se ha consumido casi el 100% de este, presente en el medio lo que se traduce en una concentración extremadamente baja para ese instante de tiempo de 5,03 ppm.

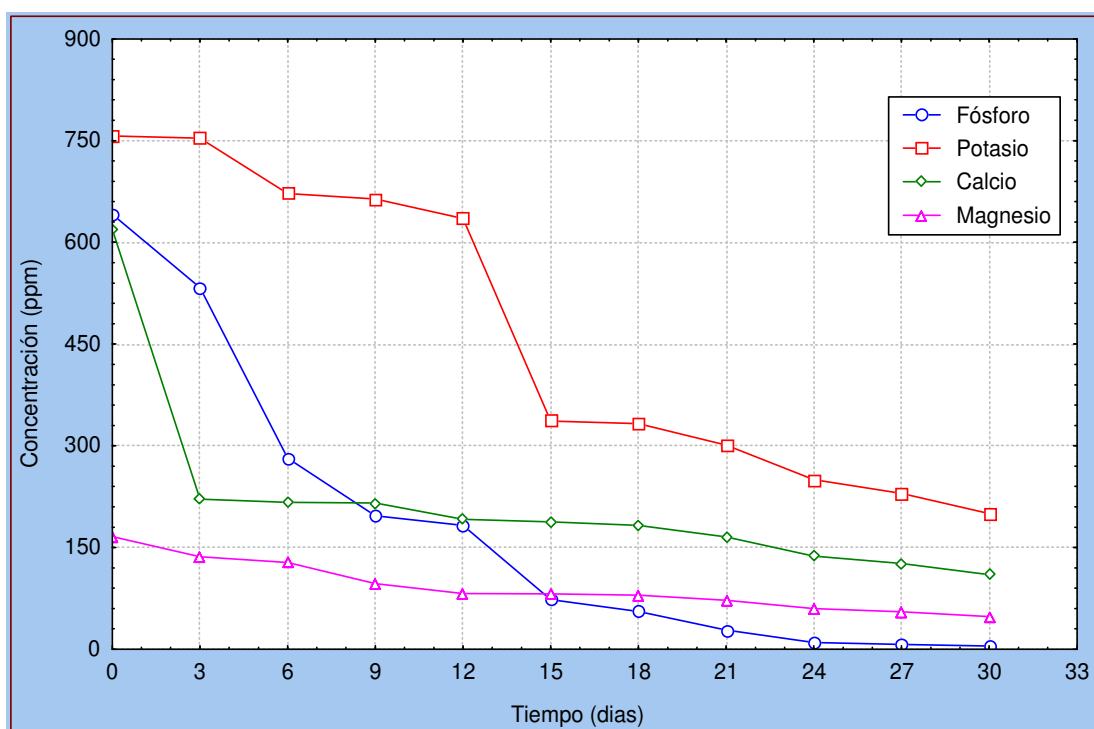


Figura N° 41. Comportamiento de la Concentración de los nutrientes Fósforo, Potasio, calcio y Magnesio en el medio nutritivo.

Con base a lo antes expuesto la figura N° 42 muestra los porcentajes de nutrientes en el medio líquido a medida que transcurre el tiempo; encontrándose el siguiente orden decreciente de absorción para el día 30 (momento en el cual según análisis anteriores se determinó que no hay variación positiva de la biomasa, sino que empieza levemente a disminuir): Fósforo (99,2%), Calcio (82,2%), Potasio (73,6%) y Magnesio (71,1%). La absorción de estos nutrientes viene acompañada de por un fuerte crecimiento de la biomasa (figura N° 39); es decir, se encontró que el Fósforo como elemento base disminuyó progresivamente medida que el tejido de la planta aumentó de peso (a partir del día 3) hasta el momento donde se ha consumido casi todo el Fósforo y la planta entra en un estado de crecimiento casi constante (Figura N° 39) hasta el punto que empieza a deshidratarse y utilizar sus reservas internas ya que el fósforo ha llegado a su límite crítico mínimo ⁽²⁷⁾.

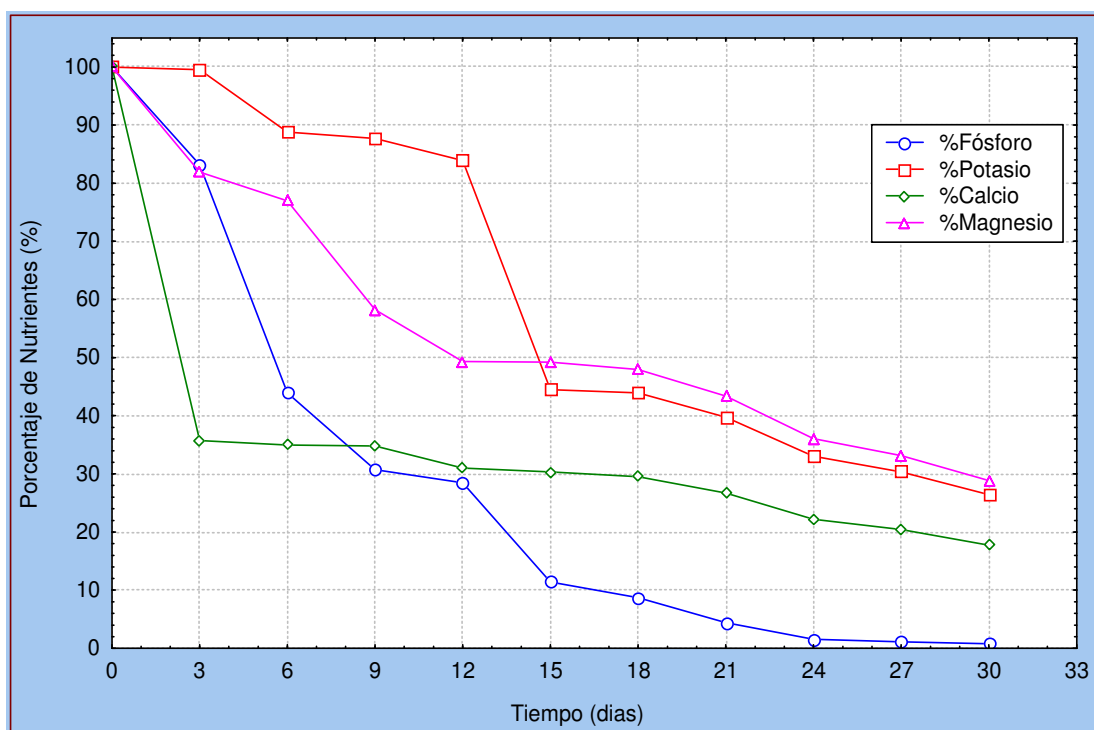


Figura 42. Porcentaje de la concentración de los nutrientes fósforo, Potasio, Calcio y Magnesio, presentes en el medio nutritivo

Para finalizar el estudio de la absorción de los macronutrientes se graficaron las curvas correspondientes a la velocidad de absorción (figura N° 43 diferencia de concentración/ incremento del peso/tiempo) para cada elemento, la cual permitió determinar fluctuaciones en su intensidad.

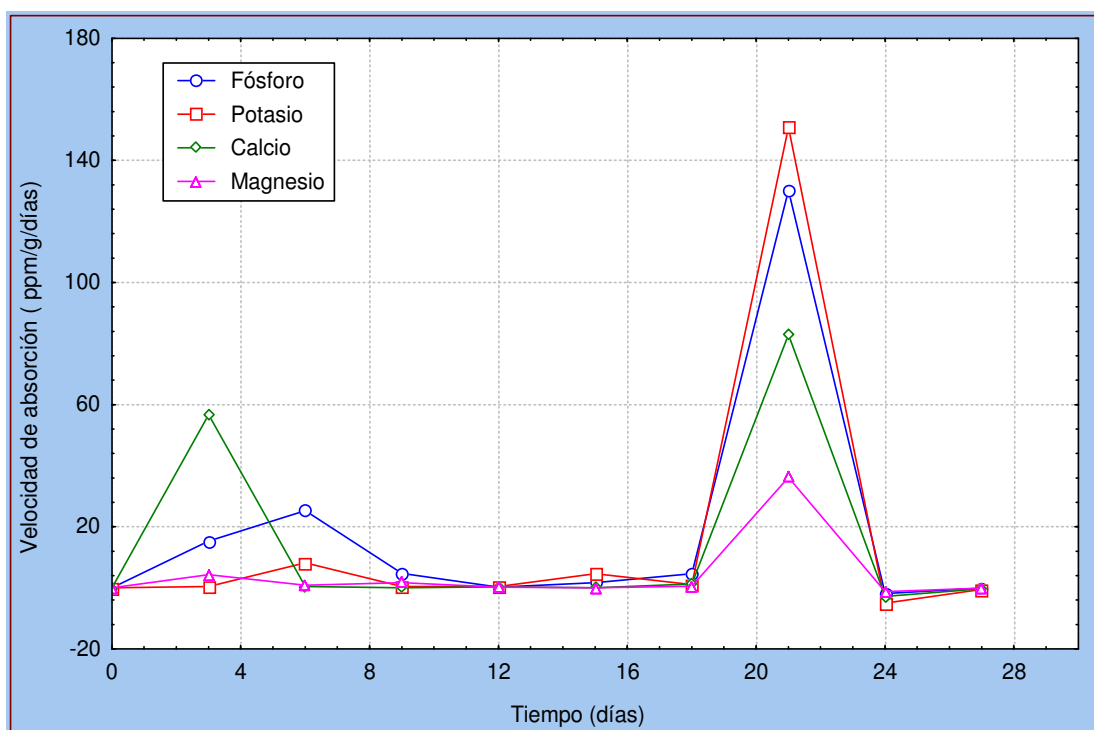


Figura N° 43. Velocidad de absorción de los nutrientes Fósforo, Potasio, Calcio y Magnesio dentro del medio de cultivo del biorreactor prototipo.

Se observaron dos máximos de velocidad de absorción, el primero, entre los 3 y 6 días, lo que corresponde a una absorción inicial rápida de los elementos calcio y fósforo y el otro ocurre entre los 20 a 21 días punto donde se ha consumido la mayor parte de los nutrientes, principalmente encontrándose las mayores velocidades para los elementos potasio y fósforo, seguidas de calcio y magnesio. Las altas velocidades de absorción en el segundo máximo evidencia la necesidad de un cambio de medio para reponer los nutrientes absorbidos por la planta.

IV.4 Construcción del Modelo Matemático

Para el desarrollo del modelo matemático que representa el modelo Fitocinético para la propagación masiva de Pino Gigante *in vitro* en un Biorreactor de Inmersión Temporal se utilizó como herramienta de cálculo el paquete estadístico “STATISTICA 7.0”, gracias a que posee un conjunto de programas y subprogramas idóneos para la construcción de modelos matemáticos multivariantes, tales como los que se requieren en el presente estudio.

A continuación se explican todos aquellos aspectos teóricos estadísticos considerados para la obtención de la ecuación o modelo final, como objetivo principal del presente estudio.

A los efectos de la investigación, señalamos algunas de las virtudes de las técnicas utilizadas en este estudio, y que forman parte de la diversidad de técnicas estadísticas del paquete “STATISTICA 7.0”

Las técnicas multivariantes, son un conjunto de métodos estadísticos que analizan de forma simultánea dos o más variables observadas, es decir, permiten una visión en conjunto de los fenómenos estudiados. Entre las técnicas utilizadas por el paquete se encuentra el análisis de componentes principales (ACP) como método estadístico de síntesis de la información, o reducción de la dimensión (número de variables). Es decir, ante un banco de datos con muchas variables, el objetivo será reducirlas, perdiendo la menor cantidad de información posible; diseñado para tablas de medidas o de escalas métricas (observaciones/variables). Los nuevos componentes principales o factores serán una combinación lineal de las variables originales, y además serán independientes entre sí ⁽²⁹⁾

A continuación se explican en dos etapas todos aquellos análisis estadísticos realizados para la obtención de la ecuación final

ETAPA I

El experimento como vía de indagación científica, supone, poner a prueba un modelo de realidad en un contexto en el cual es posible el control de ciertos aspectos claves en la explicación, en otras palabras, si definir es medir, experimentar es establecer condiciones optimas de medición (carrillo, 1983). Es por ello que, mediante una investigación alimentada con la data generada del manejo del Biorreactor de Inmersión Temporal diseñado esta investigación, se obtuvieron los datos (valores) necesarios para desarrollar el modelo.

Con el propósito de observar la tendencia de estos valores, se construyeron gráficas que permitieron analizar el comportamiento a priori de esta data.

Sin embargo, esto no es suficiente para obtener un modelo matemático, se requiere observar la correlación entre todas las variables, ya que el sistema en estudio depende de diferentes variables como las concentraciones de los nutrientes, la biomasa y el tiempo que interactúan entre si. En este caso ninguno de los elementos que se están estudiando actúa por separado, generalmente los sistemas biológicos son sistemas complejos por el hecho de depender de tantos factores; en este caso en particular se limitó al estudio de la variación de la concentración de los nutrientes en el medio y su efecto sobre la biomasa de la planta; lo que obligatoriamente induce a utilizar un método estadístico que permita visualizar e interpretar el comportamiento de todas las variables de manera conjunta. Con base en lo antes dicho, se resume en la siguiente tabla denominada Matriz de Estado (Tabla N° 7), los datos utilizados en análisis anteriores como punto de partida para la obtención del modelo matemático.

Tabla N° 7. Matriz de Estado, correspondiente a la variación de las concentraciones en el medio nutritivo, comportamiento de la biomasa de la planta y definición de estados.

Réplicas	tiempo (días)	P (ppm)	K (ppm)	Ca (ppm)	Mg (ppm)	Biomasa (g)	ESTADO
1	0	641,10	757,00	619,20	166,40	15,7	1
2	3	533,40	753,60	221,20	136,30	9	1
3	6	281,80	672,10	216,60	128,10	11,34	1
4	9	196,80	663,90	215,60	96,90	13	1
5	12	182,60	635,10	191,80	82,10	15,01	1
6	15	73,30	336,75	187,80	81,90	20,75	1
7	18	55,67	332,65	182,82	79,84	25	0
8	21	28,34	300,98	165,42	72,24	25,21	0
9	24	10,12	250,21	137,52	60,05	25,2	0
10	27	7,29	229,87	126,34	55,17	24,8	0
11	30	5,03	200,08	109,96	48,02	23,42	0

Ahora bien; las “réplicas” corresponden a los casos en estudio (11 casos en total) y el “ESTADO” a aquellos valores asignados como “Estado 1” a los datos para los cuales experimentalmente se demostró que la planta posee aún suficiente cantidad de nutrientes para desarrollarse, y al “Estado 0” aquellos valores, donde la planta padece los efectos de la deficiencia nutritiva.

Esto sugiere la necesidad de desarrollar un modelo logístico que determine el momento; como razón de cambio a aquellos casos donde es necesario el reemplazo del medio nutritivo debido al agotamiento o baja concentración de los nutrientes en el medio líquido por un medio fresco.

ETAPA II

El segundo paso es el análisis multivariado⁽²³⁾ y la obtención de los coeficientes de correlación mediante los cuales se determina si las variables están o no correlacionadas entre si. Una de las ventajas de la herramienta del análisis estadístico utilizado en esta investigación es que la estadística multivariada a través del análisis de componentes principales permite atacar problemas que requieren de un

análisis de reducción dimensional como es el caso en estudio; donde se tienen siete variables en once casos interactuando juntas y se desea explorar el comportamiento de alguna de las variables y sus correlaciones en un solo gráfico sencillo llamado Biplot que consiste de un gráfico que relaciona dos aspectos como lo son variables y casos.

De manera didáctica se explica en forma general la técnica de reducción dimensional y como fue aplicada en la presente investigación. Para el caso particular de este sistema se tienen las variables tiempo, fósforo, potasio, calcio, magnesio, biomasa y la variable estado.

El análisis propone la construcción de una gráfica, por ejemplo, una gráfica en dos dimensiones (figura N° 44). En el eje de la ordenada se coloca una de las variables como Fósforo y el eje de la abscisa el Calcio, luego se grafican algunos o todos los casos (en este ejemplo se graficaron solo tres casos) de esta manera, se asigna la coordenadas de tres puntos del sistema.

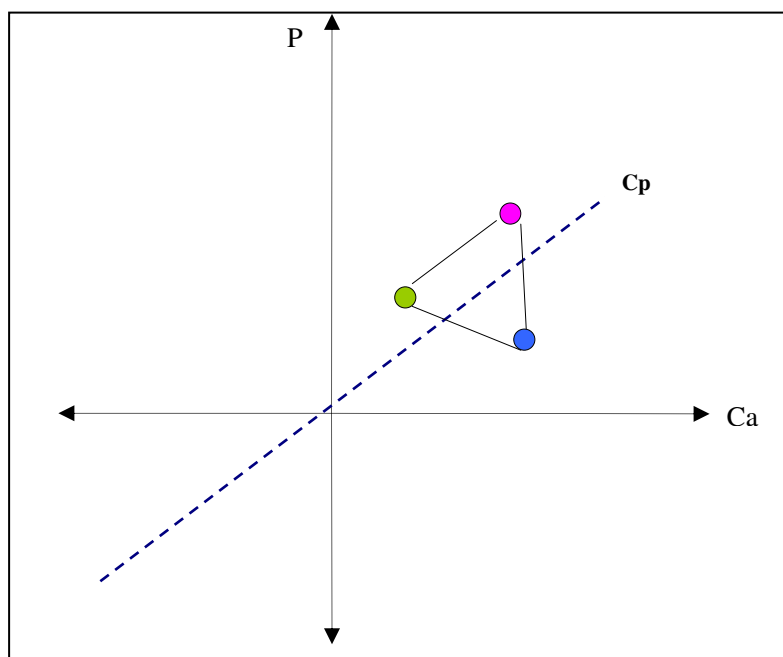


Figura N° 44. Ejemplo de la Gráfica Biplot que muestra el componente principal entre las variables P y Ca

La recta que mejor ajuste estos puntos (Ca y P), se obtiene a través de la técnica de mínimos cuadrados, y se denomina Componente Principal (CP)

Ahora bien, el componente principal, se convierte en un eje que puede ser rotado para convertirlo en el centro del sistema (Figura N° 45) y cambiar la orientación de los puntos sin modificar la relación que tienen entre sí. Lo único que ha cambiado es el eje de referencia; ahora, es el Componente Principal. El área entre los puntos es conocida como inercia y representa la variación natural del sistema. En ambos casos esta relación se mantiene.

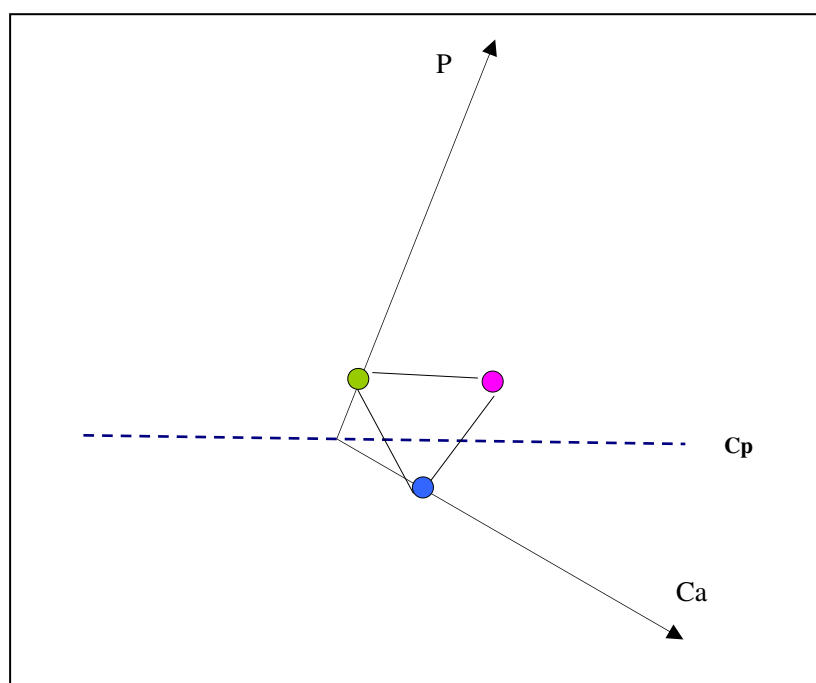


Figura N° 45. Rotación del Componente Principal

Una vez más, se puede generar un gráfico (Figura N° 46) donde se continua observando la relación entre los puntos pero ahora no va a ser en dos dimensiones porque el programa aplana la representación de los puntos generando una deformación a una línea que está en un solo eje; se redujo un sistema que estaba en dos dimensiones a una sola dimensión.

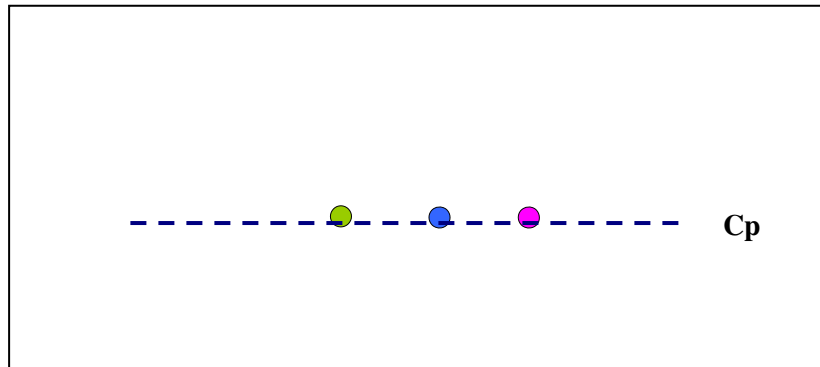


Figura N° 46. Reducción dimensional final, de dos dimensiones a una dimensión

Así mismo, para el caso en estudio, el programa llevó un sistema de siete dimensiones (siete variables) a uno de dos, con el fin de poder observar el comportamiento y tendencia de los puntos dentro del sistema.

Por otra parte, se trabajó un análisis de componentes principales, altamente efectivo para sistemas con pocos datos, en este caso once réplicas y siete variables; además se utiliza para analizar variables continuas y categóricas como la variable “ESTADO” aplicada en el sistema.

De esta manera, la Tabla N° 8 generada del programa STATISTICA 7.0 resume los resultados obtenidos en el análisis de componentes principales del estudio.

Tabla N° 8. Análisis de los componentes principales

ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES							
Análisis de 7 variables x 11 casos							
Tolerancia del análisis 1E-7							
Datos Estándarizados							
	CPR1	CPR2	CPR3	CPR4	CPR5	CPR6	CPR7
Eigenvalues	5,95	0,705	0,187	0,103	0,045	0,008	0,001
Varianza	85,004	10,068	2,673	1,476	0,642	0,117	0,02
Varianza Acumulada (%)	85,004	95,072	97,745	99,221	99,864	99,98	100

Donde: Eigenvalues: Autovalores de varianza del sistema; CPR_i: componente principal i

La elección de los factores que determinó hasta que punto establecer la reducción dimensional se realizó de forma tal que el primero componente principal recoja la mayor proporción posible de la variabilidad original (varianza). Ahora bien, el segundo factor debe acumular la máxima variabilidad posible no recogida por el primero, y así sucesivamente. Del total de factores se eligieron aquéllos que recojan el porcentaje de variabilidad que se considere suficiente.

Como se observó en la tabla N° 8, la varianza acumulada hasta el segundo componente principal fue de 95%, es decir; estos datos representan el 95% del comportamiento real del sistema, valor altamente confiable para un análisis estadístico. Con base a estos resultados se generó la gráfica Biplot del sistema (figura N° 47)

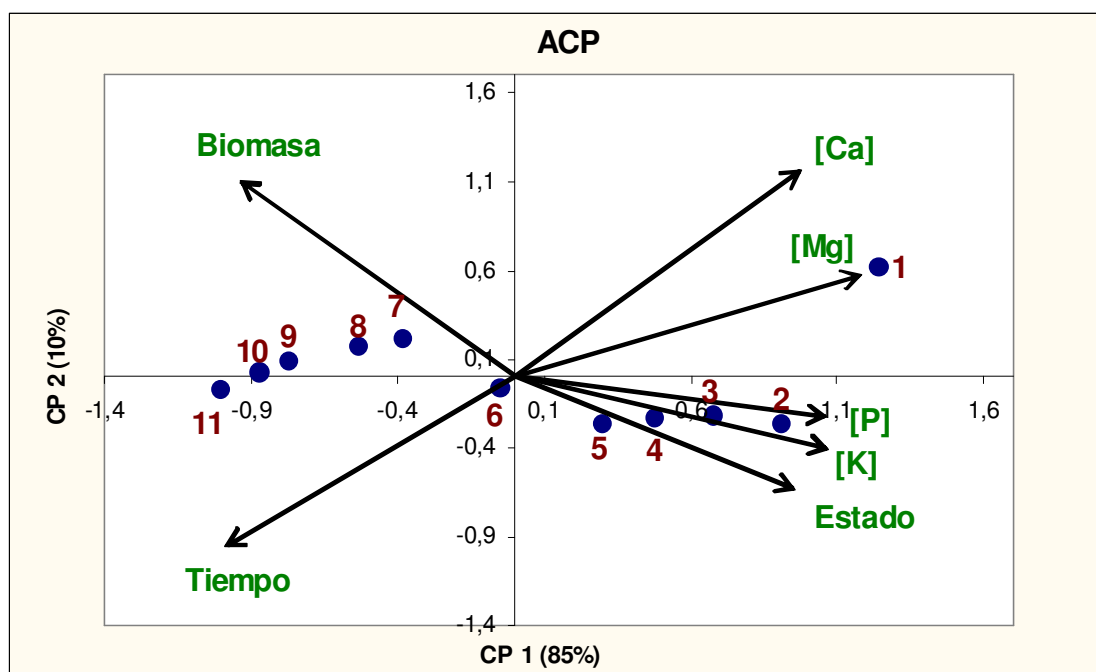


Figura N° 47. Gráfica Biplot del sistema en estudio, con una reducción dimensional de siete a dos dimensiones

Las circunferencias dibujadas en la grafica corresponden a cada una de las réplicas o casos, observándose que la distribución de estos puntos (réplicas) no es

aleatoria y forman claramente una sucesión; esto quiere decir que el cambio en las variables es progresivo y no existen cambios bruscos.

Otra característica importante de la gráfica es los autovectores, los cuales, representan la proyección de las variables originales, y la dirección de la flecha determina el sentido en el cual aumenta la magnitud de la variable. En este caso se observa que los puntos del 1 al 5 que se encuentran en el primer cuadrante (Ca, Mg, P, K) son los que tiene mayor concentración, a diferencia de la variable biomasa que aumenta en sentido contrario (segundo cuadrante). Los puntos que se encuentran en contraposición con los autovectores son los que poseen menor concentración.

Para saber si las variables están bien representadas en el gráfico, el paquete estadístico genera una tabla de significancia estadística (Tabla N° 9) donde se observa en negilla aquellas variables que están estadísticamente bien representadas, ya que el programa obtiene un coeficiente de correlación entre el autovector y el gráfico.

Tabla N° 9. Significancia estadística de las variables estudiadas

Variables	COMPONENTES PRINCIPALES						
	CPR1	CPR2	CPR3	CPR4	CPR5	CPR6	CPR7
tiempo	-0,378	-0,392	0,198	0,566	0,118	0,34	0,463
P	0,403	-0,056	0,029	0,514	0,161	-0,725	0,133
K	0,397	-0,181	-0,087	0,417	-0,617	0,32	-0,38
Ca	0,353	0,59	0,224	-0,007	-0,248	0,211	0,609
Mg	0,398	0,159	-0,256	0,179	0,699	0,452	-0,16
Biomasa	-0,35	0,552	0,468	0,367	0,064	-0,029	-0,463
Estado	0,363	-0,364	0,786	-0,273	0,157	0,08	-0,114

En este caso al tener un 95 % de representación del comportamiento del sistema, se observa la mayoría de los puntos están perfectamente bien representados y sus correlaciones son significativamente estadísticas.

En la tabla N° 9, se puede observar que la variable Fósforo no aparece en resaltada, esto quiere decir que matemáticamente no es significativa; lo cual no significa que no sea relevante dentro del estudio, ya que para este caso en particular,

el sistema biológico depende de la interacción de todas las variables involucradas en el estudio; por ello se decidió no excluir a la variable Fósforo del modelo final

Por otro lado se realizó un análisis adicional para observar que tan relevante es la influencia de la variable tiempo en la construcción del modelo, ya que el tiempo es la única variable que no se puede controlar.

Siguiendo el mismo procedimiento realizado anteriormente se generó la tabla de resultados (Tabla N° 10) y la figura N° 48, donde se detalla que el sistema no contempla siete sino seis variables al excluir la variable tiempo del estudio.

Tabla N°10. Análisis de los componentes principales, excluyendo la variable tiempo.

ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES						
Análisis de 6 variables x 11 casos						
Tolerancia del análisis 1E-7						
Datos Estandarizados						
	CPR1	CPR2	CPR3	CPR4	CPR5	CPR6
Eigenvalues	5,128	0,588	0,18	0,057	0,041	0,006
Varianza	85,468	9,807	3,005	0,945	0,68	0,094
Varianza Acumulada (%)	85,468	95,275	98,28	99,226	99,906	100
Significancia Estadística						
P	0,436	0,045	-0,065	-0,45	0,454	0,629
K	0,433	-0,103	-0,152	-0,631	-0,375	-0,49
Ca	0,365	0,713	0,144	0,219	-0,491	0,221
Mg	0,424	0,251	-0,331	0,373	0,538	-0,468
Biomasa	-0,387	0,569	0,389	-0,431	0,333	-0,281
Estado	0,4	-0,305	0,831	0,161	0,11	-0,133

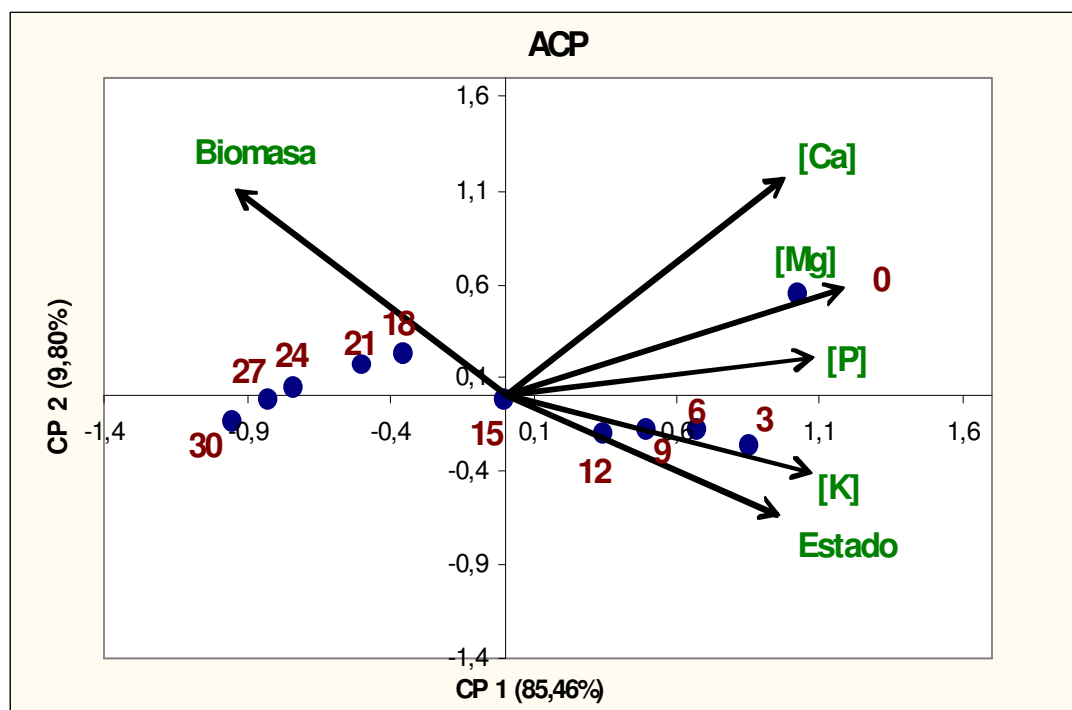


Figura N° 48. Gráfico Biplot del sistema en estudio, con una reducción dimensional de seis a dos dimensiones, generada al excluir la variable tiempo del estudio.

Aún así, la gráfica conserva la misma tendencia y en general los mismos valores de las varianzas que en el análisis anterior, lo que determina la robustez del estudio, y que la variable tiempo no afecta el comportamiento de los puntos, esto quiere decir que más allá del tiempo, el comportamiento del sistema está verdaderamente centrado en las concentraciones de los elementos. Bajo las consideraciones utilizadas con la variable manera se decidió no excluir a la variable tiempo del modelo final, ya que biológicamente para el crecimiento de las plantas el tiempo es una variable altamente representativa.

Por otro parte, como siguiente etapa para la construcción del modelo matemático final, se procedió a calcular los coeficientes de correlación con el fin de determinar la relación entre las variables y generar el modelo definitivo.

A continuación se presenta la matriz de correlación (Tabla N° 11) generada por el programa, donde cabe destacar que la misma corresponde a un análisis de correlación simple, el cual solo contempla la relación entre pares de variables, y no el efecto generado entre múltiples de esas variables respecto a una sola, de igual forma el análisis es totalmente válido y necesario para la obtención del modelo

Tabla N°11. Matriz de Coeficientes de Correlación

	Tiempo	P	K	Ca	Mg	Biomasa	Estado
Tiempo	1,0000	-,8966	-,9555	-,7100	-,9489	,8576	-,8660
	p= ---	p=---	p=---	p=,014	p=---	p=,001	p=,001
P	-,8966	1,0000	,8805	,8149	,9583	-,7718	,7024
	p=---	p= ---	p=---	p=,002	p=---	p=,005	p=,016
K	-,9555	,8805	1,0000	,6279	,8849	-,9337	,8620
	p=---	p=---	p= ---	p=,039	p=---	p=---	p=,001
Ca	-,7100	,8149	,6279	1,0000	,8240	-,3830	,4922
	p=,014	p=,002	p=,039	p= ---	p=,002	p=,245	p=,124
Mg	-,9489	,9583	,8849	,8240	1,0000	-,7623	,7322
	p=---	p=---	p=---	p=,002	p= ---	p=,006	p=,010
Biomasa	,8576	-,7718	-,9337	-,3830	-,7623	1,0000	-,8851
	p=,001	p=,005	p=---	p=,245	p=,006	p= ---	p=,000
Estado	-,8660	,7024	,8620	,4922	,7322	-,8851	1,0000
	p=,001	p=,016	p=,001	p=,124	p=,010	p=---	p= ---

Donde:

P: probabilidad

P* : probabilidad menor a 10E-3 (valor no apreciado por el programa)

Los valores que se encuentran entre dos variables corresponden a los coeficientes de correlación (limitados a un rango de 0-1); y determinan que tan estrecha es la relación entre las variables (mientras mas cerca del valor 1) y si su efecto entre ellas es inverso como se muestra en las celdas color anaranjado o directamente proporcional si el signo es positivo. Es importante notar que este análisis corrobora los resultados obtenidos en el estudio previo de absorción de

nutrientes, donde se observa que a medida de que transcurre el tiempo la concentración de los nutrientes disminuye y la biomasa aumenta.

Un parámetro relevante en este análisis, es la probabilidad (p). Este valor determina si la correlación entre las variables es producto del azar o si posee una significancia estadística. Mientras que el valor de la probabilidad sea menor a 0,05 la correlación es estadísticamente significativa (referencia), mientras que la relación de variables no estadísticamente significativas (valores de p mayores a 0,05) está denotado por las celdas de color verde.

La única forma de analizar el sistema de manera general es recurriendo a un análisis de regresión múltiple, el cual permite apreciar en forma de ecuación el comportamiento general del sistema respecto al caso en estudio.

Ahora bien, una ecuación lineal de regresión de variables tiene la siguiente forma:

$$y = b + \alpha x_1 + \beta x_2 + \gamma x_3 + \dots \delta x_n$$

Donde:

y: es la variable dependiente.

b: representa el punto de corte en el plano.

$x_1, x_2, x_3 \dots x_n$: las variables independientes.

$\alpha, \beta, \gamma \dots \delta$: los coeficientes de correlación de la ecuación.

Para el caso en estudio, la variable dependiente fue denominada “CONDICIÓN” y representa el momento en el cual la planta posee suficiente cantidad de nutrientes (condición 1) o la condición 0, la cual corresponde al momento en que la planta necesita un cambio de medio nutritivo por uno fresco, necesario para que pueda continuar su óptimo desarrollo.

Así mismo, para construir la ecuación final generada por el modelo matemático, se colocaron los datos dentro del programa, y el producto final se muestra en la siguiente tabla de resultados (tabla N°12).

Tabla N° 12. Coeficientes de Regresión, varianzas y errores estándar asociados al Modelo Matemático obtenido del estudio

	B	Error Estándar de B	Nivel de p
Intercepción	8,145327	1,294631	0,003260
tiempo	-0,105049	0,021922	0,008699
P	-0,000386	0,000725	0,622373
K	-0,004023	0,000995	0,015540
Ca	0,003445	0,000768	0,010944
Mg	-0,022043	0,006070	0,022130
Biomasa	-0,147855	0,025979	0,004708
$R^2 = 0,982$			
Varianza del Modelo = 0,001876			
Error Estándar del Modelo = 0,11046			

Donde:

B: coeficiente de regresión.

Error Estándar de B: error asociado al coeficiente de regresión

Nivel de p: prueba de varianza (variables estadísticamente significativas)

R^2 : coeficiente de correlación

En la tabla se observa una vez más que todas las variables a excepción del Fósforo son estadísticamente significativas en concordancia con los análisis previos realizados en este estudio.

Ahora bien, para corroborar la exactitud del modelo, se observó el análisis de la varianza y el factor de correlación como se puede observar en la tabla N° 14 los cuales corresponden a valores de 0,0018 para la varianza, siendo esté, un valor que

predice la efectividad del modelo al ser menor que 0,05 (referencias) y el factor de correlación R^2 con un valor de 0,98 lo que dice que el modelo ajusta perfectamente los datos al estar este valor muy cercano a 1.

A partir de los datos correspondientes a los coeficientes de regresión extraídos de la tabla se construyó la ecuación definitiva desarrollada para este sistema, cuyos límites superior, inferior y su punto de quiebre se explican posteriormente.

$$\begin{aligned} \mathbf{Ci = 8,145 - 0,105 \cdot ti - 3,86 \times 10^{-4} \cdot Pi - 4,02 \times 10^{-3} \cdot Ki + 3,45 \times 10^{-3} \cdot Cai} \\ \mathbf{- 2,20 \times 10^{-2} \cdot Mgi - 0,148 \cdot Bmi} \end{aligned}$$

Donde:

Ci : representa la tendencia al estado satisfactorio (estado 1) o al estado deficiente de nutrientes (estado 0).

Ti: tiempo (días),

Pi: concentración de Fósforo (ppm)

Ki: concentración de Potasio (ppm)

Cai: concentración de Calcio (ppm)

Mgi: concentración de Magnesio (ppm)

Bmi: Biomasa para cada momento o caso en estudio (g)

La ecuación obtenida, es una ecuación predictiva que puede ser utilizada para evaluar los cambios en alguna de las variables propuestas en esta investigación, con el fin de observar los efectos en la planta y su correspondencia con los valores numéricos obtenidos mediante la aplicación de la ecuación; es decir comparar los resultados teóricos con los experimentales para un instante de tiempo determinado.

Un aspecto importante a considerar es la determinación de los límites críticos del modelo obtenido, por ello se establecieron como límite superior el valor de condición igual a la unidad (1), como límite inferior aquellos valores

correspondientes a la condición igual a cero (o) y como punto de quiebre, es decir aquel valor de partida para decidir en que condición se encuentra el análisis, se estableció el valor de condición igual a 0,5.

Un ejemplo de la aplicación del modelo se explica a continuación:

Se desea conocer la condición del medio de cultivo dentro del Biorreactor de Inmersión Temporal, cuyo análisis de nutrientes y biomasa para los tiempos correspondientes a los días 3 y 24 del estudio son:

tiempo (días)	P (ppm)	K(ppm)	Ca (ppm)	Mg (ppm)	Biomasa (g)
3	533,40	753,60	221,20	136,30	9
24	10,12	250,21	137,52	60,05	25,2

Para el día 3 se tiene que:

$$\text{CONDICIÓN} = 8,145 - 0,105 \times 3 \text{ días} - 3,86 \times 10^{-4} \times 533,40 \text{ ppm} - 4,02 \times 10^{-3} \times 753,60 \text{ ppm} + 3,45 \times 10^{-3} \times 221,20 \text{ ppm} - 2,20 \times 10^{-2} \times 136,30 \text{ ppm} - 0,148 \times 9 \text{ g}$$

$$\text{CONDICION} = \mathbf{1,03}$$

Quiere decir que como el valor de condición tiende a la unidad (1), la planta aún cuenta con suficiente cantidad de medio nutritivo disponible para continuar con su proceso metabólico.

Ahora bien, para el día 24, se tiene:

$$\text{CONDICIÓN} = 8,145 - 0,105 \times 24 \text{ días} - 3,86 \times 10^{-4} \times 10,12 \text{ ppm} - 4,02 \times 10^{-3} \times 250 \text{ ppm} + 3,45 \times 10^{-3} \times 137,52 \text{ ppm} - 2,20 \times 10^{-2} \times 60,05 \text{ ppm} - 0,148 \times 25,2 \text{ g}$$

$$\text{CONDICION} = \mathbf{0,04}.$$

Como el valor de la condición tiende a cero (0) La planta necesita de un cambio de medio debido al agotamiento del mismo.

En conclusión; para valores de condición mayores a 0,5 la planta aún posee suficiente cantidad de nutrientes para continuar su desarrollo, pero si los valores obtenidos en un instante particular son menores a este punto de quiebre, es necesario cambiar a un medio nutritivo fresco.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

En este capítulo se plantean todas aquellas conclusiones generadas en cada tema de estudio para el desarrollo de la investigación.

Estudio del Sistema in vitro tradicional.

- Se demostró que La tendencia de las Curvas de Crecimiento Sigmoidal para Sistemas in vitro en Medio Semisólido es la misma, independientemente del peso o tamaño inicial del brote.
- La capacidad de absorción de los nutrientes depende de manera significativa del tamaño inicial del brote.

Diseño y Evaluación del Biorreactor de Inmersión Temporal Prototipo.

- El sistema diseñado permite garantizar que el régimen de flujo de Aire a través del equipo sea laminar. Lo que evita el deterioro de los brotes.
- Los Filtros de Aire diseñados, a base de partículas de carbón activado de tamaño mayor que 200 mesh y dispuestas como mezcla aleatoria de diversas granulometrías, son más efectivos para impedir el paso de bacterias, esporas y hongos al interior del Biorreactor.
- La utilización de Filtros de Aire, incrementa la transferencia de oxígeno y asegura la eliminación de gases tóxicos.

- La biomasa de la planta Píneo Gigante dentro del Biorreactor en el periodo de máximo crecimiento (18 a 25 días) es apreciablemente mayor a la que se obtiene en el Sistema Tradicional.
- El Biorreactor de Inmersión Temporal diseñado, construido y evaluado en el marco de este estudio, es pionero en el país.
- La tendencia de la curva de crecimiento sigmoideal de la planta obtenida dentro del Biorreactor prototipo, es similar a la generada a en el Sistema in vitro tradicional en Medio Semisólido.
- Para los sistemas de propagación in vitro estudiados (Tradicional y Biorreactor) la planta evaluada sufre un fenómeno de estrés abiótico. Sin embargo, la pérdida de masa por la deshidratación resultante de dicho fenómeno disminuye considerablemente mediante la utilización del Biorreactor diseñado en este trabajo.

Curva de Absorción de Nutrientes.

- La Curva de Absorción de Nutrientes en el Biorreactor permite conocer con precisión los requerimientos nutritivos de la planta durante su ciclo de crecimiento.
- Se determinó que el Potasio es el nutriente que es absorbido con mayor rapidez por la planta en estudio, mientras que el Magnesio es el que se absorbe con mayor dificultad.

- Se determinó que la cinética de la Absorción de nutrientes presenta dos puntos de máxima velocidad, correspondientes a la deshidratación resultante del fenómeno de estrés abiótico.

Modelo Matemático.

- El análisis estadístico fue indispensable para conocer las relaciones entre variables estudiadas y su comportamiento dentro del sistema.
- El Modelo Matemático desarrollado en conjunto con los datos generados permitieron reproducir con un 95% de confiabilidad el comportamiento real del sistema.

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES

- Existen diversas opciones en cuanto a materiales al momento de diseñar y construir los filtros de aire; por ello se debe conocer a fondo las características en cuanto a tipo, tamaño y volumen de las partículas a filtrar.
- En la construcción de futuros Biorreactores, ya sea a nivel experimental o a escala comercial es recomendable la utilización de materiales resistentes a cambios bruscos de temperatura y presión.
- Se recomienda mejorar la isothermicidad del cuarto climático donde se lleven a cabo futuros estudios Fitocinéticos.
- Con el fin de cuantificar la proporción en que son absorbidos los diferentes nutrientes, se propone realizar un análisis del tejido vegetal.
- En futuros estudios se recomienda considerar al Nitrógeno, como nutriente, entre el grupo de variables requeridas para la construcción del Modelo Matemático.
- Es necesario el desarrollo de protocolos o medidas que impidan o disminuyan los riesgos de contaminación dentro del Biorreactor.
- Es recomendable estudiar el efecto de la Frecuencia y Tiempo de Inmersión conjuntamente con la Aireación, sobre el crecimiento de la planta dentro del Biorreactor.
- Es necesario realizar un mayor número de pruebas para incrementar la robustez del modelo matemático.

- Estudiar el efecto de una restitución selectiva de nutrientes.
- Realizar un estudio comparativo del momento en el cual la planta en ambos sistemas necesita la renovación de medio nutritivo.
- Se propone estudiar la aplicabilidad del modelo matemático obtenido en este trabajo, en Biorreactores comerciales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Echenique H, Rubinstein C. (2002). **Biotecnología y Mejoramiento Vegetal**. Ediciones INTA.
Disponible: <http://www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/biotec.htm>.
[Consulta: 2005, Noviembre, 25]
2. Mateo, J. (1993). **Biotecnología, agricultura y alimentación**. Editorial Mundi-Prensa. Madrid.
3. Cronquist, A. (1981). **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. Columbia Univ Press, New York.
4. Martínez, G. **Los mil usos de las Musáceas y plantas afines**. Revista de difusión de tecnología agrícola y pesquera del FONAIAP.
Disponible: <http://www.ceniap.gov.ve/bdigital/fdivul/fd62/musa.html>.
[Consulta: Noviembre, 2005].
5. Salisbury, F. (1994). **Fisiología Vegetal**. Grupo Editorial Iberoamérica México.
6. Bull, A et al. (1982). **Biotechnology. International Trends And Perspectives**. OECD Press. Paris.
7. Mercuk, J. **Programa de monografías científicas. Microbiología Industrial**.
Disponible: <http://www.biologia.edu.ar/microind/cultivo%20y%20biorreactores.htm>
[Consulta: Noviembre, 2005].

:

8. Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biologica. (2000). **Protocolo de Cartagena Sobre Seguridad de la Biotecnología. Montreal.** Disponible: <http://www.biodiv.org/doc/legal/cartagena-protocol-es.pdf>.

9. Etienne V, Berthouly M. (2002). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** Publisher: Springer Netherlands. Volume 69, Number 3 [libro en línea]. Disponible: [http://www.springerlink.com/\(1zqwaa2041esxfov5waftois\)/app/home/contribution.asp?referrer=parent&backto=issue,2,10;journal,45,245;linkingpublicationresults,1:100327,1](http://www.springerlink.com/(1zqwaa2041esxfov5waftois)/app/home/contribution.asp?referrer=parent&backto=issue,2,10;journal,45,245;linkingpublicationresults,1:100327,1). [Consulta: 2005, Octubre 16].

10. Ministerio de Agricultura de Chile. (2005). **Con biotecnología vegetal aceleran reproducción de plantas.** Disponible: <http://www.minagi.gob.cl/noticias/detallenoticia.php?noticia=165> [Consulta: 2005, Octubre 16].

11. Meira Z (2000). Bioreactor Technology for Plant Micropropagation. Agricultural Botany and the Warburg Center for Biotechnology in Agricultura The Hebrew University of Jerusalem. Israel. [Libro en línea] Disponible: http://media.wiley.com/product_data/excerpt/43/04713337/0471333743.pdf. [Consulta: 2005, Octubre 25].

12. Muñoz, L. **Implementación del sistema RITA en la propagación a gran escala y el la embriogénesis somática de yuca.** Disponible: http://prgaprogram.org/webciat/biotechnology/pdf/poster_rescobar_rita.pdf. [Consulta: 2005, Septiembre 30]

13. Velasco, A. **Evaluación de tecnologías de Remediación para suelos contaminados con metales.** (2004).
 Disponible: http://www.ine.gob.mx/cenica/download/metales_ei2004.pdf.
 Consulta: [2006, Abril 27]. Biotechnical Center (BTC) web side.

14. **Do you know Bio construction?** Disponible:
<http://www.bioreactors.net/eng/construction.html>.
 [Consulta: 2006, Abril 17].

15. Millipore. **Bioprocess Aseptic Processing.**
 Disponible: <http://www.millipore.com/markets/bioprocess.nsf/docs/aseptic>
 [Consulta: 2006, Abril 28].

16. McCabe, W. (1991). **Operaciones Unitarias en Ingeniería Química.**
 McGraw Hill. España.

17. Aracil, J. (1995). **Dinámica de Sistemas.** Editorial Alianza , S. A. España.

18. Milton, S. (1994). **Estadística para Biología y Ciencias de la Salud.**
 Editorial McGraw- Hill Interamericana. España.

19. Hernández, S. (1959). **La Estadística aplicada a las ciencias Biológicas.**
 Editorial Grafos S.A. Caracas.

20. Murashige T y Skoog F. (1962). **Physiol. Plant.** 15, 473-97.

21. GAISA Grupo Americano de Intercambio S.A. **PRODUCTOS: Carbón Activado.** Disponible: <http://www.gaisa.com.ar>. [Consulta:2006, Agosto 30]

22. Kathrine, A. (2005). **Bioreactor desing for propagation of somatic embryos**. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 81:265-276.

23. Abascal, E.(1989). **Métodos Multivariantes para la Investigación Comercial. Teoría, aplicaciones y progamación BASIC**. Editorial ARIEL S.A. España.

24. Matsumoto, K. (2004) **Comparison of temporary and permanent immersion systems for the in vitro culture of bananas. Low cost options for tissue culture technology in developing countries**. IAEA-TECDOC-1384

25. PYREX. (2006).Artículo en línea. Disponible:
http://64.233.179.104/translate_c?hl=es&sl=en&u=http://en.wikipedia.org/wiki/Pyrex&prev=/search%3Fq%3Dpyrex%26hl%3Des%26lr%3D%26rls%3Dcom.microsoft:en-US . [Consultado: 2006, septiembre 2006]

26. González, A. (2006). Tesis de Grado. **Diseño de un Biorreactor de Inmersión Temporal para la propagación in vitro de especies vegetales**. Venezuela

27. Albarrán, J. (1999). **Influencia de los factores químicos y físicos sobre la regeneración de embriones somáticos de COFFEA ARABICA en Biorreactor Simplificado**. Centro Agronómico Tropical de Investigación Y Enseñanza (CATIE).Costa Rica.

28. Espinoza, J. (1995). **Fertilización del Platano en Densidades Altas**. Instituto de la Potasa y el Fósforo (INPOFOS). Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, (CORPOICA). Colombia.

29. Terradez, M. Análisis de Componentes Principales.

Disponible:

http://www.uoc.edu/in3/emath/docs/Componentes_principales.pdf

30. Colmenarez, M y Jiménez, C. (2003). **Multiplicación in vitro Musa spp, mediante sistema de inmersión temporal.** Venezuela.

31. Escalona, M. (2005). **Optimization of plantain (musa AAB) micropropagation by temporary immersion system.** Departament of plant, faculty of bioscience Engineering. productionBelgica.

32. El Etileno. Catalytic generators, LLC. Disponible en:

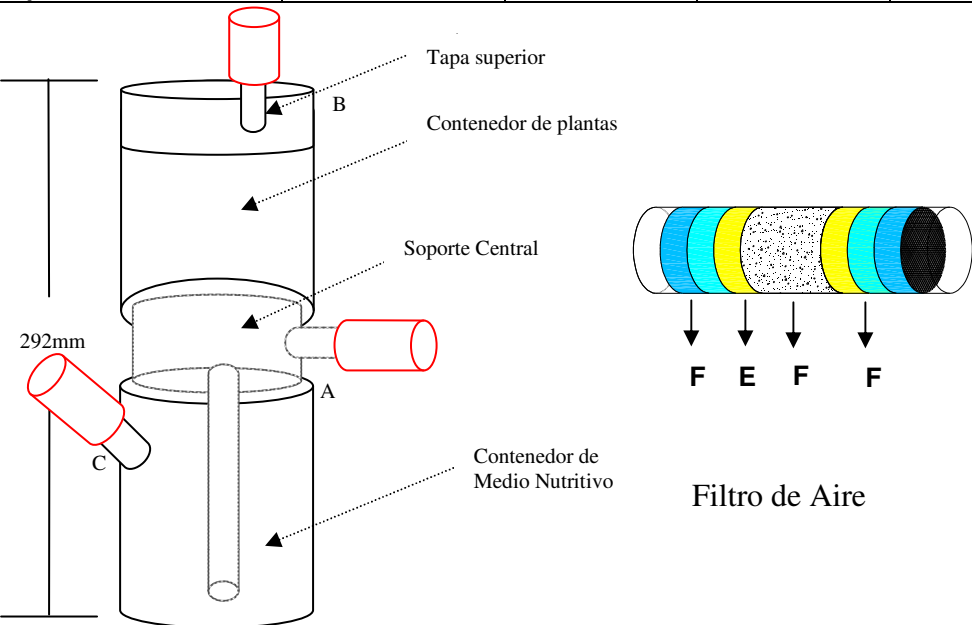
<http://www.catalyticgenerators.com/loshecdelet.html>.

[Consultado: Noviembre 2006]

ANEXOS

Hoja de Especificaciones del Biorreactor de Inmersión Temporal prototipo

Equipo: Biorreactor de Inmersión Temporal a Escala Laboratorio		 Instituto Nacional de Investigaciones Agícolas		
GENERAL		DETALLES MECÁNICOS		
SERVICIO	Recipiente para Crecimiento Vegetal	BOQUILLAS		
FLUIDOS	Medio Nutritivo y Aire	IDENTIFICACIÓN	TAMAÑO (mm)	SERVICIO
DIÁMETRO (mm)	64	A	5	Entrada de aire
ALTURA (mm)	292	B	5	Salida de aire
NIVEL DE LÍQUIDO máx/ min (cm³)	283 / 85	C	5	Muestreador
Peso del Equipo (kg)		MATERIAL (ES) DE CONTRUCCIÓN		
CONDICIONES DE PROCESO		Recipiente contenedor	Vidrio Borosilicato	Resistencia Térmica
Presión de Operación (barg)	0.2	Tapa Intermedia	Aluminio	AL-6063
Temperatura de operación (°C)	27	Filtro de Aire		
Viscosidad de aire (N·s/m²)	1,86x10 ⁻⁵	Identificación	Material	Tamaño de poro
Gravedad Específica (m/s²)	9,8			
Tiempo de Inmersión (min)	5	D	Carbón activado	< 18µm
Frecuencia de Inmersión (h)	4	E	Telas sintéticas	< 20µm
Flujo de Aire (m³/s)	20,53E-7	F	Fibras sintéticas	< 40µm



Anexo N° 1. Composición de cuatro medios básicos (MB) para el cultivo *in vitro* de tejidos MS= Murashige et al ⁽²⁰⁾, B5= Gamborg et al., N6= Chu et al. Wh= White

Componentes	Contenidos en cada medio (mg/L)			
	MS	B5	N6	Wh
NH ₄ NO ₃	1650	-	-	-
KNO ₃	1900	2500	2830	80
KH ₂ PO ₄	170	-	400	-
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	150	166	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	250	185	7.37
(NH ₄) ₂ .SO ₄	-	134	463	-
Ca(NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	-	-	-	288
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	-	150	-	19
Na ₂ SO ₄	-	-	-	200
KI	0.83	0.75	0.80	0.75
H ₃ BO ₃	6.20	3.00	1.60	1.50
MnSO ₄ .H ₂ O	-	10.00	-	-
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.30	-	4.40	6.65
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60	2.00	1.5	2.67
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25	-	-
H ₂ MoO ₄	-	-	-	0.001
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.03	0.03	-	0.01
Fe ₂ (SO ₄) ₃	-	-	-	2.50
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.80	27.80	27.85	-
Na ₂ EDTA	37.30	37.30	37.25	-
CoCL ₂ .6H ₂ O	0.03	0.03	-	-
Glicina	2.00	-	2.00	3.00
Tiamina-HCL	0.10	10.00	1.00	0.10
Piridoxina-HCL	0.50	1.00	0.50	0.10
Ácido Nicotínico	0.50	1.00	0.50	0.50
Mioinositol	100.00	100.00	-	100.00
Sacarosa	30.00	20.00	50.00	20.00
PH	5.7	5.5	5.8	5.5

Anexo N°2 Composición del medio de cultivo (P4) para la multiplicación *in vitro* de Musáceas

Compuesto	Cantidad (ml/L)
Macronutrientes (MS)	50
KH ₂ PO ₄	230(mg/l)
Micronutrientes (MS)	20
Solución de Hierro (Fe-EDTA) (MS)	5
Mio-Inositol (MS)	5
Ácido Nicotínico (MS)	5
Piridoxina (MS)	5
Tiamina	2
Glicina (MS)	5
Ácido Ascórbico	10
Sacarosa	30 (g/L)
AIA	180 (ml/L)
BA	22.5 (mg/L)
Gelrite	2 (g/L)

Nota: Se debe mantener el PH en un rango de 5.7-5.8

AnexoN° 3. Lista de Equipos y materiales utilizados para el proyecto de cultivo *in vitro* de especies vegetales

INSTRUMENTAL O EQUIPO
Beaker de 1000 ml
Pipetas de diversas capacidades
Plancha eléctrica con agitador magnético
Cámara reflujo Laminar
Autoclave
Cápsulas de Petri
Pinzas
Bisturí
Mechero
Frascos de vidrio para cultivo (300 ml de capacidad)
Carrito de metal con ruedas para el transporte de material y frascos
Estantería para la colocación de los frascos
Sistema de enfriamiento
Bombillos de luz fluorescente
Balanza Analítica

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Aclimatización: Adaptación de un organismo a un ambiente que le provoca algún tipo de cambio fisiológico.

Autótrofo: Organismo capaz de sintetizar todos los componentes que necesita a partir de sustancias inorgánicas existentes en su ambiente.

Biolixiviación: Uso de microorganismos para solubilizar compuestos, de manera que sus elementos puedan ser extraídos a partir de un material, cuando el agua u otro solvente son filtrados a través de estos

Biomasa: Toda la materia orgánica que proviene de la fotosíntesis. Incluye a los árboles, plantas y los residuos asociados, deshechos animales, industriales, y municipales (papel). También, la masa total de organismos vivos que hay en una unidad de área (por ejemplo, en un fermentador

Biorreactor: Tanque en el que los microorganismos o células llevan a cabo los procesos biológicos, o donde se realiza la fermentación, o donde se cultivan las células para la producción de proteínas recombinantes o para la explotación comercial de sus metabolitos.

Biorremediación: Uso de agentes biológicos con el fin de tratar suelos y aguas contaminadas por sustancias tóxicas.

Biotecnología: Toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos en usos específicos

Callo: Masa de células indiferenciadas (tejido vegetal)

Cámara de flujo laminar: Área de trabajo, mantenida estéril por el flujo continuo, no turbulento de aire estéril.

Célula Madre: Célula inmadura que tiene el potencial de generar nuevas células madre y diferenciarse en diversos tipos celulares. Los embriones tempranos contienen células madre que pueden transformarse en cualquier tipo celular. La médula ósea contiene células madre capaces de diferenciarse en los diferentes tipos de células sanguíneas.

Células Sexuales (gametos): Células especializadas haploides que al unirse forman el huevo o cigoto. En los humanos las gametas son el espermatozoide (masculino) y el óvulo (femenino).

Células Somáticas: Todas las células de un organismo, excepto las sexuales (espermatozoides y óvulos).

Cera Epicuticular: Depósitos de cera sobre la cutícula de hojas de plantas adaptadas a medio árido (xerófitas).

Cultivo de Tejidos: Procedimientos utilizados para mantener y crecer células y tejidos vegetales o animales y órganos vegetales (tallos, raíces, embriones) en cultivo aséptico (*in vitro*).

Curva de Crecimiento Sigmoidal: Es una función matemática que representa una variable que se incrementa primero lentamente luego se acelera y finalmente se desacelera, eventualmente crece muy poco o declina

Cutícula: Secreción orgánica de las células epidérmicas vegetales que tiene la función de disminuir las pérdidas no controladas de agua en los tejidos frescos. Esta compuesta a base

de sustancias hidrofóbicas como la cutina y las ceras. A veces esta reforzada por el exterior con acumulaciones de cera pura a la que se denomina cera epicuticular.

Diploide: Organismo o célula que posee dos juegos completos de cromosomas homólogos y por lo tanto dos copias (alelos) de cada gen.

Embriogénesis: Proceso mediante el cual se desarrolla un embrión a partir de una célula fertilizada o de forma asexual desde un grupo de células somáticas (embriogénesis somática).

Esterilización: procedimiento para la eliminación de microorganismos.

Estrés Abiótico: Alteración en el metabolismo celular, inducido por factores abióticos ambientales que afectan la fisiología y desarrollo de las plantas.

Explante: porción de tejido u órgano que se separa de la planta para iniciar el cultivo.

Factores abióticos: Condiciones ambientales que promueven el estrés abiótico de las plantas, entre los que se encuentran: Luz (exceso o falta), Temperatura extremas (altas o bajas), Agua (falta o exceso), Altas concentraciones de iones metálicos Al^{+3} , Pb^{+2} no metálicos Na^{+} y Contaminantes atmosféricos O_3 , NO , N_2O , CO .

Fermentación: Conversión biológica anaeróbica de las moléculas orgánicas, generalmente hidratos de carbono, en alcohol, ácido láctico u otros compuestos simples. En el sentido amplio, el término se refiere también a bioprocesos que ocurren a gran escala, como la producción de moléculas a partir de microorganismos.

Fotoperíodo: Longitud, generalmente en horas, del período de luz del día.

Fungible: Que se consume con el uso, Se consideran materiales fungibles: Componentes electrónicos y mecánicos no inventariables, gases, productos químicos, materiales brutos y semielaborados mecánicos y otros materiales varios de uso general en laboratorios.

Germoplasma: La variabilidad genética total, representada por células germinales, disponibles para una población particular de organismos.

Haploide: Célula u organismo que tiene un sólo miembro de cada par de cromosomas homólogos y por lo tanto una copia (alelo) de cada gen. Las gametas son haploides.

***In vitro*:** literalmente en el vidrio, en el tubo de ensayos del laboratorio, investigado y manipulado fuera del organismo vivo.

Lignina: constituyente típico de la pared secundaria, formado por derivados de p-hidroxifenil-propano.

Lignificada(o): membranas celulares en las cuales se ha producido el fenómeno de la lignificación. La lignificación consiste en la deposición de capas de lignina sobre la membrana celular hasta que se vuelve rígida.

Macronutrientes: Elementos químicos inorgánicos, como el nitrógeno, potasio, calcio, fósforo, magnesio y azufre, que se necesitan en grandes cantidades en el crecimiento de un organismo.

Medio de cultivo: cualquier medio nutritivo apto para el crecimiento vegetativo; medio nutritivo artificial y aséptico para el cultivo *in vitro*.

Meristemo(a): Todo tejido cuyas células crecen y se multiplican. El tejido meristemático es un tejido embrional, del que se forman otros tejidos adultos y diferenciados de manera diversa. Los meristemas **Apicales** son los responsables de la formación del cuerpo primario de la planta. Se encuentran en los ápices de raíces y tallos, principales y laterales.

Micronutrientes: Elementos químicos inorgánicos que se necesitan sólo en muy pequeñas cantidades, o trazas, para el crecimiento de un organismo (ejemplo: Hierro, cobre, cinc, etc.).

Microorganismos: Organismos microscópicos, generalmente virus, bacterias, algas, hongos y protozoarios.

Micropropagación: Propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, empleando un medio de cultivo nutritivo adecuado.

Nutrientes: Son las sustancias presentes en los alimentos y que resultan útiles para el metabolismo. Corresponden a los grupos genéricamente denominados proteínas, hidratos de carbono, grasas, vitaminas, sustancias minerales y agua.

Organogénesis: técnica de reproducción clonal; regeneración de una planta a partir de un órgano

Pared Celular: Capa externa y rígida de las células de las plantas superiores, algunos protistas y la mayoría de las bacterias. Las paredes celulares vegetales están constituidas principalmente de celulosa, aunque también presentan hemicelulosa, pectinas y pueden tener lignina.

Regeneración: Cuando se refiere al cultivo de tejidos vegetales, consiste en la formación de las partes aéreas o embriones a partir de un callo o una suspensión de células, permitiendo la recuperación de una planta completa.

Rusticación: Es adaptar las plantitas obtenidas al ambiente en el que finalmente crecerán.

Vástago: Rama tierna de un árbol o planta

Yemas Axilares: Estructuras encargadas del crecimiento del tallo, hojas y ramificaciones. Se encuentran en la unión de las hojas con el tallo.