

UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR
FACULTAD DE INGENIERÍA
LICENCIATURA EN INGENIERÍA QUÍMICA INDUSTRIAL

**"DISEÑO, CONSTRUCCIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA DE BIORREACTORES DE
INMERSIÓN TEMPORAL EN PARALELO PARA LA PROPAGACIÓN IN VITRO DE LA ORQUÍDEA
GUARIANTHE AURANTIACA A ESCALA LABORATORIO"**

TESIS DE GRADO

MARÍA CLARISSA ARAGÓN ARMAS
CARNET 10131-13

GUATEMALA DE LA ASUNCIÓN, NOVIEMBRE DE 2018
CAMPUS CENTRAL

UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR
FACULTAD DE INGENIERÍA
LICENCIATURA EN INGENIERÍA QUÍMICA INDUSTRIAL

**"DISEÑO, CONSTRUCCIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA DE BIORREACTORES DE
INMERSIÓN TEMPORAL EN PARALELO PARA LA PROPAGACIÓN IN VITRO DE LA ORQUÍDEA
GUARIANTHE AURANTIACA A ESCALA LABORATORIO"**

TESIS DE GRADO

TRABAJO PRESENTADO AL CONSEJO DE LA FACULTAD DE
INGENIERÍA

POR
MARÍA CLARISSA ARAGÓN ARMAS

PREVIO A CONFERÍRSELE
EL TÍTULO DE INGENIERA QUÍMICA INDUSTRIAL EN EL GRADO ACADÉMICO DE LICENCIADA

GUATEMALA DE LA ASUNCIÓN, NOVIEMBRE DE 2018
CAMPUS CENTRAL

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR

RECTOR: P. MARCO TULIO MARTINEZ SALAZAR, S. J.
VICERRECTORA ACADÉMICA: DRA. MARTA LUCRECIA MÉNDEZ GONZÁLEZ DE PENEDO
VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y PROYECCIÓN: ING. JOSÉ JUVENTINO GÁLVEZ RUANO
VICERRECTOR DE INTEGRACIÓN UNIVERSITARIA: P. JULIO ENRIQUE MOREIRA CHAVARRÍA, S. J.
VICERRECTOR ADMINISTRATIVO: LIC. ARIEL RIVERA IRÍAS
SECRETARIA GENERAL: LIC. FABIOLA DE LA LUZ PADILLA BELTRANENA DE LORENZANA

AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA

DECANA: MGTR. KAREN GABRIELA MORALES HERRERA DE ZUNIGA
VICEDECANO: MGTR. OSMAN CARRILLO SOTO
SECRETARIA: MGTR. MARYA ALEJANDRA ORTIZ PATZAN
DIRECTOR DE CARRERA: DR. MARIO RENE SANTIZO CALDERON

NOMBRE DEL ASESOR DE TRABAJO DE GRADUACIÓN

MGTR. RYAN RENE RAMIREZ RODAS

TERNA QUE PRACTICÓ LA EVALUACIÓN

ING. JOSÉ ALBERTO BELTETHÓN ESCOBAR

ING. JOSE IGNACIO ARAUZ AVILA

ING. JUAN CARLOS GARCÍA CERÓN



Orden de Impresión

De acuerdo a la aprobación de la Evaluación del Trabajo de Graduación en la variante Tesis de Grado de la estudiante MARÍA CLARISSA ARAGÓN ARMAS, Carnet 10131-13 en la carrera LICENCIATURA EN INGENIERÍA QUÍMICA INDUSTRIAL, del Campus Central, que consta en el Acta No. 02251-2018 de fecha 2 de octubre de 2018, se autoriza la impresión digital del trabajo titulado:

"DISEÑO, CONSTRUCCIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA DE BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL EN PARALELO PARA LA PROPAGACIÓN IN VITRO DE LA ORQUÍDEA GUARIANTHE AURANTIACA A ESCALA LABORATORIO"

Previo a conferírsele el título de INGENIERA QUÍMICA INDUSTRIAL en el grado académico de LICENCIADA.

Dado en la ciudad de Guatemala de la Asunción, a los 6 días del mes de noviembre del año 2018.

MGTR. MARYA ALEJANDRA ORTIZ PATZAN, SECRETARIA
INGENIERÍA
Universidad Rafael Landívar



Guatemala, 16 de agosto de 2018

Magister
Alejandra Ortiz
Secretaria de Facultad
Facultad de Ingeniería

Estimada Mgtr. Ortiz:

Por este medio me es grato saludarle y desearle toda clase de éxitos en sus labores diarias.

El motivo de la presente es para informarle que he revisado el informe final del Trabajo de Graduación titulado: **“DISEÑO, CONSTRUCCIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA DE BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL EN PARALELO PARA LA PROPAGACIÓN IN VITRO DE LA ORQUÍDEA GUARIANTHE AURANTIACA A ESCALA LABORATORIO”**. Del estudiante **María Clarissa Aragón Armas** quien se identifica con número de carnet. **10131-13**. Después de haber revisado el informe final y de acuerdo con los requerimientos establecidos por la Facultad de Ingeniería de la Universidad Rafael Landívar doy como aprobado dicho trabajo.

Sin otro particular, me suscribo de Ud.

Atentamente,

A handwritten signature in black ink, enclosed within a hand-drawn oval. The signature is stylized and appears to read 'Ryan René Ramírez Rodas'.

Ing. Ryan René Ramírez Rodas
Asesor

Agradecimientos

A la Universidad Rafael Landívar y sus catedráticos por ser mi casa de estudio así como brindarme las herramientas necesarias para enfrentar los problemas como profesional y por apoyarme a lo largo de mi formación profesional.

A Licda Carolina Méndez por ser mi acompañante de beca a lo largo de mi formación profesional, por aconsejarme y apoyarme en cada uno de mis años de estudio.

Al Instituto de investigación y proyección sobre ambiente natural y sociedad (IARNA) por abrirme sus puertas a la investigación como mi primer trabajo formal, principalmente a Dr. Raúl Maas y a Mgtr. Maria Mercedes Lopez-selva, por aceptarme como asistente de investigación en el laboratorio de Biotecnología y permitirme culminar con mis estudios, por enseñarme la importancia del trabajo, por sus consejos y apoyo durante la realización de la tesis y compartir su conocimiento.

A mi grupo de estudio Lisbeth Hernández, Xinia Velásquez y Raúl Perdomo por las noches de desvelo, por apoyarnos para culminar nuestros estudios y cumplir nuestras metas, por ser mis mejores amigos en la Universidad, por los buenos momentos y las experiencias a lo largo de la carrera.

Al Colegio Liceo Guatemala, por brindarme las herramientas necesarias para superarme y apoyarme a seguir adelante en la universidad otorgándome la Beca Loyola.

Dedicatoria

A Dios

Por cada una de las bendiciones que recibo de Él y permitirme finalizar una nueva etapa en mi formación profesional. Por ayudarme en cada una de mis necesidades para mi formación profesional y espiritual. Por nunca dejarme caer en los momentos difíciles y enriquecer mi vida con momentos valiosos.

A mis padres

José Aragón y Clara Armas, por acompañarme a cumplir cada una de mis metas, siendo mis mayores ejemplos a seguir, por apoyarme incondicionalmente a superarme, por cuidarme, amarme y por su esfuerzo para brindarme la mejor educación para ser una buena hija y profesional.

A mis hermanos

Juan, Carmen y Alejandra, por su constante apoyo para la realización de mis actividades y por ayudarme a solucionar los problemas que enfrento día a día, por compartir alegrías y llenar mi vida de recuerdos agradables, por estar ahí en las buenas y en las malas, por ser los mejores hermanos.

A mis abuelitas

Sara Hidalgo y Evelia Lemus, por animarme, por ser un gran ejemplo para mí, por su cariño y su cercanía, por siempre acompañarme, por pasar tiempo de calidad al hablar sobre sus experiencias de vida, por aconsejarme y por enseñarme el valor del trabajo duro para tener una vida feliz y familia unida.

A mi familia

Mis primos y tíos, por siempre estar atentos en mis actividades, por apoyarme y alentarme con su ejemplo de vida y por sus muestras de cariño a lo largo de mi vida.

Resumen Ejecutivo

El presente trabajo tuvo por objetivo diseñar, construir e implementar un sistema de biorreactores de inmersión temporal en paralelo para la propagación in vitro de la orquídea *Guarianthe aurantiaca* a escala laboratorio. Se implementó tecnología que permita optimizar el cultivo in vitro de orquídeas empleando menor cantidad de recursos.

Para ello, se diseñó el sistema de inmersión temporal, sumergiendo al explante durante un tiempo determinado en un medio de cultivo rico en nutrientes que permiten su desarrollo. Se utilizó el medio de cultivo MS (Murashige & Skoog). Se planteó el protocolo para la esterilización tanto del medio como del sistema de inmersión temporal. El experimento se hizo en 12 biorreactores durante 28 días. El tiempo de inmersión fue de dos minutos dos veces al día. Al finalizar se obtuvo el rendimiento del SIT respecto al método tradicional evaluando altura de explantes, número de hojas y número de raíz.

El diseño fue un elemento de dos contenedores integrados para realizar la inmersión y conectados en paralelo, con filtros de venteo de PTFE de $0.2\mu\text{m}$ y una presión de alimentación de aire de 0.012MPa . Se validó de la hipótesis que establecía una diferencia significativa en el diseño, construcción e implementación de un sistema de biorreactores de inmersión temporal, respecto al método tradicional de propagación in vitro en relación al desarrollo de explantes. El SIT dio mejores resultados que el tradicional tanto en altura (6.67%), como número de hojas (20%) y número de raíz (50%).

Palabras Clave

Biorreactores, sistema de inmersión temporal, orquídeas, diseño, sistema en paralelo, propagación in vitro.

Índice

I.	INTRODUCCIÓN.....	7
1.1	Lo escrito sobre el tema.....	9
1.2	Marco teórico.....	11
1.2.1	Orquídeas.....	11
1.2.2	Funciones principales de las orquídeas.....	11
1.2.3	Características de orquídeas.....	12
1.2.4	Desarrollo de orquídeas.....	12
1.2.5	Polinización.....	13
1.2.6	Guarianthe aurantiaca.....	14
1.2.7	Propagación in vitro.....	15
1.2.8	Condiciones generales.....	16
1.2.9	Medios de cultivo.....	16
1.2.10	Propiedades de compuestos utilizados para medio MS.....	17
1.2.11	Gases en propagación in vitro.....	19
1.2.12	Desarrollo de propagación in vitro.....	19
1.2.13	Esterilización.....	21
1.2.14	Propagación in vitro a gran escala.....	22
1.2.15	Propagación in vitro a pequeña escala.....	22
1.2.15	Reactores.....	22
a.	Reactor continuo de mezcla perfecta (CSTR).....	23
b.	Reactor de flujo tapón o tubular (PFR).....	24
c.	Reactor empacado (PBR).....	24
1.2.16	Biorreactores.....	25
1.2.17	Sistemas de inmersión temporal.....	27
1.2.18	Equipo utilizado para construcción de sistemas de inmersión temporal.....	29

1.2.19	Contenedores.....	30
1.2.20	Filtros PTFE	30
1.2.21	Compresor de aire.....	31
1.2.22	Temporizador	32
1.2.23	Tipos de SIT.....	32
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	36
2.1	Objetivos	38
2.1.1	Objetivo general	38
2.1.2	Objetivos específicos.....	38
2.3	Variables	39
2.3.1	Variables dependientes	39
2.3.2	Variables independientes	39
2.4.1	Variables dependientes	39
2.4.2	Variables independientes	40
2.5	Alcances.....	41
2.6	Límites.....	42
III.	MÉTODO	44
3.1	Sujetos	44
3.2	Unidades de análisis	44
3.3	Reactivos, instrumentos y equipo utilizados	44
3.3.1	Reactivos	44
3.3.2	Instrumentos	45
3.3.3	Equipo.....	45
3.4	Procedimiento	48
3.4.1	Protocolo para elaboración de medio Murashige y Skoog (MS)	48
3.4.2	Protocolo de desinfección de cápsula cerrada	49
3.4.3	Metodología tradicional de siembra de orquídeas	50

3.4.4	Metodología para manejo de explantes.....	51
3.4.5	Metodología para instalación de SIT	52
3.5	Diseño y metodología estadística	53
3.5.1	Diseño experimental.....	53
3.5.2	Experimentos	53
3.5.4	Descripción de las unidades experimentales.....	54
3.5.5	Variable respuesta	55
3.5.6	Metodología de análisis.....	55
IV.	RESULTADOS.....	57
4.1	Sistema de biorreactores de inmersión temporal.....	58
4.2	Biorreactores	59
4.3	Proceso de SIT operando.....	60
V.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	62
VI.	CONCLUSIONES.....	79
VII.	RECOMENDACIONES	80
VIII.	REFERENCIAS.....	81
IX.	ANEXOS	85
8.1	Glosario	86
8.2	Diagrama de equipo.....	87
8.3	Datos originales	88
8.4	Datos calculados	90
8.5	Descripción de ecuaciones utilizadas.....	91
8.6	Muestra de cálculo.....	93
8.7	Análisis estadístico	102
8.8	Imágenes complementarias	104
8.9	Tablas de seguridad de reactivos utilizados.....	105

Índice de Tablas

Tabla 1. Formulación de reactivo utilizados para la preparación del medio Murashige y Skoog (MS)	17
Tabla 2. Equipo utilizado para realización de procedimientos.....	45
Tabla 3. Diseño experimental.....	53
Tabla 4. Variable respuesta	55
Tabla 5. Sistema de filtrado de aire.....	57
Tabla 6. Condiciones del biorreactor.....	57
Tabla 7. Presión en sistema de biorreactores de inmersión temporal.....	60
Tabla 8. Rendimiento obtenido de explantes de <i>Guarlanthe aurantiaca</i>	61
Tabla 9. Análisis estadístico para variables en los dos sistemas evaluados.....	61
Tabla 10. Análisis de costo del sistema de inmersión temporal	61
Tabla 11. Datos originales del Sistema de Inmersión Temporal	88
Tabla 12. Datos originales para el aire y medio	88
Tabla 13. Datos originales adicionales.....	88
Tabla 14. Datos originales de tiempo para medición de caudal	88
Tabla 15. Datos adicionales del compresor de aire	88
Tabla 16. Datos originales de crecimiento y desarrollo de explantes.....	89
Tabla 17. Costos según método tradicional	89
Tabla 18. Calculo de caudal y velocidad de flujo promedio.....	90
Tabla 19. Datos calculados referentes a la presión de alimentación	90
Tabla 20. Rendimiento de SIT calculado.....	90
Tabla 21. Costos calculados y retorno de inversión para SIT	90
Tabla 22. Análisis de Retorno de Inversión.....	101
Tabla 23. Prueba T para altura de plantas.....	102
Tabla 24. Prueba Wilcoxon para altura de plantas.	102
Tabla 25. Prueba T para hojas de plantas.	102
Tabla 26. Prueba Wilcoxon para hojas de plantas.	103
Tabla 27. Prueba T para raíces de plantas.	103
Tabla 28. Prueba Wilcoxon para raíces de plantas.....	103
Tabla 29. Propiedades físico-químicas de compuestos químicos	105

Tabla 30. Toxicología de compuestos químicos	106
--	-----

Índice de Imágenes

Ilustración 1. Estructura de flor de orquídea.....	11
Ilustración 2 Cápsula de <i>Epidendrum umbeliferum</i>	13
Ilustración 3 <i>Guarianthe aurantiaca</i>	14
Ilustración 4 Reactor intermitente.....	23
Ilustración 5 Reactor CSTR.....	24
Ilustración 6 Reactor tubular	24
Ilustración 7 Reactor empacado.....	25
Ilustración 8 Polimerización de PTFE.....	30
Ilustración 9 Proceso de RITA. Vitropic.....	33
Ilustración 10 SIT frascos gemelos	34
Ilustración 11 SIT modificado	34
Ilustración 12. Sistema de biorreactores de inmersión temporal.....	58
Ilustración 13. Diseño de Biorreactor para SIT.....	59
Ilustración 14. Etapas de proceso del sistema de biorreactores de inmersión temporal.....	60
Ilustración 15. Diagrama de equipo de SIT en cámara de crecimiento.	87
Ilustración 16. Sistema de Inmersión Temporal en cámara de crecimiento.	87
Ilustración 17. Medición de Altura de explantes.	104
Ilustración 18. Diferencia visual entre unidades de cultivo	104

I. INTRODUCCIÓN

Desde la antigua Grecia, las orquídeas han sido catalogadas como bellas y exóticas. Constituyen una de las familias de plantas con flores más diversas del planeta. En América se estima que existen alrededor de 13, 000 especies de orquídeas concentrando la mayor riqueza en Centro América (Pupulin y Rakosy 2013). Durante la Edad Media, se tenía la teoría que las propiedades curativas de las plantas tenían principal efecto en los órganos humanos de aspecto similar y, dado que la palabra orquídea viene del griego *orkhis* que significa testículo, se le atribuían propiedades afrodisiacas y se relacionaban con la fertilidad y virilidad (Nauray, 2013).

De acuerdo con el proyecto de conservación de orquídeas de Guatemala (IARNA, 2013) las orquídeas tienen tiempos de desarrollo prolongados. Desde la polinización de la flor hasta la floración de una orquídea pueden pasar alrededor de 5 años, con las condiciones adecuadas. Además las orquídeas son altamente amenazadas en Guatemala debido a la tala de árboles o la colecta ilegal de especies. Para favorecer la conservación de especies nativas, en el laboratorio de biotecnología de la Universidad Rafael Landívar se trabaja la propagación in vitro de orquídeas bajo el método tradicional de manipulación de frascos. El método tradicional consiste en el cambio constante de frascos con medios de cultivo, donde son sembradas las orquídeas. El riesgo actual es que al hacer transferencia de orquídeas de un frasco a otro, estas se contaminen, reduciendo el porcentaje de orquídeas desarrolladas para la investigación.

Con el presente trabajo se pretende mejorar la forma tradicional de propagación in vitro evitando la manipulación constante de frascos. Para ello se procederá a diseñar, construir e implementar en el laboratorio un sistema de biorreactores de inmersión temporal adecuado para el crecimiento y desarrollo de orquídeas. El aporte de esta investigación es hacia la obtención de mayor cantidad de tejido vegetal (orquídeas), disminuir costos en la elaboración de medios y promover en las plantas una mejor adaptación en el medio al que se introducen (biorreactores). Del mismo modo, pretende cumplir con el objetivo del estudiante de ingeniería química a combinar

sus estudios para la construcción de un equipo que cumpla con dichas características para dar propuestas de mejora.

La importancia de este proyecto radica en la generación de información relacionada a los biorreactores en Guatemala, innovar con tecnología adecuada el desarrollo de tejidos vegetales que sirva para cátedras y demostraciones a estudiantes y docentes, así como apoyar al sector agrícola con obtención de cultivos de mejor características y adaptación.

1.1 Lo escrito sobre el tema

Solórzano (2016) establece las características y parámetros de diseño de un sistema de biorreactores y, a través de la implementación del sistema de automatización electro-neumático, realiza pruebas de eficiencia en la multiplicación in vitro de Ananas, con sus respectivos parámetros de operación (frecuencia de inmersiones y tiempos de inmersión). Para realizar dicho trabajo, estableció el diseño de los diferentes subsistemas (soporte, iluminación, aireación, filtrado, tanques y control). De este trabajo se obtuvo la construcción del sistema de biorreactores y se concluyó que la tasa de multiplicación de la especie evaluada fue de 6.5 plántulas por yema incubada.

Rolz (1990) propone el diseño de un biorreactor para la incorporación de perlas de alginato en la levadura (como catalizador) para la hidrólisis de la sacarosa. El principio de operación consiste en un sistema de agitación de succión y uno de descarga, el cual está conectado a una bomba de recirculación de flujo y es elaborado a partir de instrumentos de laboratorio. Con este trabajo se logró elaborar las perlas al diámetro adecuado (0.88mm) a través del flujo de suspensión de levadura y el de aire hacia el biorreactor.

Acuña (2004) establece los procedimientos para la elaboración de un biorreactor para la macropropagación de especies utilizando instrumentos y equipos artesanales como motores y difusores de pecera, menciona los materiales y equipos utilizados e incluye diagramas del equipo así como las aplicaciones del mismo.

En España, Cuenca, Menéndez, Ballester y Vidal (s.f.) muestran una comparación entre el sistema de biorreactores RITA y reactores construidos en el departamento de mejora Agroforestal TRAGSA. En este trabajo, se muestra las condiciones de operación a las cuales fueron expuestos los explantes, evaluando concentración de reguladores de crecimiento, tipo de soporte empleado, frecuencias de

inmersión y capacidad de propagación. Se concluyó que la propagación de explantes fue mayor en biorreactores de inmersión temporal diseñados que en los biorreactores comerciales RITA y que el uso de biorreactores (tanto RITA como el diseñado por ellos) supera al sistema tradicional de transferencia de frascos.

En México, Bello-Bello (s.f.) describe 3 sistemas de inmersión temporal (RITA, BIT y BIG) para diferentes especies como una opción de mejora de calidad y reducción de costos, a través de biorreactores de inmersión temporal y por gravedad, como una alternativa oportuna para la propagación in vitro.

En Viena, IAEA (2004) presenta un manual en el cual se explica el uso de un biorreactor, los tipos de biorreactores comúnmente utilizados a nivel laboratorio, las ventajas y desventajas de los mismos, el control de contaminación asociado y la construcción de un biorreactor simple analizando los costos y beneficios respecto al sistema tradicional para el cultivo in vitro.

1.2 Marco teórico

1.2.1 Orquídeas

Las orquídeas pertenecen a la familia *Orchidaceae*. El nombre de la familia *Orchidaceae* se deriva del griego *orkhis* (que significa testículos) debido a su reputación afrodisíaca. Las orquídeas son flores de uso ornamental, religioso, alimenticio y cívico. Son consideradas flores exóticas, bellas y elegantes debido a la diversidad de formas, colores y aromas (IARNA, 2013).

La familia de orquídeas es de las más abundantes a nivel mundial, seguida por la familia de *Bromeliaceae*. Se tienen descritas más de 800 géneros y 20,000 especies distribuidas en casi todas las regiones del planeta (exceptuando tierras heladas y desiertos extremos), de las cuales existen alrededor de 1,100 especies en Guatemala (IARNA, 2013). Algunas de las especies que habitan en Guatemala son: *Guarianthe aurantiaca*, *Trichopilia tortilis*, *Trichocentrum carvendishianum*, *Oncidium leucochilum*, *Prosthechea ochracea*, *Epidendrum radicans*, entre otros.

De acuerdo con Dix M. & Dix, M (2006), la mayor diversidad de orquídeas en Guatemala se encuentra entre los 800 a 1600 msnm y las principales ubicaciones de las mismas son en los departamentos de Alta Verapaz, Zacapa, Izabal, Huehuetenango, Chimaltenango, Suchitepéquez y Petén. Sin embargo, la mayoría de las especies son amenazadas ya que, por lo menos 125 especies están dentro de la Lista de Especies de Flora Amenazada (en la publicación del Consejo Nacional de Áreas Protegidas).

1.2.2 Funciones principales de las orquídeas

Las orquídeas tienen diferentes roles en los ecosistemas, desde proveer néctar y aceites esenciales para alimentar diferentes mamíferos, aves e insectos hasta servir de refugio para los mismos. Las orquídeas son utilizadas como indicadores del estado de los bosques (principalmente bosques nubosos), ya

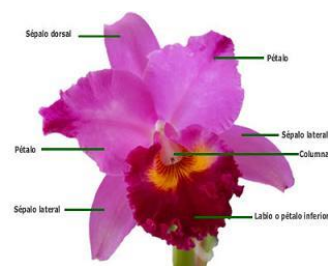


Ilustración 1. Estructura de flor de Orquídea. Fuente: Vesania (2007)

que son sensibles a cambios que ocurren en los ecosistemas, entre ellas la deforestación y la colecta ilegal de las mismas. Para los colectores de las mismas, las orquídeas tienen carácter ornamental y se utilizan para la elaboración de arreglos teniendo entre las principales flores de corte: *Cattleya*, *Dendrobium*, *Phalaenopsis*, *Vanda*, *Laelia*, entre otras. Si desaparece una especie de orquídea, son susceptibles a desaparecer sus polinizadores. Otra función importante de las orquídeas es el rol que ocupa dentro del ciclo de vitaminas y micronutrientes (IARNA, 2013).

1.2.3 Características de orquídeas

La adaptación de orquídeas es tan variada como la cantidad de géneros. Durán (2006) establece que algunas orquídeas son autótrofas y por lo tanto, pueden elaborar las sustancias que necesitan para desarrollarse, a partir de agua, CO₂, luz solar y elementos del suelo. Por otro lado, existen orquídeas heterótrofas que utilizan la materia orgánica para nutrirse.

De acuerdo con Pérez y López (2008), las orquídeas pueden ser terrestres, litófitas (semiterrestres) y epífitas (usan sus raíces como soporte en árboles). Las orquídeas, comúnmente tienen pseudobulbos, los cuales actúan como órganos de reserva y almacenamiento. De los pseudobulbos brotan raíces y hojas así como el tallo floral. Durán (2006), hace mención que la flor de las orquídeas está compuesta por 3 sépalos, 3 pétalos y 1 labelo. Los sépalos generalmente tienen una estructura diferente de los pétalos y el labelo se diferencia completamente de ambos.

1.2.4 Desarrollo de orquídeas

Las orquídeas son monocotiledóneas, es decir, produce una hoja que tiene la función de proporcionar nutrientes a la semilla en la primera etapa del desarrollo. Las semillas carecen de sustancias de reserva y por ello debe aportarse nutrientes de un agente externo para desarrollarse el embrión, el cual, en la naturaleza es un hongo (relación micorrízica). Las hifas del hongo aportan al embrión los azúcares necesarios para su crecimiento, funcionando como raíces.

Cabe mencionar que las micorrizas de orquídeas son endótrofas (viven en el interior de las células) por lo tanto el hongo no debe invadir completamente los tejidos de la orquídea. Este hongo puede ser sustituido por un medio de cultivo con alta concentración de azúcares.

El tiempo de floración a lo largo del año depende de cada especie, debido a que las sustancias nutritivas se utilizan para la formación del tallo floral y semillas por lo tanto, resulta costosa energéticamente para la orquídea tener la flor. No solo es corto el tiempo de floración a lo largo del año sino que la floración se da en años alternos. Para favorecer a la reproducción de estas especies, la polinización debe ser exitosa en este corto tiempo. Un ejemplo de ello es la floración de la orquídea conocida como Vainilla. El tiempo de floración es de cuatro horas (entre las 8 y las 12 del medio día) por lo la polinización debe ser durante este tiempo.

1.2.5 Polinización

Las orquídeas generalmente son hermafroditas y las células sexuales masculinas deben ser llevadas a los órganos femeninos de una flor distinta al polinizarse. Los polinizadores (insectos) son tan diversos como las especies de orquídeas. Durán (2006) define a este tipo de polinización como entomófila. Una particularidad de las orquídeas es que se adoptan a los polinizadores, al punto en que algunas especies adoptan sus flores a la forma del polinizador, a través de mecanismos de atracción. Las flores se adaptan a los polinizadores a través de presencia de labelo (como posadero para insectos), produciendo néctar en cavidades de la flor, por atracción de manchas o dibujos en las flores, produciendo sustancias aromáticas, atracción óptica, entre otros. De esta forma, el insecto se ve obligado a adoptar una posición favoreciendo el contacto con el polen. Esto se conoce como el mecanismo de especificidad (basado en la fisiología sensorial de los insectos).



Ilustración 2 Cápsula de *Epidendrum umbeliferum*.
Fuente: Imagen propia (2018)

El polen de las orquídeas se conoce como polinia y es una masa pegajosa que se adhiere al polinizador y luego se desprende cuando este llega a otra flor para la fecundación de la misma (IARNA, 2013). Una vez obtenida la polinización, el ovario fecundado se transforma en una cápsula, la cual contiene millones de semillas microscópicas (apariencia de polvo fino). Sucede así, ya que en la naturaleza es difícil obtener la relación de micorriza para la germinación de la semilla, por lo tanto, mayor número de semilla, aumenta la probabilidad de éxito de reproducción de la planta.

1.2.6 *Guarianthe aurantiaca*

La orquídea conocida como *Guarianthe aurantiaca* habita los bosques húmedos de las Verapaces, Huehuetenango, y la zona costera, generalmente en encinos y árboles de sombra y en plantaciones de café. Desde la Costa Pacífica hasta llegar a Baja y Alta Verapaz. La palabra “Guaria” significa epífita, lo cual implica que vive sobre los árboles y “anthos” que significa flor (Martin, 2018). Esta orquídea es una planta epífita con pseudobulbos de hasta 40cm de largo y dos hojas coriáceas (duras y espesas).



Ilustración 3 *Guarianthe aurantiaca*.
Fuente: Fraser (2018)

De acuerdo con Martin (2018), en Guatemala, el género se conocía como *Cattleya* pero a finales del siglo XX los taxónomos la reconocieron como un grupo diferente de acuerdo al número de hojas y tamaño así como la consistencia de las flores. Esta clasificación fue justificada con los análisis de ADN molecular y métodos computacionales. En 2003 se publicó el trabajo de Dressier y Higgins donde se reconoció oficialmente la diferencia taxonómica, morfológica y datos para el nuevo género *Guarianthe*. Las especies que pertenecen al género *Guarianthe* son: *Guarianthe aurantiaca*, *bowingiana*, *hennisiana* y *skinneri*.

La floración de esta especie se da en los meses de enero a marzo. Las condiciones favorables para inducir su floración son luz brillante, veranos cálidos e inviernos templados; temperaturas entre 18 y 32°C en verano y 10 a 15°C en invierno; el suelo debe permitir suficiente drenaje de agua (Burghardt, 2018). La floración de esta

orquídea consiste en un racimo simple que desarrolla entre 3 y 11 flores de tonalidades rojas y amarillas (Lopez-Selva y Cleaves, 2017).

1.2.7 Propagación in vitro

De acuerdo con Castillo (2004), al hablar de cultivo in vitro se hace referencia al “cultivo de plantas dentro de frascos de vidrio en un ambiente artificial”. Con ello se obtiene ausencia de agentes contaminantes y control de factores de crecimiento. La práctica de cultivo in vitro ha sido experimentada en laboratorios desde la década de los años 50, para el estudio detallado de plantas a nivel celular y molecular, a través de reproducción de todos los factores que inciden en el crecimiento y desarrollo de plantas.

Los aportes del cultivo in vitro para obtención de plantas se basa en la producción de plantas de condiciones controladas, independiente de condiciones geográficas y problemas sociopolíticos, conservar el germoplasma de plantas (sobre todo en vías de extinción), obtener enzimas y compuestos químicos así como la producción de plantas transgénicas resistentes a patógenos. (Segretín, s.f.)

La principal diferencia entre la propagación in vitro respecto a una planta en condiciones naturales es que en modo in vitro la planta no realiza fotosíntesis, el crecimiento es en condiciones controladas y asépticas, la humedad relativa es alta, los estomas son no funcionales, hay ausencia de pelos radiculares y cera en la cutícula (Castillo, 2004).

Castillo (2004), indica que la reproducción de todos los factores que inciden en el crecimiento es técnicamente complejo. Por lo tanto, se simplifica a través de la selección de factores que puedan ser controlados. Este control aplica para el ambiente físico y químico en el que se sitúa el explante. Así mismo, las etapas de la propagación in vitro conlleva: la preparación de planta madre, la desinfección de semillas, el cultivo in vitro de tejidos vegetales a estudiar, la multiplicación de brotes, el enraizamiento y la aclimatación.

Existen diferentes formas de reproducir plantas de forma in vitro, siendo las principales: la primera, la propagación clonal a través de explantes (partes de plantas u órgano) obteniendo una planta genéticamente igual a la planta madre. La segunda es la germinación asimbiótica de semillas, las cuales tendrán material genético diferente de la planta madre, pero las características fenotípicas y genotípicas tendrán un comportamiento similar (Peralta, 2016).

1.2.8 Condiciones generales

Los frascos que contienen las plantas o explantes deben estar ubicados en lugares con luz artificial dentro de cámaras de crecimiento con temperatura entre los 21 y 23°C, controlando las horas de luz (Castillo, 2004). Al respecto, Orozco (2002), menciona que disminuir la temperatura incide en el contenido total de los ácidos grasos por peso de células secas, causando estrés para inhibir el crecimiento de compuestos intermediarios, mientras que al aumentar la temperatura, hay acumulación de ácidos insaturados.

1.2.9 Medios de cultivo

Castillo (2004), establece que los medios de cultivo son mezcla de sales minerales, vitaminas, reguladores de crecimiento, agua, agar y azúcar. Los factores que afectan la elaboración del medio de cultivo son pH, composición, temperatura, humedad y luz. Los medios de cultivo suelen ser específicos de las especies que se analizan e investigan, sin embargo, el principal medio utilizado para orquídeas es el medio Murashige & Skoog. Este medio está compuesto por calcio, macronutrientes, micronutrientes, hierro, vitaminas y azúcares. Fue inventado por Toshio Murashige y Folke Skoog en 1962 y se utiliza para cultivo in vitro de tejidos vegetales, siendo el tabaco su principal estudio (Probiotek, 2017). Por otro lado, fue Knudson quien hizo aportes significativos al estudio de las orquídeas a través de medios ricos en hidratos de carbono no solo con segmentos de hoja, sino con segmentos nodales de plántulas que provienen de semillas germinadas in vitro, y otras secciones (Sedano, Manzo Roldán y Castellanos, 2015).

A continuación se desglosa una tabla indicando la composición del medio MS sin reguladores de crecimiento:

Tabla 1. Formulación de reactivo utilizados para la preparación del medio Murashige y Skoog (MS)

Solución	Reactivo	Cantidad para 1litro (g/L)
Macronutrientes	Nitrato de amonio (NH_4NO_3)	16.5
	Nitrato de potasio (KNO_3)	19.0
	Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	3.70
	Fosfato monoácido de potasio (KH_2PO_4)	1.70
Calcio	Cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	4.40
Micronutrientes	Ácido bórico (H_3BO_3)	3.10
	Sulfato de manganeso tetrahidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	11.15
	Sulfato de zinc heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	4.30
	Yoduro de potasio (KI)	0.415
	Molibdato de sodio dihidratado ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.125
	Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.0125
	Cloruro de cobalto hexahidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.0125
Hierro	Triplex III ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	3.725
	Sulfato de hierro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2.785
Vitaminas	Myo-inositol	10.0
	Glicina ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$)	0.20
	Acido nicotínico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$)	0.05
	Piridoxina-HCl	0.05
	Tiamina-HCl	0.01

Fuente: IARNA (2013)

1.2.10 Propiedades de compuestos utilizados para medio MS

A continuación se mencionan las características y funciones principales de los nutrientes contenidos en el medio MS (Yara, s.f.):

Nitrógeno: mejora la calidad y cantidad del crecimiento vegetativo. La adición de molibdeno hace que las plantas puedan obtener el nitrógeno.

Potasio: regula el equilibrio del agua en las células y la pérdida de ésta a través de la transpiración, transporte de azúcares en la planta, activación enzimática y síntesis de proteínas, estimula el crecimiento de tallos fuertes y brinda protección contra enfermedades y plagas aumentando el grosor de las paredes celulares exteriores.

Magnesio: componente vital de la clorofila, activa reacciones enzimáticas y es necesario para el movimiento del fósforo hacia y por adentro de la planta.

Azufre: permite la formación de proteínas, aminoácidos, algunas vitaminas y enzimas en la planta, fomenta el uso completo del N- nítrico.

Fósforo: ayuda en el crecimiento de las plantas, promoviendo un crecimiento rápido, mayor tamaño de la hoja, se requiere para el funcionamiento normal de las membranas celulares, además de ser un componente clave del ácido nucleico y el ATP, también participa en la producción y transporte de azúcares, grasas y proteínas. También es particularmente importante para el desarrollo de las raíces, en plántulas, asegura el rápido crecimiento de la raíz y la buena toma de otros nutrientes y de la humedad.

Calcio: desarrollo de las raíces y del ápice, componente de la pared celular, dando fuerza a la pared celular y estabilidad a la membrana celular

Boro: necesario para la producción de ácido nucleico y hormonas, así como el movimiento de azúcares en la planta. Importante para la absorción del calcio y su movimiento a través de la planta.

Manganeso: participa en la síntesis de la clorofila, la fotosíntesis, la evolución del oxígeno, la activación de enzimas, síntesis de proteínas, ayudando a mejorar el uso de nitrógeno de la planta. Ayuda a desintoxicar y protege los componentes contra la fotooxidación.

Zinc: desarrollo de cloroplastos, responsable del metabolismo de auxinas, desintoxica los radicales de oxígeno dañinos que se forman bajo condiciones de estrés, mejoran la eficiencia en el uso de nitrógeno.

Yodo: ayuda en la fotosíntesis

Cobre: importante como catalizador en la fotosíntesis y la respiración, además se usa en la lignificación de las paredes celulares, influyendo en la estabilidad celular y la resistencia a los ataques de hongos.

Cobalto: fijación del Nitrógeno.

Hierro: esencial para la formación y la función de la clorofila, crítico para el crecimiento vegetativo sano. Utilizado en sistemas de óxido-reducción involucrados en los procesos metabólicos y la transferencia de energía. Permite el uso de sulfatos y nitrato.

1.2.11 Gases en propagación in vitro

Una de las características principales del cultivo in vitro es trabajar en ambientes libres de contaminantes para lo cual es necesario sellar adecuadamente los recipientes donde ocurre el cultivo y siembra de plantas. Al sellar adecuadamente se debe tomar en cuenta que el intercambio gaseoso no se vea interrumpido y que no se permita el ingreso de agentes contaminantes al recipiente. Para ello es importante diseñar envases con restricción en el intercambio de gases entre el interior y el exterior del envase. Con ello se disminuye la producción de dióxido de carbono (CO₂) en el frasco y ocasiona poca fotosíntesis (Lugo, 2009)

Orozco (2002), establece que la composición de los gases suministrados a los cultivos afecta el crecimiento y desarrollo vegetal. También afecta la diferenciación celular y la producción de moléculas secundarias obtenidas durante el metabolismo (como el CO, etileno, etano, acetaldehído, etanol, entre otros). Si se acumula el gas puede promover o inhibir el crecimiento y regeneración de callos y enzimas. Por otro lado, cuando se trabaja con envases sellados con tapadera plástica traslúcida, el crecimiento in vitro es irregular y se incrementa la condensación, debido a la alta humedad relativa en el recipiente (Lugo, 2009).

1.2.12 Desarrollo de propagación in vitro

De acuerdo con la metodología actual, empleada para el proyecto de investigación de conservación de orquídeas de Guatemala, iniciado en 2013, se procede a obtener la cápsula de la orquídea de estudio, evaluando que esta esté en el punto de maduración (se nota por cambios de color de verde y café y completamente cerrada). Se lava y desinfecta la superficie de la cápsula para quitar cualquier impureza que pueda contaminar la parte interna de la semilla. Luego la cápsula es abierta con instrumentos de laboratorio (pinzas y bisturí sobre un vidrio grueso estéril) en cámaras de flujo

laminar en condiciones asépticas para ser sembradas en frascos con medio de cultivo estériles.

A medida que el tiempo transcurre, la semilla adquiere del medio los nutrientes necesarios para germinar. Este proceso puede tomar de 1 mes hasta 1 año según la especie. A medida que la semilla adquiere los nutrientes, el investigador se ve en la tarea de cambiar la misma de frasco, a otro que tenga medio suficiente para mantener viva la orquídea. Para ello se deben tomar en cuenta las medidas asépticas necesarias con la finalidad de evitar la contaminación del medio, lo cual ocasiona problemas de proliferación de mohos, hongos y bacterias y evita que crezcan las orquídeas.

Las orquídeas contenidas en los frascos de cultivo deben tener condiciones óptimas de crecimiento, en cuyo caso los factores de frecuencia de luz, intercambio gaseoso, alta humedad y aireación deben ser estrictamente controlados. El tiempo que la orquídea pasa en esta etapa de desarrollo es de 1 a 5 años, tras lo cual la orquídea tendrá un tamaño aceptado. Uno de los principales problemas que se tiene al momento de cultivar orquídeas de forma in vitro es que no se desarrollan correctamente los estomas de la misma, los cuales le sirven en el ciclo de fotosíntesis.

Por lo tanto, luego de obtener el tamaño adecuado y las raíces desarrolladas, las orquídeas deben pasar a una etapa de aclimatación. En esta etapa, las orquídeas deben tener limpias sus raíces de cualquier residuo de medio de cultivo y desinfectadas. Luego son llevadas a un invernadero y regadas según convenga la especie. En esta etapa las orquídeas se desarrollaran para ser candidatas a floración. Este proceso toma de 2 a 5 años (IARNA, 2013). Al respecto, Castillo (2004) establece que en el invernadero las condiciones para cultivar las plantas deben ser sanitarias óptimas y con control de nutrición y riego adecuado para permitir crecimiento libre de contaminantes. Al ser aclimatados a las condiciones de humedad del invernadero disminuyendo progresivamente la humedad relativa e incrementando la intensidad de la luz.

1.2.13 Esterilización

Los microorganismos son todos aquellos seres vivos que solo pueden ser visibles en el microscopio y se ubican en el campo de estudio de la microbiología. Son importantes para intervención de procesos biogeoquímicos de la naturaleza y constituyen la base para procesos industriales. Los microorganismos necesitan condiciones óptimas de temperatura, humedad, actividad de agua, y pH para poder reproducirse (Moran, 2015). Es importante mencionar que el tiempo de muerte de estos microorganismos es el tiempo en el que se inhiben y no tienen capacidad de reproducirse. Su muerte, en el sentido que comúnmente se entiende, conforma su destrucción total.

Se conoce como mecanismo de acción a la forma en la que actúa el medio sobre el microorganismo para que evitar la reproducción de los mismos (Guillamas, 2018). Cada uno de los tipos de esterilización actúa con uno o más mecanismos de acción sobre los microorganismos. Los cinco principales mecanismos son:

- a. Alteración de la composición de la membrana celular
- b. Alteración de la composición coloidal del citoplasma, coagulando o desnaturalizando proteínas (vapor)
- c. Alteración de la permeabilidad de la membrana
- d. Inhibición de procesos enzimáticos
- e. Alteración de síntesis de ADN (luz uv)

Esterilización es el concepto empleado para denotar la eliminación o destrucción completa de todos los microorganismos, incluidas las formas resistentes como esporas bacterianas, virus y hongos. El agente que produce la esterilización se conoce como esterilizante. La esterilización se diferencia de la desinfección debido a que esta se refiere al control dirigido a destrucción de microorganismos patógenos vegetativos de forma superficial (Guillamas, 2018). Para la esterilización de equipo de laboratorio se utiliza una autoclave, el cual, es un equipo que funciona a base de vapor (similar a olla de presión) con parámetros de exposición de 121°C durante 15 minutos.

1.2.14 Propagación in vitro a gran escala

Industrias como el Ingenio Magdalena, utilizan la técnica de cultivo in vitro para obtener sus plántulas de caña de azúcar. A través del laboratorio de Meristemas, en el departamento de Biotecnología “BIOMAG” que pertenece al área de investigación y desarrollo Agrícola del Ingenio Magdalena, se tienen biorreactores de inmersión temporal en donde crecen y se desarrollan tanto plántulas de caña de azúcar como orquídeas y otros cultivos. Desde el 2008, la producción total era de 2, 500,000 plántulas por año, lo cual corresponde al 80% de caña, al 15% de orquídeas y el 5% restante a otros tejidos vegetales. Este 15% de producción corresponde a 31,250 plantas de orquídea mensual (IMSA, 2018).

1.2.15 Propagación in vitro a pequeña escala

Laboratorios como el de Biotecnología, de la Universidad Rafael Landívar, utilizan la técnica de propagación in vitro para investigación, evaluando el crecimiento de tejidos vegetales. Desde el año 2013, surgió como parte del proyecto de conservación de orquídeas, el estudio del cultivo in vitro de diferentes especies. Actualmente, la capacidad de trabajo en el laboratorio es de 1,700 frascos mensuales de los cuales, 77 son de *Guarianthe aurantiaca*. Cada frasco contiene un promedio de 20 plantas. Por lo tanto, se tienen por lo menos 1,540 *Guarianthe aurantiaca* con la técnica de propagación in vitro tradicional. Además existen alrededor de 200 especies registradas que se han ingresado al cultivo in vitro dentro del laboratorio. Los rangos de unidades de cultivo van desde 6 hasta 140 por especie (IARNA, 2018).

1.2.15 Reactores

Los reactores son tanques en los cuales se llevan a cabo reacciones químicas. Los reactores tienen diferentes aplicaciones en la industria que van desde la obtención del etilenglicol y la recuperación de petróleo (obtención de mayor octanaje en la gasolina) hasta el sistema digestivo de animales (Fogler, 2008).

Fogler (2008), menciona que existen diferentes tipos de reactores según su aplicación, sin embargo todos se clasifican según características generales dentro de los cuales se

tienen los reactores intermitentes (batch) y los reactores de flujo continuo. La principal diferencia entre ambos tipos es el proceso en el que están involucrados. Los intermitentes contienen la mezcla mientras dure la reacción y se descargan después de ocurrida la misma. Se trabaja por lotes, es decir, no tiene flujo de entrada ni de salida mientras se lleva a cabo la reacción. Estos reactores se asocian con costos altos de producción y variabilidad del producto entre los diferentes lotes obtenidos.

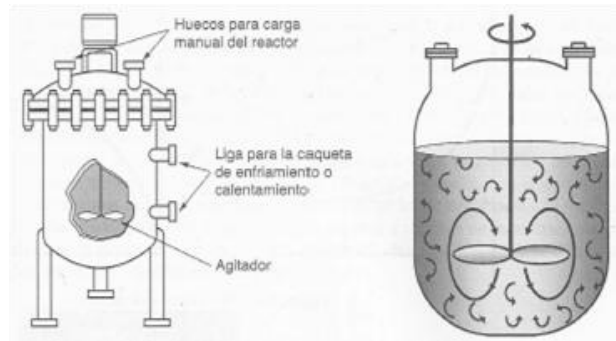


Ilustración 4 Reactor intermitente Fuente: Fogler (2008)

Por otro lado, los reactores de flujo continuo se operan en estado estacionario. Los reactores de flujo continuo se clasifican en: reactor continuo de mezcla perfecta (CSTR), reactor de flujo tapón (PFR) y reactor empacado (PBR). A continuación se detalla cada uno:

a. Reactor continuo de mezcla perfecta (CSTR)

Es el tipo de reactor que se usa principalmente para reacciones en fase líquida. No hay dependencia de tiempo, temperatura, concentración o velocidad de reacción. Este modelo se utiliza para modelaciones de reactores ideales ya que las condiciones internas son iguales en todos los puntos.

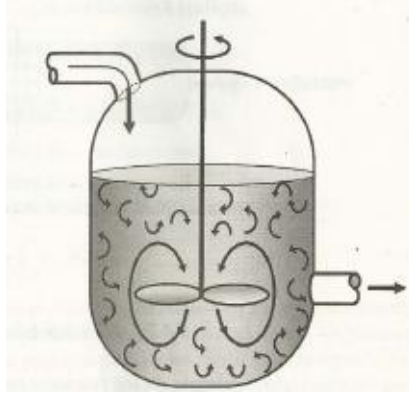


Ilustración 5 Reactor CSTR. Fuente: Fogler (2008)

b. Reactor de flujo tapón o tubular (PFR)

Este reactor se utiliza para reacciones en fase gaseosa. Consiste en un tubo cilíndrico que opera de forma estacionaria en el cual, los materiales reaccionan consumiéndose de forma continua a medida que fluyen a lo largo del reactor. Por lo tanto se asume que la concentración varía continuamente y la velocidad de reacción se relaciona directamente con esta variable.

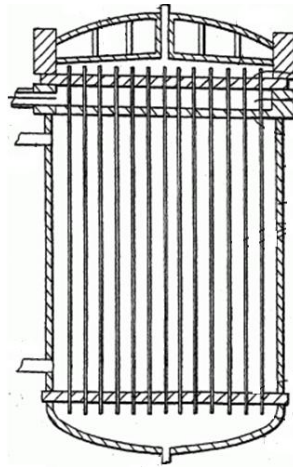


Ilustración 6 Reactor tubular. Fuente: Fogler (2008)

c. Reactor empacado (PBR)

Este reactor se utiliza para reacciones heterogéneas en donde interactúa fluido con sólido. Para ello las reacciones se dan sobre la superficie del catalizador. La velocidad de reacción para este reactor depende de la masa del catalizador y no del volumen del mismo, para la velocidad de obtención del producto.

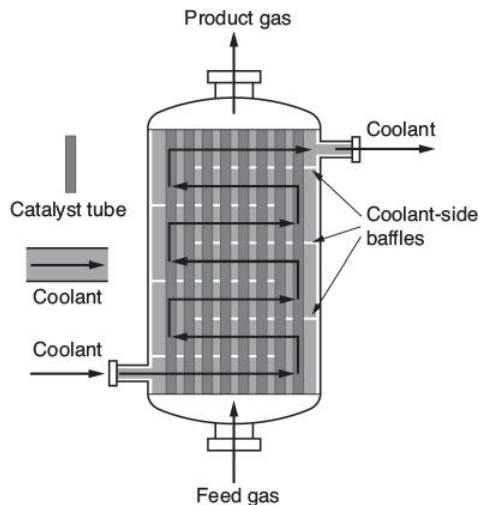


Ilustración 7 Reactor empacado. Fuente: Fogler (2008)

1.2.16 Biorreactores

De acuerdo con Juárez, Manjarrez y Barrón (2011), un biorreactor es un sistema que soporta una especie biológicamente activa, y proporciona un ambiente controlado que permite alcanzar las condiciones óptimas para la micropropagación. Consisten en contenedores diseñados para cultivo de tejidos a medida que produce miles de explantes. Se basa en la inmersión temporal de tejidos en nutrientes por intervalos de tiempo (Abdullahi BY, 2017). Se utilizan para superar problemas asociados a la forma tradicional de cultivar y sus condiciones, mejorando la distribución celular. Con los biorreactores se mantiene la adecuada concentración de gases y nutrientes en el medio de cultivo, ya que facilita la transferencia de masa al mismo. Para favorecer los resultados, se deben controlar las condiciones del cultivo así como la esterilidad para evitar contaminación y la homogeneidad del cultivo.

Al momento de diseñar un biorreactor, debe tomarse en cuenta el tipo de tejido a estudiar. Cada tejido tendrá diferentes comportamientos y condiciones de ambiente. Sin embargo, Partap, Plunkett y O'Brien (s.f.), establece criterios generales para la construcción de estos. Primero menciona que cualquier material que este en contacto con el medio debe ser biocompatible o bioinerte lo cual elimina la opción de tener metales con excepción al acero inoxidable. El material debe ser adecuado para temperaturas de 37°C en una atmósfera húmeda. El equipo debe ser capaz de ser

esterilizado para eliminar microorganismos que afecten el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales.

Los biorreactores se clasifican según su sistema de agitación o el proceso de inmersión. El proceso de agitación puede ser de agitación mecánico o neumático. El proceso de inmersión puede ser temporal o continuo (Albarrán, Salazar, Trujillo, Vegas, Gonzales y Díaz. 2014). La principal diferencia entre los dos procesos de inmersión se basa en el contacto del material a propagar con el medio de cultivo. Los biorreactores de inmersión temporal combinan la aireación para suministrar el medio a las plantas según el tiempo y frecuencia programados.

Orozco (2002), indicó que los biorreactores se clasifican en tres grupos según el tipo de cultivo:

Reactores con células en suspensión: se utiliza para células suspendidas que pueden mezclarse en el fluido libremente. Proporciona un ambiente de cultivo uniforme para las células de las plantas. La principal desventaja es la falta de control sobre el tamaño de agregado de las células (según concentraciones de calcio y compuestos de carbono). Algunos ejemplos mencionados son el reactor de tanque agitado, la columna de burbujeo o el reactor airlift.

Reactores con células inmovilizadas: esos reactores tienen células inmovilizadas, lo cual proporciona mayor concentración de células por unidad de volumen del reactor, alta productividad y elimina problema de lavado de células. Dentro de estos reactores destacan: los de lecho empacado, los de lecho fluidizado, las membranas y los de burbujeo o airlift.

Reactores de biopelícula: estos tienen un espesor definido de la película de células inmovilizadas para dar un mejor ambiente de crecimiento de células. Proporciona contacto directo con los nutrientes de fase líquida, entre las células. Dentro de estos reactores destacan los de fibras huecas, los de lecho empacado, los de lecho fluidizado y los de burbujeo.

Otros tipos de biorreactores descritos por Partap et cols (s.f.) son: Biorreactor de matraz giratorio, de paredes rotatorias, de compresión, de tensión, de presión hidrostática y de perfusión de flujo:

Biorreactor de matraz giratorio: este tipo de reactor favorece la mezcla de oxígeno y nutrientes en el medio de cultivo y reduce la concentración de los mismos en el fondo del tanque. La principal característica es que en la parte superior del tanque tiene agujas que a su vez están unidas a soportes, donde se deposita el tejido a estudiar. El medio se agita a través de un agitador magnético. Típicamente, estos reactores son para volúmenes de hasta ocho litros y tiene de 50 a 80 revoluciones por minuto (rpm). En algunos casos, un agitador magnético ocasiona la turbulencia adecuada para mezclar el medio. Sin embargo, la transferencia de masa en el tanque no es suficientemente homogénea en cuanto a la distribución de células.

Biorreactor de paredes rotatorias: este reactor fue desarrollado en la NASA con la finalidad de proteger el cultivo de células de fuerzas potenciales en el lanzamiento y aterrizaje de naves. En este reactor los tejidos se mueven por acción del tanque. El tanque es un cilindro horizontal que se hace girar a modo que exista balance entre la fuerza gravitacional y la fuerza de arrastre hidrodinámica y permita que los tejidos se suspendan en el medio. El medio de cultivo se cambia pausando la rotación del tanque o siendo añadido a través de una bomba que manda el medio al tanque. El intercambio gaseoso se da por una membrana. Este reactor puede dar de 15 a 30 rpm.

1.2.17 Sistemas de inmersión temporal

Los sistemas de inmersión temporal (SIT) son sistemas que humedecen un material vegetal de forma intermitente durante un corto período con un medio líquido y luego es secado por gravedad dentro de una cámara llamada *biorreactor*. De acuerdo con Paredes (2005), “los SIT consisten en colocar los segmentos de planta en un contenedor y el medio de cultivo líquido en otro envase. El medio líquido es transferido en forma automática hacia el contenedor con las plantas, con determinada frecuencia y tiempo”.

Los sistemas de inmersión temporal (SIT) surgieron a partir del desarrollo y mejora de técnicas para la propagación de material vegetal, el cual implica deficiencias debido a que la producción es de forma manual, aumentando los costos de producción. El SIT fue creado en el CIRAD de Francia con la aplicación de un flujo de aire a uno de los frascos, el cual hace subir el medio de cultivo y bañar los explantes para luego descender por gravedad (Rosales et cols, 2003). Los equipos que se fabrican en países como Francia y Cuba resultan costosos, por lo que la mayoría de países opta por el diseño y construcción de sistemas de inmersión temporal.

El sistema de cultivo in vitro basado en medios líquidos son considerados más eficientes que medios sólidos. Sin embargo, la inmersión directa del tejido vegetal en medio líquido puede generar problemas con la vitrificación e inhibir el crecimiento y desarrollo del tejido. Así mismo, los parámetros de operación principales constituyen el tiempo y la frecuencia de inmersión, los cuales son específicos de la especie a analizar (Vilchez, et cols, 2011).

Los SIT son sistemas simples diseñados para proveer ambientes óptimos, mejorar la transferencia de nutrientes y gases, disminuir los desórdenes fisiológicos y preservar la integridad morfológica del crecimiento in vitro de tejidos vegetales. Usualmente, el período de inmersión es corto (algunos minutos) mientras que el tiempo de exposición de aire es prolongado (horas). Ello se hace con la finalidad de reducir la hiperhidricidad de la planta al crear condiciones óptimas de humedad y suministro de nutrientes con el menor contacto de líquido. Así mismo, se mejora el transporte de oxígeno, lo cual contribuye con el mejor intercambio gaseoso, reduce la limitación del mismo y disminuye la probabilidad de asfixia en las plantas (Georgiev, 2014).

Ventajas de utilizar sistemas de inmersión temporal

- a. Con los SIT puede reducirse hasta un 40%, los reactivos utilizados, los niveles de contaminación y la manipulación de explantes en la transferencia de cultivo en los frascos con medios.
- b. Se ha demostrado que las plántulas con este tipo de metodología tienen mayor capacidad de sobrevivencia en la fase de aclimatación.

- c. A diferencia del sistema tradicional, los SIT requieren menor cantidad de frascos de cultivo, menor espacio para salas de crecimiento.
- d. Disminuye la cantidad de personal requerido para la siembra y a la transferencia de cultivos en los frascos.
- e. La inmersión temporal ofrece un mejor acceso a los componentes del medio y mejora la escalabilidad industrial a través de la automatización del proceso

Los SIT se utilizan para diferentes tipos de cultivo entre ellos el banano, plantas ornamentales, café, entre otros. Así mismo puede ser utilizado para la producción de metabolitos, embriogénesis somática para regeneración de plantas, cultivo de microbios procariotas, producción de compuestos fenólicos y flavonoides, entre otros (Georgiev et al., 2014).

1.2.18 Equipo utilizado para construcción de sistemas de inmersión temporal

Para la construcción de sistemas de inmersión temporal generalmente se utiliza una serie de contenedores para cultivo de tejidos y otros para contener el medio líquido. El diseño básico consiste en dos recipientes de vidrio con boca ancha. El intercambio de aire para los contenedores tiene un filtro de aire compuesta de politetrafluoretileno (PTFE). Todo el equipo se conecta a través de mangueras de silicón (usualmente) y la tubería central se conecta a una bomba de aire controlada con un timer. El compresor generalmente se adecua a una presión de salida de 1.5 bar tomando en consideración factores importantes como distancia de transporte de aire, tamaño y número de contenedores a los cuales será distribuido. Se conectan también válvulas solenoide para operar el sistema abriendo o interrumpiendo el sistema de aire. Todo el equipo debe estar estéril y ser ensamblado en campanas de flujo laminar para evitar la proliferación de agentes contaminantes. El sistema se coloca en un ambiente propicio con luz y ventilación adecuada propia de cámaras de crecimiento (Juárez, 2011).

1.2.19 Contenedores

El sistema general de inmersión temporal utiliza dos contenedores, uno que contiene los explantes y el segundo que contiene el medio de cultivo líquido. De acuerdo con Rosales (2003), los contenedores son recipientes de vidrio en forma cilíndrica con boca ancha de hasta 250ml de capacidad. Las tapaderas de estos contenedores tienen adaptadores para conectarse entre sí y conectarse al suministro de aire. La tubería generalmente es de vidrio o plástico autoclavable de hasta ¼ de pulgadas (0.635 cm) de diámetro.

1.2.20 Filtros PTFE

Muchos autores coinciden en el uso de filtros de venteo de 22 µm hidrofóbicas de membrana de PTFE (politetrafluoroetileno). Estos se colocan entre el aire que ingresa y los contenedores. Su función es retener cualquier partícula o microorganismo de los tubos conectores, permitiendo únicamente el paso de aire.

El PTFE es un polímero semicristalino, no polar, impermeable, con grado de cristalinidad elevado. Este material es inerte y no reacciona con otras sustancias químicas debido a la orientación de los átomos de flúor en la cadena de carbonos. Por lo tanto su toxicidad es nula. El PTFE es permanentemente hidrofóbico por lo que es ideal para filtración de mezcla aire-gas. Sin embargo, no se humedece con el aire. (Elaplas, 2018) El monómero del cual se deriva el polímero tiene como fórmula química $(C_2F_4)_n$ y la reacción de polimerización es la siguiente

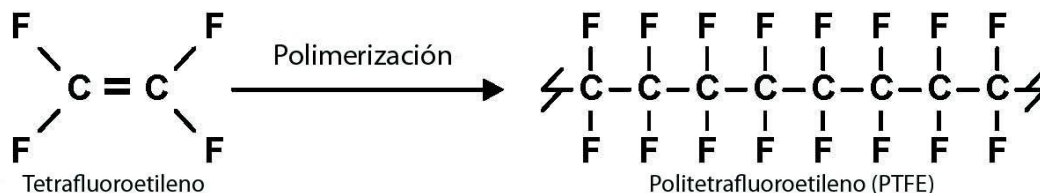


Ilustración 8 Polimerización de PTFE Fuente: Elaplas (2018)

1.2.21 Compresor de aire

Los compresores son máquinas para comprimir los fluidos (gases y vapores) y entregarlo a una presión elevada. Los principales usos de la compresión son: proveer aire para la combustión, transporte de fluido de procesos a través de tuberías, proveer aire comprimido para máquinas neumáticas y circular fluido de procesos dentro de un conjunto de operaciones.

Por la forma en que estos se comprimen, se pueden clasificar como volumétricos, donde el aumento de presión se obtiene por disminución del fluido confinado; o de flujo, donde la elevación de presión del fluido se obtiene a partir de transformación de energía cinética (Arroyo, 2011).

Dentro de los factores principales que influyen en el diseño de los compresores es indispensable tomar en cuenta: la presión, la temperatura, la compresibilidad del fluido (gases) y que el trabajo realizado por un sistema en un ciclo sea igual al calor intercambiado por el fluido, correspondiente a la primera ley de la termodinámica, a través del tipo de proceso que se desee realizar: isotérmico, adiabático o politrópico (Arroyo, 2011).

Según el tipo de elevaciones de presión, es decir, la relación entre la presión de descarga y de alimentación al sistema; será el tipo de compresor. Cuando esta relación es menor a 1.1, se dice que el equipo es ventilador. Cuando se encuentra entre 1.5 y 2, se denomina soplador y por arriba de estos valores se conoce como compresores. Cabe mencionar que otra de las características de los compresores es que la densidad del fluido que ingresa al sistema varía más de un 5%.

Existen los compresores libres de aceite, utilizados en industria farmacéutica, tratamiento de aguas residuales, de alimentos, así como sector medicinal. El compresor de aire debe ser libre de aceite ya que residuos de aceite en el aire entregado puede contaminar el medio, el mantenimiento deberá ser mayor (aire de purga) y los costos serán elevados.

El compresor de aire se utiliza para suministrar el medio a los explantes. La presión de aire en el contenedor desplaza el medio líquido a través del tubo que conecta con el contenedor de explantes. La duración del bombeo del medio depende de la cantidad de medio que se disponga y de la presión de aire del compresor.

También es importante mencionar que excesivo burbujeo en el tiempo de exposición puede tener un efecto de deterioro en las plantas. Luego de completar el periodo de inmersión, inicia el proceso de reverso en el que el medio regresa a su contenedor respectivo. Este ciclo se repite según los intervalos de inmersión adecuados al explante para asegurar que exista una adecuada nutrición a los mismos. (Abdullahi BY et al, 2017).

1.2.22 Temporizador

El temporizador es un dispositivo que se programa para marcar ciclos en un proceso. Es responsable de enviar la señal a las válvulas solenoides que permiten el paso de aire comprimido a los contenedores respectivos dentro del sistema de inmersión temporal.

1.2.23 Tipos de SIT

Según la naturaleza del explante y su respectivo ambiente, los biorreactores de los sistemas de inmersión temporal pueden dividirse en cuatro grupos principales: biorreactores de fase líquida, biorreactores de fase gaseosa, sistema de inmersión temporal y biorreactores híbridos. Los biorreactores de fase líquida presentan como principal desventaja la malformación de tejidos vegetales debido a la hiperhidricidad y asfixia (Georgiev, 2014).

Existen diferentes tipos de sistemas de inmersión temporal pero a continuación se detallan los principalmente utilizados:

RITA: es el sistema de inmersión temporal automatizado y fue creado ante la necesidad de producción de café. Es el SIT más comercial. Consiste en un recipiente con una división creada con material permeable y un soporte. En la primera división se

tiene una especie de canasta, donde se retienen los explantes. En el segundo compartimento se coloca el medio líquido. Este sistema utiliza aire a través de un filtro que impide el paso de bacterias y esporas. El aire permite que el medio suba y entre en contacto con las plantas durante un tiempo y luego se lleva a cabo el secado por gravedad característico. Es importante mencionar que hay una cámara de aire en el compartimento del medio, el cual permite ventilación necesaria para oxigenar el medio de cultivo (Albarrán et al. 2014).

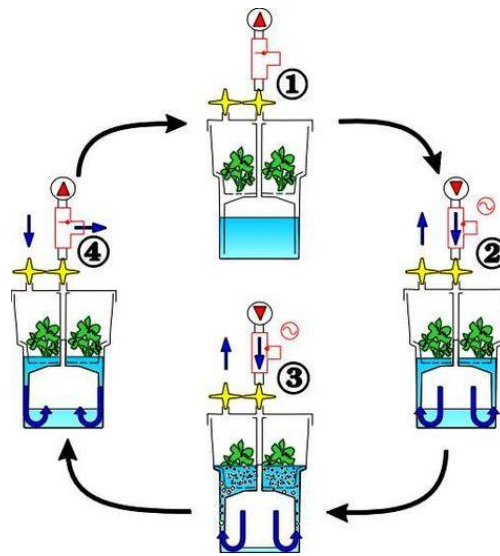


Ilustración 9 Proceso de RITA. Fuente: Vitropic, S.A. (2018)

SIT de frascos gemelos: este es un tipo de biorreactor que contiene dos recipientes conectados por una manguera o tubo de vidrio (en forma de U). En uno de los recipientes se coloca el medio líquido de cultivo, en el otro se coloca la planta a estudiar. Ambos recipientes se conectan a su propia línea de aire a presión controlada por temporizadores. Mediante una bomba, se permite el paso de aire a través del recipiente del medio y por acción de la presión el medio se lleva hacia el otro frasco. Al quitar el suministro de aire, otra bomba permite que el medio regrese al frasco original con el mismo principio (Albarrán et al. 2014).

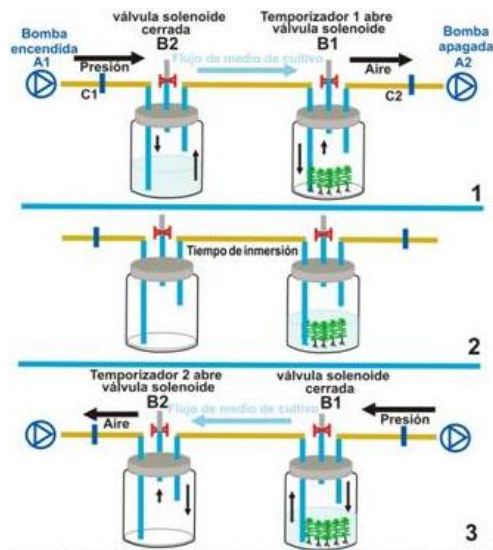


Ilustración 10 SIT frascos gemelos. Fuente: Centro de bioplasmas, Cuba (2018)

SIT de frascos gemelos modificado: en este sistema se tienen los dos recipientes interconectados por tubería desde la parte inferior. En algunos casos, los explantes son colocados en una reja o soporte dentro del recipiente (a partir de poliuretano, el cual mantiene la humedad hasta 90%). La característica de este sistema es que el recipiente con el medio es colocado debajo del recipiente que contiene los explantes, a modo que, el drenado del medio después del tiempo de inmersión, regrese al recipiente por principio de gravedad (Georgiev, 2014).

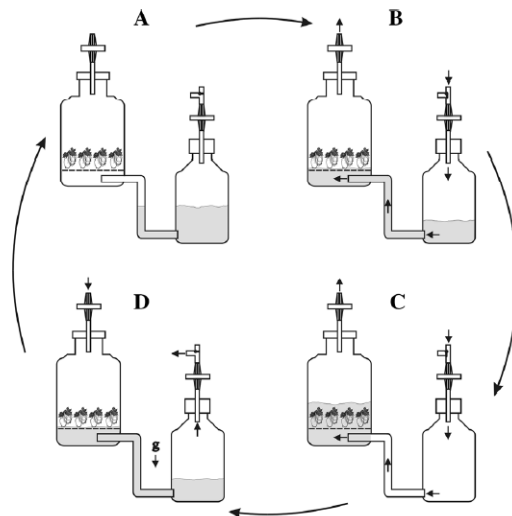


Ilustración 11 SIT modificado Fuente: Georgiev (2014)

Actualmente existen diferentes centros de investigación que se dedican a evaluar el mejoramiento genético de especies vegetales y utilizan los sistemas de inmersión temporal para el desarrollo de los mismos. Entre los principales centros se mencionan: el Laboratorio de Biotecnología de INIA Quilamapu, en Chile; la Unidad de Biotecnología del el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Maracay, en Venezuela; la división de técnicas nucleares en alimentos y agricultura en la agencia internacional de energía atómica, en Austria; entre otros. En Guatemala, se cuenta con el laboratorio de Biotecnología del Instituto de Investigación y Protección sobre ambiente natural y Sociedad de la Universidad Rafael Landívar.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las orquídeas son catalogadas por las personas como símbolo de elegancia, de pureza y de riqueza. Lo exótico de las diferentes especies de orquídeas hace que estas sean altamente amenazadas por colectores. Estas personas buscan acrecentar su colección teniendo en su poder orquídeas únicas o especies puras (especies no híbridos, es decir, que no se crucen con otras especies). En Guatemala, muchas de las personas que venden orquídeas en calles, consiguen las mismas extrayéndolas de los bosques, arrancando las especies y dañando sus raíces. Con esto se tiene problemas ecológicos ya que afectan la diversidad de los ecosistemas y contribuyen a la extinción de especies nacionales.

En Guatemala hay alrededor de seis asociaciones de Orquideología, velando porque los coleccionistas tengan orquídeas ya sea, por descendencia de orquídeas de otros coleccionistas o de laboratorios que se dediquen a la propagación de especies. Como parte de su promoción, la Asociación de Orquideología (AGO) ofrece exposiciones a lo largo del año en las cuales diferentes coleccionistas, miembros de la asociación presentan las mejores orquídeas al público. Estas son juzgadas por la junta directiva y miembros de la AGO para premiar a las mejores orquídeas en base a parámetros de calidad tanto de la flor como de la planta en general. La finalidad de este tipo de exposiciones es concientizar a las personas de la belleza de estas flores, captar más miembros de la asociación y educar a las personas sobre los cuidados de las mismas para su conservación.

Las orquídeas también suelen utilizarse para rituales religiosos. Un ejemplo de ello es la ofrenda de orquídeas en el municipio de Jacaltenango, Huehuetenango. Para la festividad de candelaria, las comunidades hacen colecta de *Cattleyas* moradas de los bosques y se las llevan a la Virgen, adornando la Iglesia y los alrededores con estas orquídeas. Aunque esta es una tradición, las personas de las comunidades están conscientes del daño que se hace a esta especie en los bosques. Para ello buscan una alternativa de cultivo de orquídeas que les permita seguir la tradición sin dañar el ecosistema.

Ante la situación ecológica, social y económica, diversos laboratorios de Biotecnología como Biokrea (en Guatemala) se dedicaron a la propagación de orquídeas para su venta. Otro tipo de laboratorios de investigación como el de Biotecnología de la Universidad Rafael Landívar se dedican a la propagación de orquídeas para su reintroducción en bosques y reservas naturales. Sin embargo, el método tradicional para la propagación in vitro hace que las tasas de producción mensuales se vean afectadas por la contaminación o la falta de personal.

El tiempo de desarrollo de una orquídea es, en promedio, de 5 años, lo cual genera que los costos de producción de las mismas sean mayores que otras flores. Otra razón para el problema económico es el hecho que las orquídeas como *Phalaenopsis* y *Dendrobium*, las características de kioskos en centros comerciales, son de origen asiático por lo que estas deben ser importadas en Guatemala. En base a ello surge la iniciativa de implementar tecnología que permita optimizar la forma de cultivar orquídeas in vitro empleando la menor cantidad de personal. Ante esta situación se plantea lo siguiente. ¿Es posible diseñar un sistema de biorreactores de inmersión temporal en paralelo, construirlo para la propagación in vitro de la orquídea *Guarlanthe aurantiaca* e implementarlo a escala laboratorio?

2.1 Objetivos

2.1.1 Objetivo general

Diseñar, construir e implementar un sistema de biorreactores de inmersión temporal en paralelo para la propagación in vitro de la orquídea *Guarianthe aurantiaca* a escala laboratorio.

2.1.2 Objetivos específicos

- I. Establecer el sistema de filtración de aire para la esterilización de los medios empleados en el sistema de inmersión temporal.
- II. Diseñar los biorreactores donde se llevará a cabo la inmersión temporal.
- III. Establecer la presión de alimentación para el sistema de biorreactores de inmersión temporal.
- IV. Determinar el rendimiento del sistema de inmersión temporal a través del desarrollo de la orquídea *Guarianthe aurantiaca* por biorreactor.

2.2 Hipótesis

2.2.1 Hipótesis nula

Ho: no existe una diferencia significativa en el diseño, construcción e implementación de un sistema de biorreactores de inmersión temporal en paralelo para la propagación in vitro de la orquídea *Guarianthe aurantiaca* a escala laboratorio, respecto al método tradicional de propagación in vitro.

2.2.2 Hipótesis alternativa

Hi: con un nivel de confianza del 90% el diseño, construcción e implementación de un sistema de biorreactores de inmersión temporal en paralelo para la propagación in vitro de la orquídea *Guarianthe aurantiaca* a escala laboratorio, presenta mejoras respecto al método tradicional de propagación in vitro.

2.3 Variables

2.3.1 Variables dependientes

- a. Tiempo de inmersión
- b. Frecuencia de inmersión
- c. Flujo de alimentación de aire
- d. Costo

2.3.2 Variables independientes

- a. Propiedades físicas de las plántulas en el experimento
- b. Características físicas de tanques
- c. Formulación de medio líquido

2.4 Definición de Variables

2.4.1 Variables dependientes

Tiempo de inmersión

Definición conceptual: período de exposición. Es el tiempo en el que los tejidos vegetales son sumergidos en el medio líquido o en que el medio es adicionado a través de mangueras por efecto de presión y aireación. (Albarrán et al. 2014).

Definición operacional: es el tiempo en que el medio se adicionará a las orquídeas contenidas en los biorreactores a través de flujo de aire, ocasionando burbujeo para mejorar el contacto superficial entre el medio y tejido vegetal.

Frecuencia de inmersión

Definición conceptual: ocurrencia de cada inmersión durante un ciclo. Los ciclos por lo general son de 1 día y la frecuencia puede ser desde cada hora hasta por lo menos tres veces por día (Solórzano, 2016).

Definición operacional: cantidad de veces al día en que se repite el tiempo de inmersión de las orquídeas en los medios de cultivo dentro de los biorreactores.

Flujo de alimentación de aire

Definición conceptual: es el flujo volumétrico máximo de aire declarado de una unidad de ventilación que puede alcanzarse, con mandos integrados o con mandos separados suministrados conjuntamente, en condiciones ambientales estándar (20 °C) y a 101 325 Pa, habiéndose instalado la unidad completa (Mundo Compresor, 2018)

Definición operacional: cantidad de aire necesario, saliente del compresor o alimentador de aire, para efectuar el traslado del medio de cultivo hacia el frasco que contiene los tejidos de orquídeas.

Costo:

Definición conceptual: valor monetario de un artículo, objeto o servicio (RAE, 2018).

Definición operacional: valor monetario de cada uno de los componentes del sistema de inmersión temporal y en conjunto.

2.4.2 Variables independientes

Propiedades físicas de las plántulas en el experimento

Definición conceptual: se denomina plántula al tejido vegetal joven luego de brotar la semilla (RAE, 2018). Osorio (2015), establece que las propiedades físicas son aquellas medibles sin que se cambie la composición química o la identidad de la sustancia.

Definición operacional: las propiedades físicas de la planta se atribuyen la altura de la plántula, número de hojas, número de raíz, color de raíz, color de hojas, grosor de raíz, textura de raíz, textura de hojas, entre otros.

Características físicas de tanques:

Definición conceptual: el tanque es el contenedor dentro del cual se deposita el tejido vegetal. Las propiedades físicas son las especificaciones de los contenedores. (Solórzano, 2016).

Definición operacional: estas engloban todos los factores que influyen en el diseño y construcción del tanque, tomando en cuenta las dimensiones del contenedor,

capacidad volumétrica, el material del mismo, características de canasta de retención de plántulas, características de la manguera donde pasará el medio líquido

Formulación de medio líquido:

Definición conceptual: el medio líquido es la sustancia con nutrientes, vitaminas, hidratos de carbono y minerales que permiten el desarrollo de la planta en la propagación in vitro. Se utiliza líquido para prescindir de los agentes gelificantes, reducir costos y mejorar el crecimiento y desarrollo de tejidos vegetales así como su capacidad de adaptación a condiciones ambientales futuras (Albany et cols, 2015).

Definición operacional: es la concentración de cada uno de los reactivos y compuestos químicos adicionados para elaborar el medio de cultivo líquido adecuado para el desarrollo de los tejidos de orquídeas dentro de los biorreactores.

2.5 Alcances

La investigación se centró en el diseño, construcción e implementación de un sistema de biorreactores de inmersión temporal a escala de laboratorio para el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agrícolas e Instituto de Investigación y Protección sobre el ambiente natural y sociedad (IARNA) de la Universidad Rafael Landívar.

La evaluación del presente estudio se centró en la orquídea *Guarianthe aurantiaca* ya que es de las especies guatemaltecas más abundantes y para no bloquear ningún objetivo del proyecto principal que se basa en la conservación de especies de orquídeas guatemaltecas. La siembra de semillas de la especie y las pruebas de los biorreactores en paralelo fueron realizadas en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Rafael Landívar

Los resultados del desarrollo de la orquídea *Guarianthe aurantiaca* en este proyecto serán utilizados para realizar pruebas con otras especies de orquídeas y posteriormente con otros tipos de plantas vegetales según sea el enfoque de estudio del laboratorio de Biotecnología.

El trabajo de investigación se centró en la evaluación de crecimiento de la orquídea *Guarianthe aurantiaca*, estableciendo un tiempo de inmersión temporal y una frecuencia de inmersión determinadas, sin hacer variaciones en dichas condiciones. Esto con la finalidad de evaluar la implementación adecuada del sistema de inmersión temporal.

El sistema de inmersión temporal se planteó con la misma capacidad de plantas que en el método tradicional (número similar de plantas en ambos métodos) para evaluar parámetros cuantitativos de número de hojas, número de raíces y altura de planta.

2.6 Límites

Entre las limitantes que se tuvieron para la elaboración de este proyecto se tiene el espacio a ocupar del sistema de inmersión temporal dentro de la cámara de crecimiento de orquídeas en el laboratorio de Biotecnología, URL. El diseño de biorreactores debía contemplar el espacio donde iba a ubicarse y que no interrumpiera con el crecimiento de otros cultivos in vitro.

Otra fue la cantidad de ensayos realizados con la especie *Guarianthe aurantiaca* debe ser la menor posible para evitar su contaminación. Esto con el fin de conservar la mayor cantidad de especies y evitar su extinción dentro del laboratorio.

En cuanto a la obtención de información la limitante fue por parte de empresas que se dedican a la propagación in vitro con biorreactores, ya que por motivos políticos no pudo realizarse visita al lugar ni obtener la información completa sobre el modo actual de operar los biorreactores en Guatemala.

Se estableció únicamente un tiempo de inmersión y una frecuencia de inmersión para el estudio en su fase de experimentación debido a la duración de dicha fase. Estas variables se mantuvieron constantes para el sistema de inmersión temporal.

Se usó de una formulación de medio Murashige y Skoog (MS) sin la adición de reguladores de crecimiento ni otros componentes ajenos al medio (carbón activado y

ácido cítrico) para la fase de experimentación del proyecto. Esta variable se mantuvo constante para el sistema de biorreactores de inmersión temporal.

Para el estudio de rendimientos del sistema de biorreactores de inmersión temporal respecto al método tradicional, se tomaron en cuenta únicamente tres variables cuantitativas: número de hojas, número de raíces y altura de planta. No se tomaron en cuenta parámetros cualitativos (color, aspecto de hojas, aspecto de raíces, porcentaje de humedad en plantas, humedad relativa en el biorreactor).

2.7 Aportes

A la Universidad Rafael Landívar permitiendo la generación de información de forma dinámica como aporte para catedráticos, estudiantes e investigadores para la posterior implementación de metodologías donde este equipo pueda ser parte de la investigación, práctica o proyecto a realizar.

El aporte en el ámbito ecológico es a la disminución de contaminación ambiental evitando la manipulación excesiva de frascos, lo cual disminuye la contaminación en los medios de cultivo, reduciendo el riego de contaminación a suelos y agua.

A investigadores en el campo de biotecnología como una opción de avance de forma eficiente para la propagación in vitro de orquídeas en Guatemala y otros países. A su vez permite el desarrollo y estudio de otros tipos de tejidos vegetales.

A empresas privadas con giro del negocio referente a la propagación in vitro de especies de comportamiento similar al de las orquídeas, siendo un equipo que compite con los que existen en el mercado actualmente.

A estudios en instituciones para generar información de innovación tecnológica para enfoques de propagación in vitro de material vegetal a niveles de producción similares a este estudio.

III. MÉTODO

3.1 Sujetos

Investigadores del laboratorio de biotecnología con experiencia en el cultivo in vitro de plantas: Licda. María Mercedes López-selva quien tiene conocimiento sobre protocolos de desinfección y transferencia de orquídeas in vitro en la Universidad Rafael Landívar.

Profesionales que tienen experiencia en el conocimiento agronómico y botánico así como en el cultivo in vitro de especies: Ing. Estuardo Archila, quien es ingeniero agrónomo graduado de la Universidad San Carlos de Guatemala y colaborador en la Universidad Rafael Landívar. Trabajó un tiempo en el laboratorio Biokrea, en San Lucas.

Ingeniero Francisco Gularte y su conferencia de Biorreactores y su aplicación industrial y agrícola llevada a cabo el día jueves 12 de abril del 2018 en la Universidad San Carlos de Guatemala.

3.2 Unidades de análisis

Instalaciones del laboratorio de Biotecnología de la Universidad Rafael Landívar.

IARNA (2013) Protocolo de elaboración de medios para cultivo in vitro de orquídeas y protocolo para desinfección de cápsulas En Manual de laboratorio de Biotecnología.

Solórzano, Richard (2016) Trabajo de Graduación titulado: “Diseño y construcción de un sistema de biorreactores de inmersión temporal neumática para la multiplicación de *Ananas comosus var. roja trujillana*”.

3.3 Reactivos, instrumentos y equipo utilizados

3.3.1 Reactivos

- Medio MS líquido
 - 50 ml solución Stock Macronutrientes
 - 50 ml solución Stock Calcio

- 1 ml solución Stock Micronutrientes
- 5 ml solución Stock Hierro
- 5 ml solución Stock Vitaminas
- 15g sacarosa
- Alcohol al 70% y 95%
- Hipoclorito de sodio al 5%
- Agua desmineralizada





3.3.2 Instrumentos






- Pinzas
- Mechero de alcohol al 95%
- Vidrios para manipulación de explantes
- Bisturí
- Papel estéril
- Papel milimetrado

3.3.3 Equipo

Tabla 2. Equipo utilizado para realización de procedimientos

Equipo	Imagen	Utilidad	Especificaciones
Estufa		Calentar y realizar los medios MS para la orquídea <i>Guarianthe aurantiaca</i> .	Modelo 8P8857100 Serial No. C371001310651401 Voltaje 100-120V Corriente: 13 Amperios Frecuencia: 50/60 Hz Fase 1 Ensamblado en China

Equipo	Imagen	Utilidad	Especificaciones
Campana de flujo laminar		Realizar las siembras de orquídea en biorreactores, agregar medio a biorreactores y ensamblar sistema de inmersión temporal.	Forma científic
Balanza analítica		Pesar los componentes del medio MS, tanto para las soluciones madre como para el azúcar a utilizar.	OHAUS plus P110s Capacidad: 110g Confiabilidad: 0.1 Capacidad de tarado Precisión: 0.1 Tolerancia: ±0.2 Sensibilidad: 10-30°C ±2ppm/°C Suministro energía: 100-240VAC
Potenciómetro		Medir el pH del medio hasta que alcance 5.6-5.8	Dist 3 Rango: 0-1999µS/cm/1µS/cm Soln buffer: 1413µS/cm Temperatura: 0-50°C Batería: 4 x 1.5V alcalina Duración 200 horas
Autoclave		Esterilizar equipo y medio MS	Market Forge Sterilmatic 120 Volts 50/60 Hertz 8.75 Amperios 1050 Watts

Equipo	Imagen	Utilidad	Especificaciones
Compresor de aire		Suministro de aire para sistema de inmersión temporal de biorreactores en paralelo	Modelo: NCA-2 1 pieza Hasta 300psi Corriente: 10 Amperios Fuente de poder: 12 voltos corriente directa Cable de 2.85m para conectar a electricidad Manufacturado en China.
Temporizador		Monitorear y programar el tiempo de inmersión y la frecuencia de inmersión en sistemas de inmersión temporal.	Digital de 8 eventos Voltech 48386 Frecuencia 60 Hz Corriente 15 Amperios Fuente de poder: 125 voltos Hecho en China
Frascos de vidrio con tapadera		Biorreactor para medio y para brotes de orquídea Guarianthe aurantiaca.	C1468 Capacidad: 15 onzas Material: vidrio no pirex Material tapa: metalica Marca Vigua
Filtros de aire		Filtrar el aire utilizado para elevar el medio hacia biorreactor con brotes de orquídea en el sistema de inmersión temporal.	Modelo: FIL 90x1 Altura 1 pulgada Porosidad: 0.023micrometros Eficiencia: 99.99% Conexión de 5/16 pulgadas
Manguera		Tubería por donde será suministrado el aire hacia los biorreactores.	Utilizada para riego por goteo

Fuente: elaboración propia (2018)

3.4 Procedimiento

3.4.1 Protocolo para elaboración de medio Murashige y Skoog (MS)

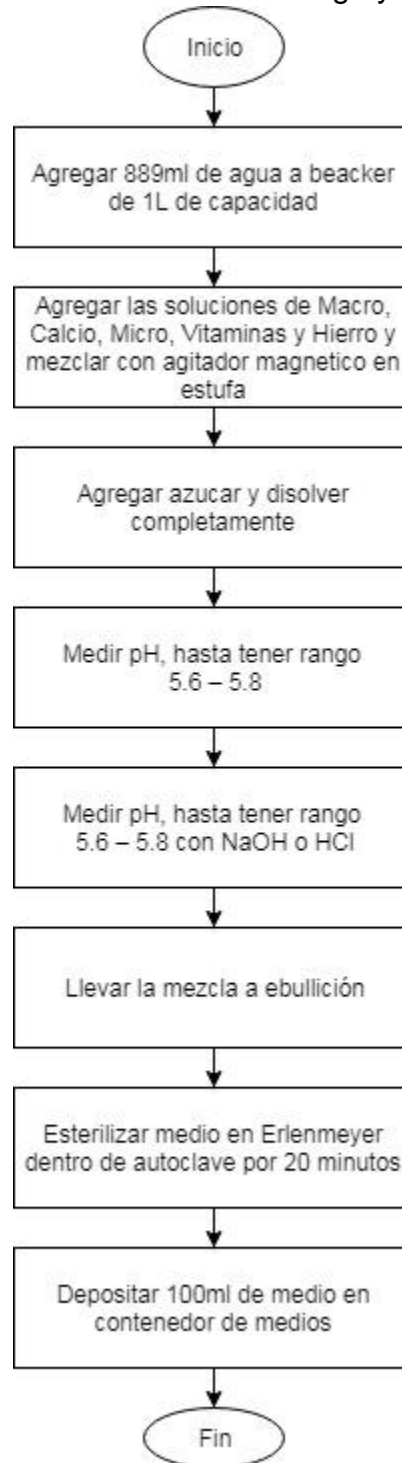


Diagrama 1. Protocolo para la elaboración del medio Murashige y Skoog (MS)

Fuente: elaboración propia (2018)

3.4.2 Protocolo de desinfección de cápsula cerrada

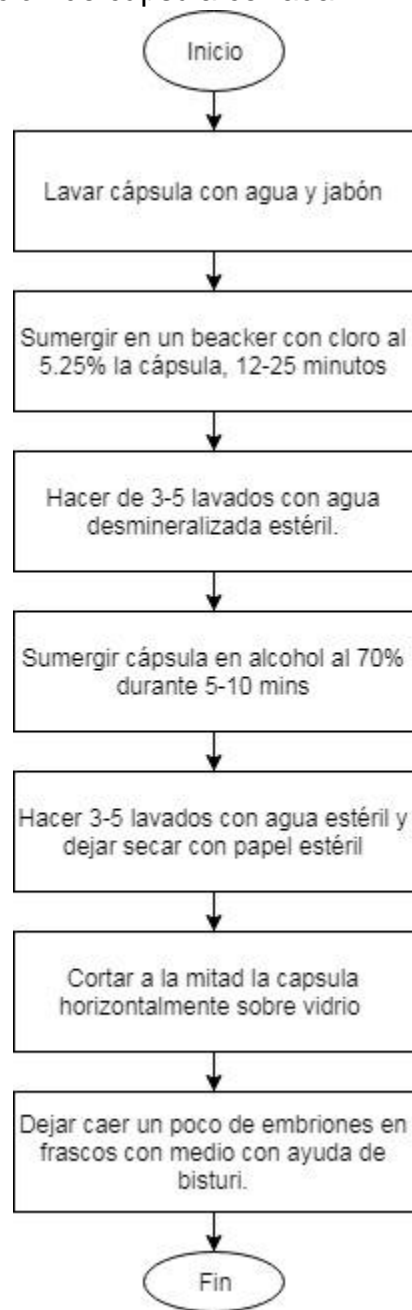


Diagrama 2. Protocolo para desinfección de cápsula cerrada

Fuente: elaboración propia (2018)

3.4.3 Metodología tradicional de siembra de orquídeas

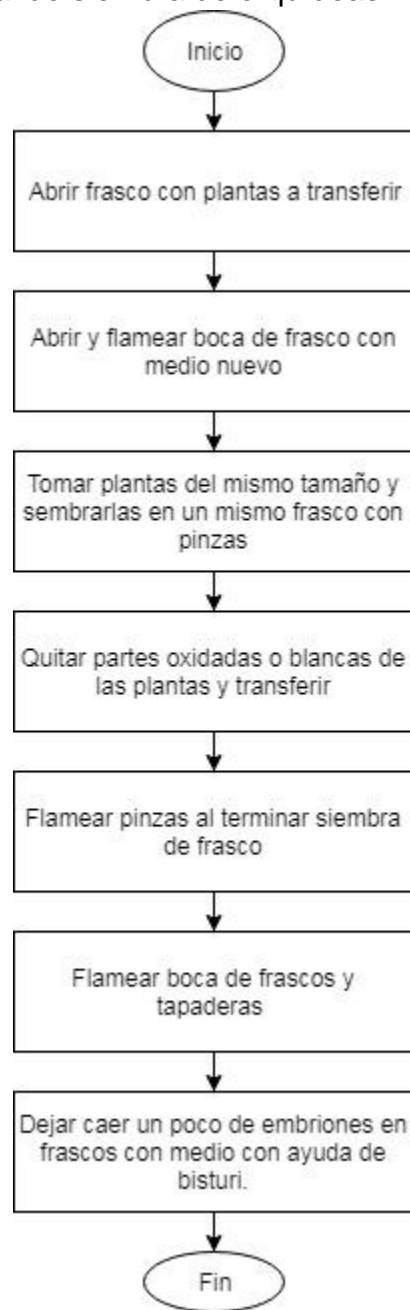


Diagrama 3. Metodología tradicional de siembra de orquídeas

Fuente: elaboración propia (2018)

3.4.4 Metodología para manejo de explantes

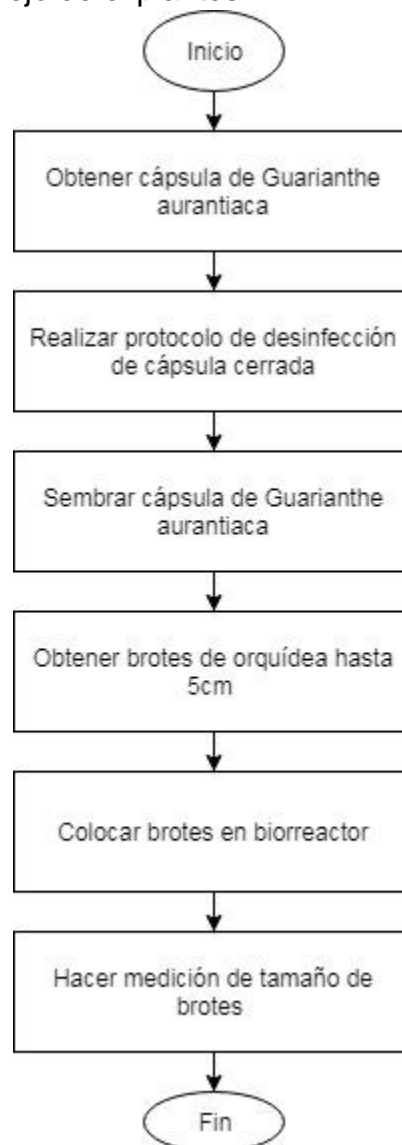


Diagrama 4. Metodología para manejo de explantes

Fuente: elaboración propia (2018)

3.4.5 Metodología para instalación de SIT

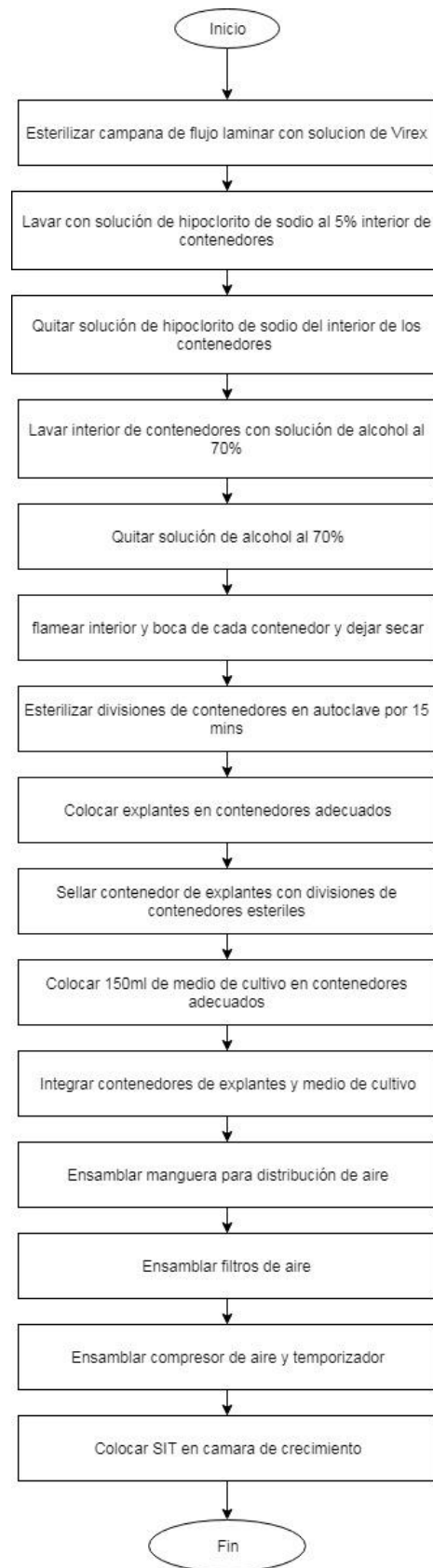


Diagrama 5. Metodología para instalación de SIT. Fuente: elaboración propia (2018)

3.5 Diseño y metodología estadística

3.5.1 Diseño experimental

Tabla 3. Diseño experimental

Experimento	Nombre	Descripción	Unidades de análisis	Tratamientos
Experimento No. 1	Sistema de biorreactores de inmersión temporal en paralelo	Determinación del crecimiento de brotes de orquídea <i>Guarianthe aurantiaca</i> en biorreactores	Número de brotes por biorreactor Crecimiento de brotes por biorreactor	12 biorreactores

Fuente: elaboración propia (2018)

3.5.2 Experimentos

Se trabajará tomando como experimento: la construcción e implementación del sistema de biorreactores de inmersión temporal en paralelo para la propagación in vitro de la orquídea *Guarianthe aurantiaca*. Para ello se tendrá un tratamiento compuesto por 12 biorreactores conectados en paralelo y las unidades de análisis a considerar corresponden al crecimiento de brotes por biorreactor y número de brotes por biorreactor.

3.5.3 Tratamientos y repeticiones del experimento

En el diseño experimental de este proyecto se procederá a trabajar un sistema de inmersión temporal con 12 biorreactores conectados en paralelo. Las condiciones de operación de los 12 biorreactores son exactamente iguales (Iluminación, temperatura, flujo de aire, tiempo de inmersión, frecuencia de inmersión y cantidad de filtros por biorreactor). Para ello el tratamiento corresponde a los 12 biorreactores y no habrá repeticiones.

La iluminación del sistema de inmersión temporal será de 12 horas al día.

La temperatura de la cámara de crecimiento donde se ubica el sistema de inmersión temporal será de 23°C. Para lo cual se tiene ya ajustado el venteo de aire para tener la humedad ambiente necesaria.

El lapso de evaluación del sistema de inmersión temporal será de 1 mes. El tiempo de inmersión será de 2 minutos y la frecuencia de inmersión será de dos veces diarias.

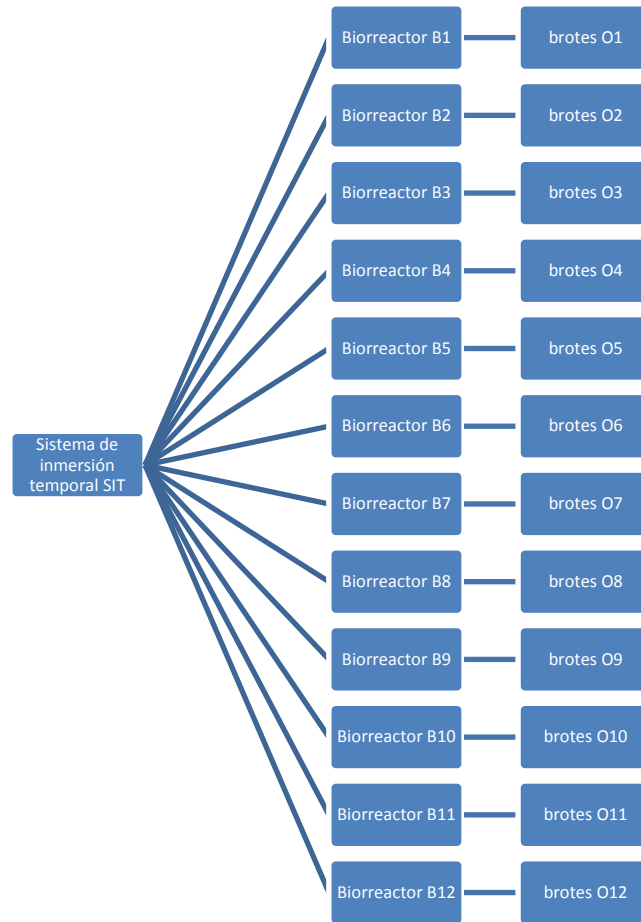


Diagrama 5. Diseño experimental

Fuente: elaboración propia (2018)

3.5.4 Descripción de las unidades experimentales

La experimentación se realizó en base a la unidad experimental: Crecimiento y desarrollo de la orquídea *Guarianthe aurantiaca*.

En cuanto al crecimiento se observa el tamaño de hojas y raíces alcanzado durante el tiempo de experimentación. En cuanto al desarrollo se observa características físicas de la planta: color de hojas, color de raíz y textura adecuada.

3.5.5 Variable respuesta

Tabla 4. Variable respuesta

Experimento	Variable respuesta
Construcción de biorreactores y sistema de inmersión temporal	No. de explantes obtenidos por biorreactor del sistema de inmersión temporal Media de tamaño de brotes obtenidos por biorreactor (de hojas a raíz) Media de número de hojas por brote Media de número de raíces por brote

Fuente: elaboración propia (2018)

3.5.6 Metodología de análisis

Media aritmética

Se utilizó la media aritmética para determinar el número de explantes obtenidos en el sistema de inmersión temporal y el tamaño de los explantes obtenidos de la orquídea *Guarianthe aurantiaca* con la fórmula:

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

Donde \bar{X} representa la media aritmética, X_i los valores obtenidos y n el número de datos.

Rendimiento porcentual

Se utilizó el rendimiento porcentual para obtener el rendimiento del sistema de inmersión temporal a través del crecimiento de explantes obtenido por tanque con la fórmula:

$$R = \left(\frac{H_f}{H_o} \right) (100\%)$$

Donde R es el rendimiento obtenido, H_f es la altura final de plantas en el experimento y H_o es la altura inicial de plantas en el experimento.

Desviación estándar

Se utilizó la desviación estándar para establecer la dispersión entre los datos obtenidos respecto al número de explantes obtenido por tanque con la fórmula:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Donde s es la desviación estándar, x son los valores obtenidos, \bar{x} es la media obtenida y n es el número de tratamientos (biorreactores en el sistema de inmersión temporal).

IV. RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos para el presente trabajo de graduación:

Tabla 5. Sistema de filtrado de aire

Ubicación	Tipo de filtro usado	Características	Cantidad
Salida del compresor, entrada al suministro de aire por biorreactor	Filtro de membrana PFTE esterilizado	Porosidad: 0.2µm	1
Salida de aire por biorreactor en parte superior e intercambio gaseoso.			1

Fuente: elaboración propia (2018)

Tabla 6. Condiciones del biorreactor

Condiciones	Valor
Tiempo de inmersión	2 minutos
Frecuencia de inmersión	2 veces al día
Duración de fase de experimentación	28 días
Temperatura ambiente	23°C
Tasa de contaminación	8.33%

Fuente: elaboración propia (2018)

4.1 Sistema de biorreactores de inmersión temporal



Ilustración 12. Sistema de biorreactores de inmersión temporal. Fuente: elaboración propia (2018)

4.2 Biorreactores

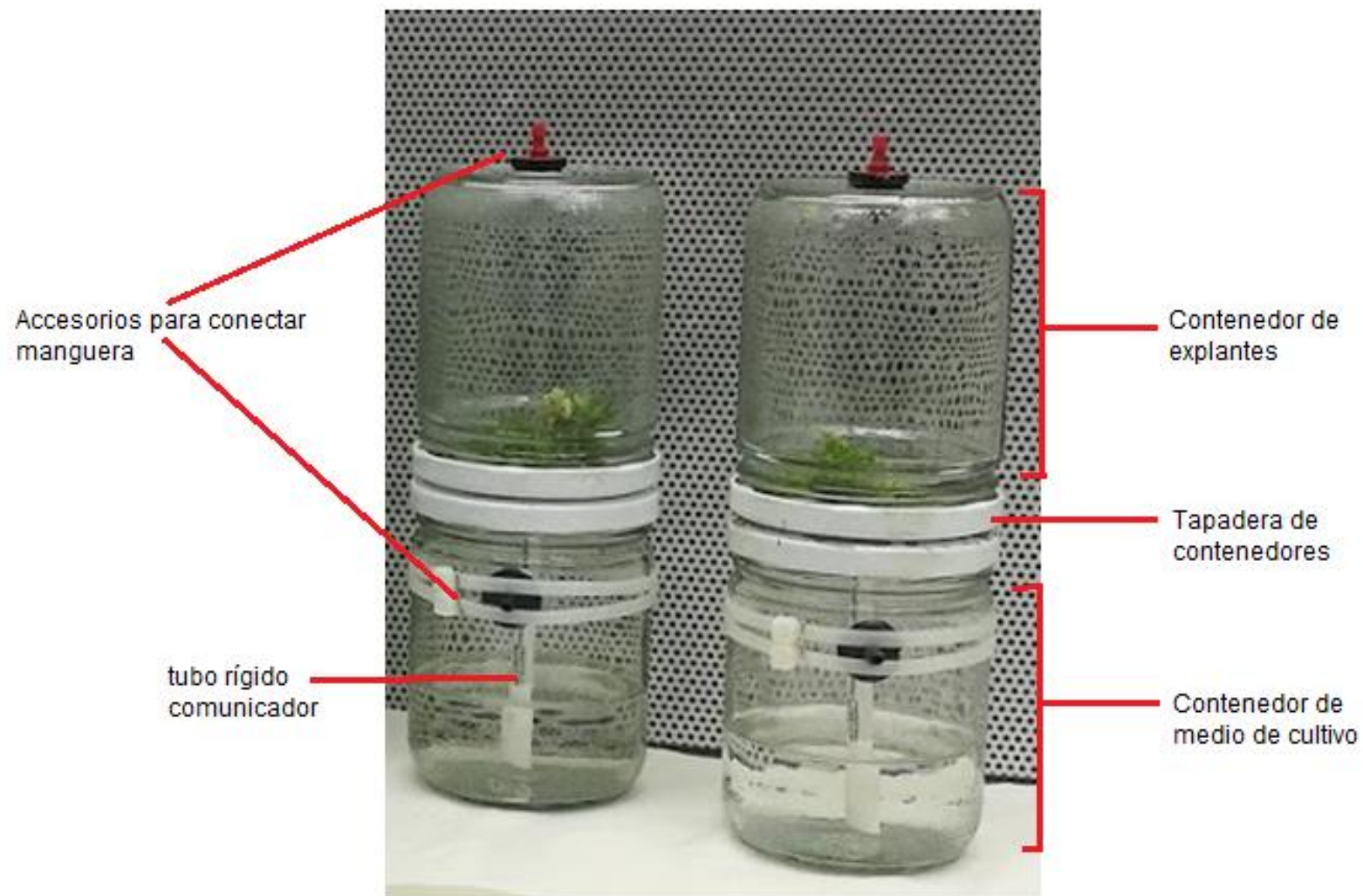


Ilustración 13. Diseño de Biorreactor para SIT. Fuente: elaboración propia (2018)

4.3 Proceso de SIT operando

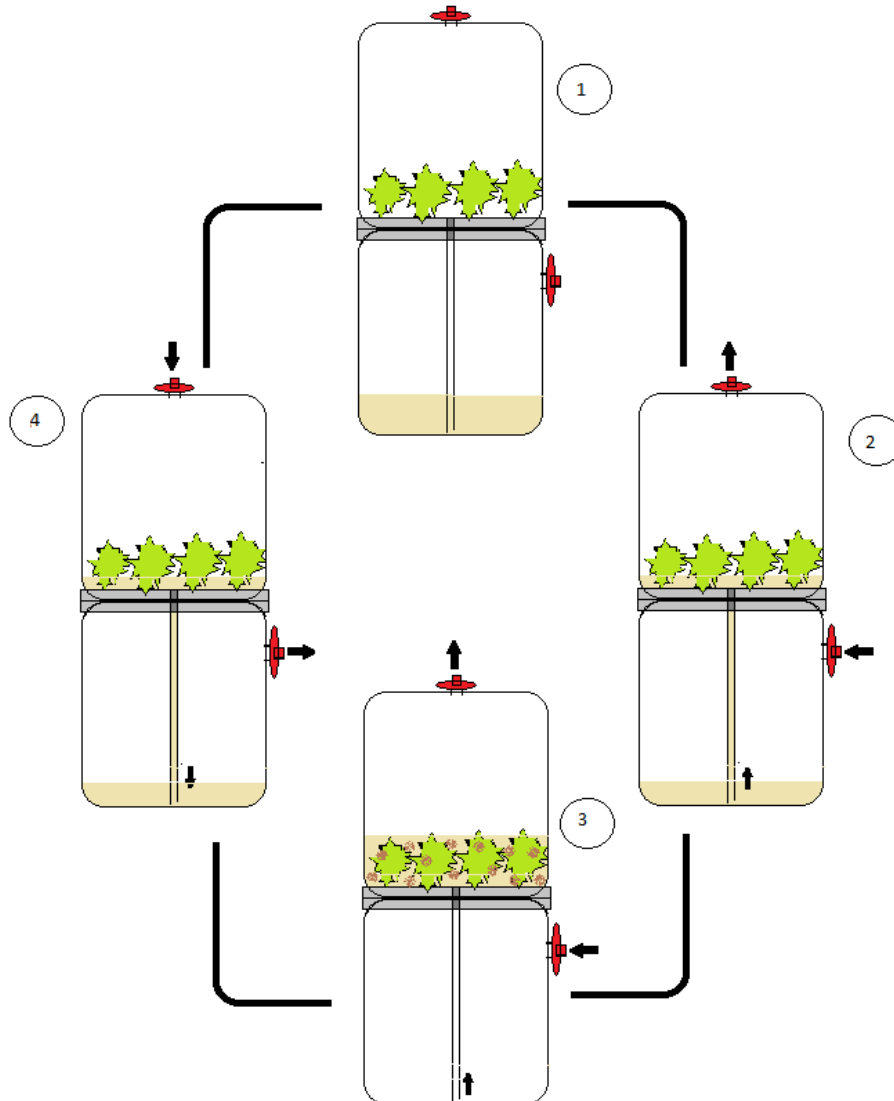


Ilustración 14. Etapas de proceso del sistema de biorreactores de inmersión temporal Fuente: elaboración propia.(2018)

Tabla 7. Presión en sistema de biorreactores de inmersión temporal

Dato de Presión	Valor
Caudal de aire	$89.38\text{cm}^3/\text{s} \pm 0.638\text{cm}^3/\text{s}$
Velocidad de flujo	$0.625\text{cm}/\text{s} \pm 0.012\text{cm}/\text{s}$
Pérdidas totales por fricción	0.117m
Presión de alimentación para SIT	0.012MPa (1.74 lb _f /pulg ²)

Fuente: elaboración propia (2018)

Tabla 8. Rendimiento obtenido de explantes de *Guarianthe aurantiaca*

Rendimiento	Biorreactores	Método tradicional	Rendimiento
Promedio de altura de explantes	1.6cm	1.5cm	6.67%
Promedio de número de hojas	6	5	20.0%
Promedio de número de raíces	3	2	50.0%
Promedio número de explantes	55	54	1.85%

Fuente: elaboración propia (2018)

Tabla 9. Análisis estadístico para variables en los dos sistemas evaluados

Medición	Media MT	Media SIT	Nivel de significancia	T de Student	Wilcoxon (M-W)
Altura de plantas	1.46	1.58	0.1	0.0974	0.4118
Número de hojas	5.06	6.48	0.1	-4.70	0.0003
Número de raíz	1.94	2.59	0.1	-4.12	<0.0001

Fuente: elaboración propia (2018)

Tabla 10. Análisis de costo del sistema de inmersión temporal

Variable	Valor
Tiempo de producción de orquídeas en laboratorio con método tradicional	2 a 5 años
Costo de sistema de inmersión temporal	Q740.00
Retorno de inversión con SIT	5 años
Costo para producción de orquídeas desde siembra hasta desarrollo de brotes para ambos métodos (tradicional y SIT)	Q0.14/planta
Costo para producción de orquídeas despues de salir de unidad de cultivo (SIT)	Q0.38/planta
Costo para producción de orquídeas despues de salir de unidad de cultivo (método tradicional)	Q0.71/planta
Costo estimado de energía anual	Despreciable (Q0.0004/planta)
Costo anual por cambio de filtros	Q0.09/año
Total de dinero ahorrado utilizando SIT en lugar de método tradicional	Q157.45

Fuente: elaboración propia (2018)

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El objetivo principal del presente trabajo de graduación consistió en diseñar, construir e implementar un sistema de biorreactores de inmersión temporal en paralelo para la propagación in vitro de la orquídea *Guarianthe aurantiaca* a escala laboratorio.

Se hace la referencia que el biorreactor fue implementado para estudio de orquídeas, el cual buscaba acelerar de forma significativa el período de desarrollo y crecimiento de plantas, aportando a las mismas los nutrientes esenciales que podrían encontrar en el medio natural, de forma selecta y en ambiente controlado. Este desarrollo en sistema de inmersión temporal, pretendía además, mejorar significativamente el desarrollo de orquídeas respecto al método tradicional de cultivo in vitro con agar (medio semisólido).

Para el diseño del sistema de biorreactores de inmersión temporal se tomó como referencia diseños existentes en el mercado y en estudios de otras investigaciones. Los principales tipos de biorreactores encontrados fueron los de frascos gemelos y RITA.

El proyecto se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología en la Universidad Rafael Landívar. Es necesario mencionar que factores como iluminación y temperatura ambiente dentro de la cámara de crecimiento, donde se llevó a cabo la experimentación y funcionamiento del SIT, estaban establecidos como parte de los parámetros del manejo del laboratorio y no fueron manipulados para la experimentación del proyecto. La iluminación fue de 12 horas diarias y la temperatura de 23°C.

Primero se tomó en cuenta la preparación del medio de cultivo y la etapa inicial de germinación de la orquídea. El primer paso descrito en la metodología consistió en elaborar el medio de cultivo para el desarrollo de la orquídea *Guarianthe aurantiaca*. El medio de cultivo seleccionado en el método tradicional fue el Murashige & Skoog, un medio rico en micronutrientes, macronutrientes, calcio, hierro, hidratos de carbono y vitaminas (como se observa en la tabla 1). En el método tradicional, al medio de cultivo se le agrega agar-agar como gelificante para obtener un medio semi-sólido. Sin

embargo, en el medio de cultivo para el sistema de inmersión temporal, la característica principal consistía en que debía ser líquido, por lo que no se agregó el agar-agar.

Posterior a la elaboración del medio de cultivo, se procedió a esterilizar el mismo a través de una autoclave, la cual esteriliza a partir de vapor a presiones elevadas por intervalos cortos de tiempo (121°C a 15 minutos). Con ello se obtiene un medio de cultivo en condiciones asépticas para crecimiento de material vegetal y se evita que haya proliferación de agentes contaminantes.

Luego de preparar el medio de cultivo, se procedió a desinfectar la cápsula que contenía las semillas de la unidad experimental (como menciona el segundo esquema de la metodología). La cápsula, al estar cerrada, se lavó con agua y jabón superficialmente, seguido de una sumersión en hipoclorito de sodio al 5%, lavado con agua, sumersión en alcohol etílico al 70% y secado de capsula con papel estéril (previamente esterilizado en autoclave). Completada la desinfección de la cápsula, se procedió a sembrar las semillas en unidades de cultivo del método tradicional (medio semisólido). No se ingresó directo a los biorreactores debido a que, en base al desarrollo de orquídeas propagadas in vitro, la semilla aún no tiene raíces ni hojas que ayuden a absorber los nutrientes que necesita del medio líquido. Por lo tanto, necesita estar rodeada de los nutrientes para inducir la germinación. Se mantuvo la semilla dentro de las unidades de cultivo hasta que el desarrollo de germinación era de 1 cm de largo, donde se pudo observar desarrollo del primer cotiledón (hoja que aporta nutrientes a la semilla para su desarrollo).

Previo a establecer el sistema de inmersión temporal, era necesario establecer la cantidad de biorreactores a implementar. Como se mencionó en el marco teórico, la propagación in vitro a escala industrial mencionó el uso de 31,250 plantas de orquídea mensual, mientras que a escala laboratorio se manejaron de 320 a 7,600 orquídeas por especie. Debido a la especificación del presente trabajo hacia la escala laboratorio, el número de plantas contenidas en el biorreactor debía ser menor a 7,600 y mayor a 320, por lo que se estableció un promedio de 650 plantas contenidas en 12 biorreactores (54 plantas promedio contenidas en cada uno), tomando en cuenta tener la misma

capacidad en el sistema propuesto que en el método tradicional. Esta fue la base para el planteamiento del diseño experimental (ver tabla 3).

Otro de los parámetros a establecer previo a la instalación del sistema de inmersión temporal fueron las variables de tiempos y frecuencias de inmersión. Para ello se consultó bibliografía con estudios similares aplicados a orquídeas. Como resultado, Tirado et cols (2005), establecieron que para la orquídea *Phalaenopsis*, los tiempos y frecuencias de inmersión fuera de 1 minuto cada 4 horas respectivamente. Alvarado (2000) menciona que para pruebas con el género *Guarianthe*, el tiempo y frecuencia de inmersión debía ser de 2 minutos cada 6 horas respectivamente. Se pudo observar que el tiempo y frecuencia de inmersión es específico de cada orquídea para condiciones controladas. Como la especie que se tomó como unidad experimental pertenece al género de *Guarianthe*, se optó por utilizar estas condiciones de tiempo de inmersión de 2 minutos durante dos veces por día (cada 6 horas en período de iluminación), como se muestra en la tabla 6 de resultados.

El primer objetivo específico del trabajo de graduación consistió en establecer el sistema de filtración de aire para la esterilización de los medios empleados en el sistema de inmersión temporal. La importancia de este objetivo radica en la efectividad y duración de condiciones estériles para evitar la contaminación de los medios de cultivo dentro de los SIT.

El sistema en general debía mantenerse estéril ya que, como se mencionó en el marco teórico, los medios de cultivo están elaborados a partir de sales y compuestos orgánicos que proporcionan a las plantas, los nutrientes necesarios para su desarrollo. Debido a la riqueza de nutrientes, otros microorganismos como hongos y bacterias pueden proliferarse. Esto afecta directamente a los organismos de estudio (plantas) ya que las esporas de los microorganismos cubren a la misma y, a menos que se tenga un protocolo de desinfección de plantas efectivo, deberá desecharse planta y medio (a través de la esterilización en autoclave).

Para prolongar las condiciones estériles en el operar del SIT se añadió al sistema, filtros de aire con la finalidad de bloquear entrada de partículas contaminantes al medio de cultivo. Era importante determinar qué tipo de filtro y la porosidad del

mismo para tener un mejor resultado. De acuerdo con la literatura, el material mejor adecuado para filtración de aire es PTFE (politetrafluoretileno). Se trata de un polímero impermeable, inerte y permanentemente hidrofóbico, por lo que es ideal para filtración de mezcla aire-gas (Figura 8 del marco teórico). Este material retiene partículas mediante la orientación de los átomos de flúor en la cadena de carbonos. Se seleccionó un filtro con 0.22 μm de porosidad con base a criterios escogidos por otras investigaciones, donde se establece que esa porosidad retiene de mejor forma las partículas de polvo e impurezas que promuevan la contaminación para los sistemas de inmersión temporal. Otra característica de este material es su capacidad para ser esterilizado en autoclave. Sin embargo, la vida útil del filtro escogido es de 1 año.

Posterior a la selección del material para los filtros de venteo, se estableció la cantidad mínima adecuada que debía tener el SIT. Se planteó un diseño con dos filtros (ver tabla 5 de resultados). El primero localizado en la salida de aire del compresor y antes de la distribución de aire de entrada para cada biorreactor. El segundo, ubicado a la salida de distribución de aire de cada biorreactor proveniente del contenedor de explantes. Este segundo filtro quedó abierto al ambiente en uno de sus extremos para permitir el intercambio gaseoso adecuado a los explantes sin exponerlos directamente al ambiente, reduciendo la probabilidad de contaminación.

Dentro de las ventajas observadas en el desarrollo de dicha fase del proyecto se consideró la efectividad de los dos filtros en el sistema en un período de 28 días. Se determinó que dos filtros era la cantidad mínima necesaria para el buen funcionamiento del SIT, debido a que la tasa de contaminación fue menor al 10%. En el laboratorio de biotecnología de la Universidad Rafael Landívar, se busca que a través de la propagación in vitro, las orquídeas se introduzcan a los ecosistemas. Para ello pretende que las tasas de supervivencia en cultivo in vitro por especie sea por lo menos de 90%. Es decir, que permite que el 10% de los frascos por especie se contaminen. Por lo tanto, se acepta una tasa de contaminación de 8.33%. Las causas de la contaminación se describen posteriormente.

Por otro lado, una de las principales desventajas de tener dos filtros en el sistema y no dos filtros por biorreactor dentro del mismo (24 filtros en el sistema),

implica que no podía tratarse cada biorreactor por individual al momento de manipularlo. Esta fue una de las complicaciones en la fase de experimentación atribuida a la manipulación de todo el sistema luego de armarlo. Primero debía armarse todo el sistema y luego trasladarlo en conjunto a la cámara de crecimiento. Además, si un biorreactor se contaminaba, afectaba todo el sistema de distribución de aire al momento de operar el SIT, lo cual aumentaba el riesgo de contaminar los demás biorreactores. Este problema puede evitarse colocando un filtro a la entrada de aire de cada biorreactor, y uno a la salida de cada uno.

Un factor importante que se tomó en cuenta aparte de la cantidad de filtros fue la altura adecuada a la que debe colocarse el compresor de aire, evaluando cómo se relaciona la contaminación respecto al nivel del suelo en un cuarto cerrado. Los médicos, al momento de realizar cirugías establecen que las manos e instrumentos deben estar por lo menos 1 metro respecto al suelo debido a la acumulación del polvo en la superficie del mismo. Este criterio se utilizó ya que el compresor era liviano y menor a 80m^2 .

La primera vez que se realizó el experimento con el SIT, no se tomó en cuenta la altura adecuada que se menciona y se dejó el compresor a nivel del suelo. Luego de una semana, todo el SIT se contaminó (100% de contaminación). Se atribuyó como una de las causas, que el compresor al transportar el aire, podría tener partículas de polvo que fueran de tamaño menor a $0.22\mu\text{m}$ y pasaran a través del filtro de venteo ocasionando contaminación por estar en un lugar altamente concentrado de impurezas. Otra de las causas fue la forma de esterilizar el sistema, la cual no se realizó adecuadamente. Luego de ajustar la altura del compresor y realizar la experimentación con el SIT nuevamente, se observó que no hubo contaminación significativa en el SIT. Por lo tanto, la modificación se consideró aceptable.

Luego de establecer el sistema de filtración de aire, se llevó a cabo el segundo objetivo específico, el cual consistía en diseñar y construir los biorreactores donde se llevará a cabo la inmersión temporal. Para la construcción del equipo se procedió a plantear *a)* los biorreactores (ilustración 13) y *b)* el conjunto de accesorios para la aireación del mismo, integrando el sistema de inmersión temporal (ilustración 12).

Al analizar el diseño de los SIT existentes se decidió adecuar un sistema utilizando menor cantidad de recursos. Con ello se obtendría un diseño original y distintivo. Dada la complejidad de los biorreactores evaluados al tener dos frascos separados (uno para explantes y otro para medio de cultivo distanciados entre sí), se planteó un sistema que integró en un elemento ambas funciones (con diferencias de diseño de los biorreactores RITA). De esta forma se acortó la distancia para transporte del medio de cultivo y material necesario para llevar a cabo el paso del mismo.

El biorreactor se diseñó, integrando los dos contenedores, en recipientes de boca ancha, los cuales están conectados a través de un tubo rígido que permite el paso del medio de cultivo a los explantes en el tiempo de inmersión. El material utilizado para los contenedores de explantes y medio fue vidrio para favorecer la entrada de luz en el contenedor de explantes (ubicado en la parte superior). El tubo rígido es de material plástico y está sostenido por medio de las tapas de cada contenedor, las cuales están unidas entre sí y sirven como división para cada uno.

Dentro de las ventajas de diseño respecto a las de modelos en el mercado se tiene el espacio ocupado por biorreactor. Este modelo propone aprovechar el espacio en la superficie donde se instale, colocando mayor cantidad de biorreactores por área que si se tuviera un diseño con dos contenedores separados (como frascos gemelos). Además se aprovecha el espacio a lo alto y teniendo mejor exposición de explantes a la luz. Otra ventaja de tener los contenedores de forma vertical es que el sistema solo requería presión para elevar el medio de cultivo, pero para descender, solo bastaba con la gravedad.

Los biorreactores se plantearon con dos contenedores. Los contenedores ubicados en la parte inferior sirven para colocar en ellos el medio de cultivo y tienen una abertura en el lateral, por la parte superior, donde se ubica el conector que permite la entrada de aire al contenedor. Los contenedores ubicados en la parte superior sirven para retener los explantes y tienen una abertura en la parte superior central, donde se ubica el accesorio que permite la salida de aire del contenedor y su retorno cuando la bomba no esté operando.

Definidos los biorreactores, se analizó el conjunto de accesorios. La tabla 2 de especificación de equipo muestra los diferentes accesorios involucrados. Los accesorios para la aireación del SIT son: la bomba de aire (compresor de aire) utilizada para el suministro de aire a los biorreactores, la manguera de riego, que permite la distribución de aire hacia cada uno de los biorreactores; los conectores de riego para distribuir el aire tanto a la entrada como a la salida sin tener fugas; los filtros de aire, previamente mencionados y el sistema de control (temporizador) que establece el tiempo de activación del compresor. El temporizador es el único tipo de control que se colocó en el sistema.

Los accesorios mencionados son especiales para riego y de plástico. Cada biorreactor estaba conectado en el sistema a través de manguera de riego por donde fluye el aire. Cabe mencionar que debido a que muchos de los accesorios eran de material plástico, esterilizar el equipo en la autoclave no era una opción ya que las altas presiones manejadas en la autoclave, producían deformaciones a las piezas. Por otra parte, debido a que a los contenedores de vidrio se les perforó para la entrada del accesorio de aire, posibles micro fisuras hacían que el material se rajara e incluso se quebrara al meterlo a la autoclave para su esterilización. Por tal motivo, se sustituyó el método de esterilización con autoclave, por desinfección con solución de hipoclorito de sodio al 5% y etanol al 70%, seguido de flameo directo; para evitar la contaminación.

El sistema se planteó en paralelo. Es decir, el aire de alimentación del compresor llegaba directamente a los doce biorreactores de forma simultánea. A diferencia de colocarlos en serie, donde el aire que expulsaba el primer biorreactor alimentaría al segundo y así sucesivamente hasta llegar al doceavo. Para favorecer la homogeneidad de presión y aire que ingresaba a cada biorreactor, se procedió a colocar el sistema en circuito cerrado, lo cual hace que el aire sea uniforme para cada biorreactor.

El modo de operar del sistema de biorreactores de inmersión temporal se diseñó de la siguiente forma, complementando la ilustración 3 de la sección de resultados. En la etapa 1 del proceso, se muestra la posición inicial del medio de cultivo y explantes previo a la activación del compresor. En la etapa 2, se observa la entrada de aire al

contenedor de medio de cultivo cuando opera el compresor. Este genera presión obligando al medio de cultivo a subir a través del tubo rígido y llegar al contenedor de explantes, iniciando el proceso de inmersión de los mismos. Este proceso tuvo un tiempo de aireación de 2 minutos. La etapa 3 del proceso representa el momento en que el medio de cultivo está por completo en el contenedor de explantes y, mientras opera el compresor, inicia el proceso de burbujeo, aumentando así el contacto entre explantes y medio de cultivo, además de aportar agitación al medio. La etapa 4 del proceso indica que la bomba termina de operar y comienza el secado por gravedad. El medio regresa a su contenedor respectivo. De esta forma, se evita la hiperhidricidad de explantes, lo cual genera que las plantas se pudran por exceso de agua y nutrientes. Este proceso se repitió las dos veces por día durante los 28 días de la fase de experimentación.

Todas las muestras se prepararon y ensamblaron en condiciones estériles (dentro de campana de flujo laminar) para evitar la presencia de microorganismos no deseados. La temperatura de operación se mantuvo a 23°C dentro de la cámara de crecimiento. La iluminación fue directa en tiempo de 12 horas al día con lámparas LED. El flujo de aire en el ambiente no se modificó dentro de la cámara de crecimiento. El tiempo de inmersión y la frecuencia de inmersión se fijaron igual para todos los biorreactores. Los biorreactores se consideraron herméticos. Como resultado del proceso de experimentación, se obtuvo contaminación de un biorreactor de los doce que operaron (8.33%).

El tercer objetivo específico consistía en establecer la presión de alimentación para el sistema de biorreactores de inmersión temporal. Decidió utilizarse un compresor de aire doméstico (para inflar llantas) ya que estos tienen la característica de operar a velocidades de flujo bajas y alcanzar presiones moderadas-altas cuando se requiera (hasta 250psi). Además de ser de fácil transporte y manejo. Para validar la utilización del compresor de aire se comprobó la velocidad de flujo.

Para obtener la velocidad de flujo fue necesario determinar el caudal de aire que producía el compresor. Para ello se procedió a ver el tiempo en que se inflaba un globo dentro de un recipiente con dimensiones conocidas. Se realizaron 3 mediciones y a

partir de ello se obtuvo un promedio, dando como resultado, que el caudal de aire liberado por el compresor fue de $89.38\text{cm}^3/\text{s} \pm 0.638\text{cm}^3/\text{s}$ como indica la tabla 6 de la sección de resultados. Conocido el caudal y el área del compresor pudo determinarse la velocidad de flujo que fue de $0.625\text{cm}/\text{s} \pm 0.012\text{cm}/\text{s}$. Se consideró velocidad de flujo aceptable ya que permite un flujo laminar y con ello, el flujo necesario de aire para transportar el medio de cultivo hacia el contenedor de explantes dentro del biorreactor sin que este proceso conlleve una agitación violenta.

Posterior a determinar la velocidad de flujo, se hizo el análisis de cada etapa en el sistema de inmersión temporal para determinar las pérdidas totales por fricción y con ello la presión de alimentación para el SIT. El sistema se analizó partiendo desde la salida del aire al ambiente y finalizando con la presión del compresor a los biorreactores. Se analizaron 5 etapas: a) de la salida de aire del contenedor de explantes al ambiente, b) del traslado del medio de cultivo al contenedor de explantes a la salida de aire de dicho contenedor, c) en el paso por el tubo rígido que conecta ambos contenedores, d) en el vaciado del medio de cultivo en su contenedor inicial y e) de la entrada de aire de los biorreactores al compresor. Esto se realizó con sistemas de ecuaciones en las diferentes partes del biorreactor y el SIT en general.

Para la primera etapa, se tomó en cuenta que al final de la manguera, la cual estaba abierta al ambiente, la presión atmosférica era igual a cero. Para establecer la presión a la salida de los biorreactores, se tomó en consideración el supuesto de que la velocidad permanecía constante y que no había diferencia de altura, por lo tanto la ecuación de Bernoulli para este caso quedaba simplificada de forma que la presión en la salida del biorreactor era igual a pérdidas por fricción por el peso específico del aire a 23°C . Para calcular las pérdidas por fricción se tomó en cuenta la tubería y el filtro de aire. Ello dio como resultado pérdidas por fricción de 0.055m . Obteniendo una presión a la salida de los biorreactores de 0.638Pa . Para tener un mejor análisis se recomienda ver simultáneo la sección de muestra de cálculo ubicada en anexos.

En la segunda etapa analizada, en el contenedor de medio de cultivo, se tomó en cuenta el desplazamiento del medio (diferencia de altura), también se toma en cuenta que el medio de cultivo ejercía presión opuesta a la del aire que ingresaba al

contenedor. Se asumió que no había pérdidas por fricción debido a que el análisis fue solo en el contenedor del medio de cultivo; y al igual que en la primera etapa, se asumió velocidad constante. Por lo tanto, la ecuación de Bernoulli estableció que la presión al fondo del contenedor del medio de cultivo era la presión en la superficie inicial del medio de cultivo en adición a la presión propia del desplazamiento del medio restando la presión ejercida por el mismo. Debido a que no se conocían todos los datos, esta fue la primera ecuación para el sistema planteada.

En la tercera etapa se analizó la presión a través del tubo rígido conector. Para ello se asumió velocidad constante, contracción y expansión para la salida y entrada de los contenedores y la presión necesaria para el paso del medio de cultivo. En este caso la única pérdida por fricción era la propia del tubo rígido, dando como resultado 0.002m. La altura desplazada en el tubo era de 10cm. La ecuación de Bernoulli aplicada para esta etapa quedó establecida en términos de presiones igual que la etapa anterior. En esta se observó que la presión a la entrada del contenedor de explantes equivalía a la presión a la entrada del tubo conector ubicada en el contenedor de medio de cultivo, el respectivo desplazamiento y la presión que ejerce el medio contra la presión del aire suministrado.

En la cuarta etapa se analizó la presión del contenedor de explantes a la salida de aire de los biorreactores. En esta etapa se despreciaron las pérdidas por fricción y se asumió velocidad constante. La ecuación obtenida estableció que la presión en la superficie del medio de cultivo era igual a la presión a la salida de aire de los biorreactores, el desplazamiento respectivo de aire en el contenedor y la presión ejercida por el medio de cultivo que va contra la del aire.

De las tres etapas anteriores, cada una planteó una ecuación y debido a que la cuarta etapa comprendía el dato de presión conocida en la etapa 1, se logró resolver el sistema de ecuaciones, estableciendo la presión para las etapas 2, 3 y 4.

La última etapa analizada era respecto a la tubería y accesorios involucrados de la entrada de aire a los biorreactores al compresor de aire. Se asumió velocidad constante de acuerdo al principio de continuidad que establece que la suma de velocidades de todas las ramificaciones es igual a la velocidad al inicio. Es decir, que la

velocidad de avance del fluido (aire) en toda la sección de salida es la misma. Sin embargo, en este caso si había diferencia de altura y pérdidas por fricción de 0.06m.

Es importante mencionar que a este punto logró establecerse las perdidas por fricción totales del sistema equivalente a la suma de cada etapa analizada, dando como resultado 0.117m, de acuerdo a la tabla 6 de resultados.

La ecuación adecuada de Bernoulli estableció entonces que la presión de alimentación del sistema era la que se calculó a la entrada de los biorreactores, en adición a la diferencia de altura y las pérdidas por fricción respectivas. Con lo cual se obtuvo la presión de la tabla 7 de la sección de resultados: 0.012MPa (0.14 lb_f/pulg²). Cabe mencionar que el resultado fue comprobado ya que el compresor tiene una aguja indicadora de la presión ejercida y siempre mostró el nivel mínimo menor a 15 psi (medida más pequeña del compresor) por lo que se consideró presión de alimentación aceptable. Además de observar constantemente el sistema en operación y no observar agitación violenta o turbulencia significativa en el medio de cultivo al entrar en el contenedor de explantes.

A este punto del proyecto, se demostró que el diseño del SIT operaba de forma adecuada en base a su construcción, los accesorios colocados en el mismo y a cálculos respectivos para la presión de alimentación para cumplir con el principio fundamental de los SIT. Por último, era importante demostrar que el SIT construido no solo funciona de forma adecuada sino que supera al método tradicional. A través del último objetivo, que consistía en determinar el rendimiento del sistema de inmersión temporal a través del desarrollo de *Guarianthe aurantiaca* por biorreactor; pudo establecerse si el sistema era adecuado para cultivo de plantas o si no cumplía con los requisitos necesarios y si generaba mejoras respecto al método tradicional de cultivo in vitro.

Para ello se analizó variables cuantitativas como altura de explantes, número de hojas, número de raíces y número de explantes tanto en los biorreactores como en el método tradicional (tabla 4, variable respuesta). Es importante mencionar que cuando se ensambló y armó el SIT con los explantes de orquídeas, también se sembró una

parte en método tradicional para tener testigos de comparación pasados los 28 días de experimentación.

Se observa en la tabla 8 que tanto en el método tradicional como en los biorreactores, el número de explantes es similar con una diferencia de 1.85% respecto al método tradicional. Debido a que es una diferencia menor al 5% se considera que no hubo rendimiento significativo. A pesar de ello, cabe resaltar que a través de esta prueba, se observó que la capacidad de explantes en los biorreactores supera a la del método tradicional. En el método tradicional, el límite de explantes sembrados se determina según la superficie de medio de cultivo semi sólido disponible, mientras que en biorreactores, pueden estar sobrepuestos los explantes ya que al momento de operar el SIT, el medio de cultivo líquido entra en contacto con la superficie de los explantes en su totalidad. Ello tiene la ventaja de tener mayor número de explantes en menor cantidad de biorreactores, pero también conlleva la desventaja de que si se contamina el biorreactor, la cantidad de explantes afectados será mayor y la tasa de contaminación se incrementaría.

Al inicio del experimento se tomó explantes que cumplieran con altura de 1cm para sembrarlos en biorreactores y en método tradicional. Pasados los 28 días, se hizo medición de altura obtenida de los explantes y se obtuvo que la altura promedio en explantes de los biorreactores fue de 1.6cm mientras que en el método tradicional fue de 1.5cm. El resultado indica que el SIT ofrece 6.67% más de altura que en el método tradicional. Debido a que se tiene un rendimiento mayor al 5%, se considera aceptable el resultado. Además se hace la observación de que utilizar el SIT podría incidir en el tiempo total de siembra in vitro de explantes ya que desarrolla altura en menor tiempo.

Así mismo, se hizo conteo en el número de hojas obtenidas en ambos métodos dando como resultado un promedio de 6 hojas por explante en el biorreactor y 5 en el método tradicional. Con ello se indica que hay incremento foliar de 20% más en el biorreactor que en el método tradicional. Esto establece que los explantes tienen un mejor desarrollo para la fotosíntesis de la planta; es decir, mejora la respiración y absorción de oxígeno debido a que hay mayor intercambio gaseoso en los biorreactores.

Por último, se evaluó el número de raíces obtenidas en los dos métodos, lo cual dio como resultado, promedio de 3 raíces por explante en el SIT y 2 raíces por explante en el método tradicional, estableciendo un incremento radical de 50% más en el primer método. De esta forma se interpretó que en el SIT, los explantes desarrollan más raíces para retención de nutrientes mientras no estén inmersas en el medio de cultivo, mientras que en el método tradicional, el esfuerzo que hace la planta por retener nutrientes en raíces es mínimo por lo que no necesita de mayor número para tener el alimento que necesita.

Al analizar tres diferentes variables cuantitativas se observa que ambos métodos son eficientes para el desarrollo de explantes de orquídeas. Sin embargo, el SIT presenta mejoras respecto al método tradicional. Por lo tanto, se acepta la implementación del mismo para crecimiento de orquídeas.

Los resultados discutidos sobre el rendimiento de los dos sistemas, el de inmersión temporal y el método tradicional muestran que hay diferencia en las tres características cuantitativas (altura, número de hojas y número de raíz). A pesar de ello, convenía elaborar un análisis estadístico para validar la hipótesis y determinar si esta diferencia era significativa en el sistema de biorreactores de inmersión temporal respecto al método tradicional.

La hipótesis establecía un nivel de confianza del 90%, lo cual implica que el 90% de cada una de las variables: altura, el número de hojas y el número de raíz, presentaba mejoras en el sistema de inmersión temporal respecto al método tradicional de propagación in vitro. Es decir, que la hipótesis buscaba respaldar que el sistema de inmersión temporal y el método tradicional no sean iguales al evaluar estas variables y que un método fuese mejor que otro. Esto se realizó a través de un análisis de distribución estadístico (T de Student y prueba de rangos con signos de Wilcoxon (Mann-Whitney)).

Para establecer el tipo de análisis a utilizar se debía tomar en cuenta la independencia de los datos respecto a los métodos, la normalidad de los datos y el parámetro para establecer si hay diferencia significativa que corresponde datos estadísticos obtenidos menor al 10% (0.1).

Al tener dos sistemas diferentes, cada uno se consideró independiente del otro. El crecimiento de la orquídea *Guarianthe aurantiaca* en el sistema de inmersión temporal fue comparado con el del método tradicional, los cuales se trabajaron por separado.

El planteamiento de la hipótesis indicaba que hay una mejora del crecimiento con la inmersión temporal respecto al método tradicional. Por lo tanto, la prueba estadística debía tomar en cuenta pruebas unilaterales en la distribución de los datos. Este tipo de prueba aplica para hipótesis alternativas con diferencias entre sí al ejecutar un experimento o tratamiento y establece la dirección de dicha diferencia, es decir, que un método sería mejor que otro. No aplicaba la prueba bilateral ya que esta establece solo que existe una diferencia entre los métodos pero no indica si es mayor o menor entre sí.

La normalidad de datos se atribuye a la forma en la que están distribuidos los datos. En algunas investigaciones se asume normalidad de datos ya que no son sensibles a desviaciones de la distribución normal y se cuenta con suficientes datos (más de 30). Sin embargo, es conveniente contrastar el criterio para saber si es válido o no.

En base a que se cuentan con suficientes datos (más de 30), se asumió normalidad para realizar el análisis de T de Student. Sin embargo, esta prueba es principalmente para datos simétricos, por lo que también se aplicó el análisis estadístico de Wilcoxon (Mann-Whitney), a modo de comprobación, ya que este análisis es específico para datos que no presentan normalidad y para comparar dos muestras independientes. Cabe mencionar que para la realización del análisis estadístico se hizo uso de la herramienta InfoStat (ver anexos).

Para el análisis de T de Student, se procedió a ingresar los datos obtenidos de altura, de número de hojas y de número de raíz de cada uno de los métodos a evaluar (sistema de inmersión temporal y método tradicional). Para interpretar el resultado mostrado en la tabla 9, era necesario establecer que había una diferencia significativa si el número obtenido era menor a 0.1, que corresponde al 10% mencionado en la

hipótesis. Al observar cada uno de los resultados, se observa que tanto en altura, como número de hojas y número de raíces, el resultado es menor a 0.1.

En el caso de la altura, pues se observa que la diferencia es muy cercana a 0.1 y sin embargo es aceptable. En caso de número de hojas y número de raíz, se puede apreciar que el valor es negativo, esto indica que existe una diferencia significativa puesto que es un valor menor a 0.1. Con ello se establece que existe diferencia significativa. Es necesario recalcar que aunque estos valores (tabla 9 de resultados) indicaran que existe diferencia significativa, no puede concluirse el análisis ya que hay que evaluar los datos sin tomar en cuenta la normalidad ni la simetría. Para esto, era necesario comprobar que los Datos en el análisis de Wilcoxon (Mann-Whitney).

Al efectuar el análisis de Wilcoxon (Mann-Whitney) se observa en la tabla que el valor para la altura de explantes es mayor a 0.1 mientras que el número de hojas y número de raíces dan como resultado un número menor a 0.1. Con base a estos resultados se establece que el sistema de biorreactores de inmersión temporal presenta mejoras respecto al número de hojas y raíces obtenido respecto al método tradicional. Sin embargo el análisis establece que la altura de orquídea en el método tradicional es mejor que en el sistema de inmersión temporal.

Analizando estos resultados, se observó que al estar las plantas en el sistema de inmersión temporal, la ausencia prolongada de medio de cultivo estimulaba a la planta a mejorar y aumentar la cantidad de raíces y hojas para retener por mayor tiempo los nutrientes para su desarrollo. Sin embargo, en el método tradicional, las plantas están constantemente en contacto con los nutrientes, lo cual estimula su altura, respecto al sistema de inmersión temporal. El sistema de inmersión temporal evidentemente tenía mejoras respecto al método tradicional en por lo menos una de las variables cuantitativas de las tres mencionadas; por lo tanto se da por finalizado el análisis estadístico.

A partir de los datos obtenidos en los dos análisis estadísticos se comprobó que el diseño, construcción e implementación del sistema de biorreactores de inmersión temporal presentó mejoras respecto al método tradicional para la propagación in vitro

de la orquídea *Guarianthe aurantiaca*. Por consiguiente se rechazó la hipótesis nula y se concluye que hay evidencia estadística para aceptar las mejoras.

Un análisis complementario a tomar en cuenta que no forma parte de los objetivos pero se consideró importante es el análisis económico (tabla 10 de resultados). Es necesario establecer si el sistema planteado conviene económicamente o si la efectividad del mismo tiene la desventaja de ser más costoso que el método tradicional.

Al implementar el SIT, un elemento que deja de ser indispensable es el agar-agar. Este elemento es de los más costosos en el método tradicional. Para ello se partió del supuesto que el agar-agar utilizado para la elaboración de medios de cultivo en el método tradicional es de Q1080/500gramos. Por cada litro de medio de cultivo utilizado se agregan hasta 7gramos y cada litro rinde para 10 unidades de cultivo en método tradicional, donde son sembrados hasta 55 explantes de acuerdo con el promedio mencionado previamente.

No se tomó en cuenta que el desarrollo de orquídea en el SIT sea más rápido que en el método tradicional ya que el estudio solo cubrió una etapa del crecimiento y no se evaluó hasta que la planta estuviera lista para aclimatación en el invernadero. A pesar de ello, asumiendo el mismo tiempo de crecimiento *in vitro* para ambos métodos, el ahorro que tiene el SIT respecto al método tradicional es de Q0.33/planta. Este ahorro no se ve afectado por costos como el de la energía eléctrica implementada. Únicamente le afecta el costo de cambio de filtros de aire.

En ambos casos, el costo de producción de orquídeas desde la etapa de germinación de semilla hasta la altura óptima para ingreso en el SIT es el mismo (Q0.14/planta). Para este estudio, la implementación del SIT es a partir de que la orquídea ha tenido su desarrollo embrionario y comienza su etapa de crecimiento.

El total de dinero ahorrado utilizando el SIT en lugar del método tradicional para los doce biorreactores con capacidad de 55 plantas cada uno fue de Q157.45. Teniendo una inversión del SIT de Q740.00, se determinó que el retorno de inversión fue de 5 años. Este tiempo se considera aceptable ya que el tiempo de producción de orquídeas con el método tradicional alcanza ese valor.

Así quedó determinado que el sistema de inmersión temporal no solo ofrece mejores resultados en los explantes trabajados sino también en el impacto económico que se traduce a reducción de costos y optimización de recursos.

VI. CONCLUSIONES

- I. Se estableció un diseño de SIT con dos filtros de venteo de PTFE de $0.2\mu\text{m}$ de porosidad para la esterilización de los medios empleados en el sistema de inmersión temporal con un porcentaje de 8.3% de contaminación.
- II. Se concluyó que el diseño de biorreactores consiste en un elemento con dos contenedores (uno para explantes y otro para medio de cultivo) integrados para realizar la inmersión y conectados en paralelo con uniformidad de presión. Los biorreactores están conectados mediante accesorios para venteo del sistema: la manguera de riego, los conectores de riego y los filtros de aire, usando un compresor de aire como suministro y temporizador como sistema de control.
- III. Se estableció que la presión de alimentación al sistema de inmersión temporal era de 0.012MPa con pérdidas totales por fricción de 0.117m correspondientes a los accesorios conectados a los biorreactores.
- IV. Se determinó que el sistema de inmersión temporal de biorreactores desarrolla explantes con 20% en incremento foliar, 50% en incremento radical y 6.67% en desarrollo de altura respecto al método tradicional para explantes de la orquídea *Guarianthe aurantiaca*.

VII. RECOMENDACIONES

- I. Implementar dos filtros por biorreactor, en lugar de dos por sistema, para favorecer la manipulación individual de los biorreactores del sistema de inmersión temporal y prevenir la contaminación colectiva del sistema por causa de un biorreactor.
- II. Realizar el experimento tiempo mayor a un mes (hasta un año) con la finalidad de observar desarrollo de explantes de los diferentes métodos (SIT y tradicional) en el período de aclimatación para la orquídea *Guarianthe aurantiaca*.
- III. Desarrollar el estudio y la implementación del sistema de inmersión temporal de biorreactores con otras especies de orquídeas en diferentes etapas del crecimiento in vitro, principalmente en la última etapa del proceso previo a la aclimatación.
- IV. Implementar el sistema de inmersión temporal de biorreactores con otras plantas, principalmente del sector agrícola, además de las ornamentales, variando tiempos y frecuencias de inmersión.
- V. Evaluar el efecto de los biorreactores en el desarrollo de la planta en el periodo de crecimiento in vitro.
- VI. Construir el sistema de inmersión temporal de biorreactores en paralelo a escalas planta piloto e industrial, con sus respectivos análisis económicos y rendimientos de desarrollo de plantas.
- VII. Variar el estudio de inmersión temporal variando las condiciones de estudio de frecuencia de inmersión con especies de orquídea estudiada y con otras especies de plantas en los biorreactores.
- VIII. Realizar el estudio de inmersión temporal según las condiciones de estudio de tiempo de inmersión temporal con especies de orquídea estudiada y con otras especies de plantas en los biorreactores.

VIII. REFERENCIAS

- Abdullahi BY (2017) Installation, Operation and Sustainability of the Temporary Immersion Bioreactor System [Instalación, operación y sostenibilidad del sistema de biorreactores de inmersión temporal] Artículo de Journal of Scientific and Engineering research pags. 259-265.
- Acuña (2004) Cómo fabricar un biorreactor artesanal para la macropropagación de brotes organogénicos de tejidos vegetales... con componentes de catálogo. [En Red] Disponible en: http://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/1437
- Albany (2015) Medios de cultivo líquidos: un avance para la micro propagación comercial de zábila (*Aloe barbadensis Mill*). Artículo de Investigación. Revista Colombiana Biotecnologica Vol. XVII No. 1 [En Red] Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/viewFile/50669/51190>
- Albarrán, Salazar, Trujillo, Vegas, Gonzales y Díaz (2014) Biorreactores de inmersión temporal para la propagación masiva de plantas. INIA Divulga. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Unidad de Biotecnología. Maracay, estado Aragua.
- Alvarado (2000) Micropropagación de *Cattleya skinneri* y *Cattleya skinneri* x *Cattleya* máxima por cultivo de ápices. 92. Cartago, Cartago, Costa Rica: Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Arroyo (s.f.) Compresores de aire [En Red] Disponible en: <https://temariosformativosprofesionales.files.wordpress.com/2013/03/compresores-de-aire.pdf>
- Bello-Bello (s.f) Desarrolla el INBIOTECA sistemas de biorreactores para la micro propagación de especies vegetales de importancia para el estado de Veracruz. Manuscrito inédito. Universidad Veracruzana, Campus para la Cultura, las Artes y el Deporte.
- Burghardt (2018) *Guarianthe aurantiaca* [En Red] Disponible en: <http://www.learn2grow.com/plants/guarianthe-aurantiaca/>
- Castillo (2004) Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Agrotec [En Red] Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=UY2006005431>
- Cuenca, Menéndez, Ballester y Vidal (s.f.) Producción a gran escala de *Castanea sativa* mediante micropropagación de yemas axilares en biorreactores de inmersión temporal. Manuscrito inédito. Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia.

- Dix, M.A & Dix M.W. (2006). Diversity, Distribution, Ecology and Economic Importance of Guatemalan Orchids. En: Biodiversidad de Guatemala. Cano, E (Ed). Guatemala: Universidad del Valle de Guatemala.
- Durán (2006) Generalidades de las Orquídeas [En Red] Disponible en: https://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/web/Bloques_Tematicos/Patrimonio_Natural._Usos_Y_Gestion/Espacios_Protegidos/publicaciones_renpa/orquideas_grazalema/03_orquideas.pdf
- Fogler (2008) Reactores intermitentes y Reactores de flujo continuo en Elementos de Ingeniería de las reacciones químicas (4a edición), páginas 10 a 20. México: Pearson Educación.
- Fraser (2018) *Cattleya aurantiaca* [En Red] Disponible en: <https://www.flickr.com/photos/ianfraser/35590103075>
- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., Bley, T. (2014). Temporary inmertion systems in plant biotechnology. Engieering in life sciences, Estados Unidos
- Juárez, A., Manjarrez, E., Barrón, H. (2011). Diseño de un biorreactor de inmersión temporal para la micropropagación de *Aztekium hintonii*. Expociencias Nacional México D.F.
- Guillamás (2018) Limpieza, desinfección y esterilización del material e instrumental sanitario. En Higiene del medio Hospitalario y limpieza del material. Madrid: Editorial Editex, S.A.
- IAEA (2004) Low cost options for tissue culture technology in developing countries [Opciones económicas para cultivo de tejido en países en desarrollo] Manuscrito inédito. Agencia Internacional de Energía Atómica.
- IARNA (2013) Proyecto de conservación de orquídeas de Guatemala. [En Red] Disponible en: <http://www.infoiarna.org.gt/orquideario-landivariano/videos/>
- IMSA (2018) Historia de Magdalena. En Magdalena Tierra Dulce - Altamente productivos, profundamente humanos [En Red] Disponible en: <https://www.imsa.com.gt/historia.html>
- Lopez-Selva y Cleaves (2017) Catalogo del orquideario landivariano. IARNA, Guatemala. Disponible en: www.infoiarna.org.gt
- Lugo (2009) Efecto del intercambio gaseoso sobre el crecimiento y tuberización de vitroplantas de papa. Artículo inédito. Facultad de Agronomía, Venezuela [En Red] Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182009000300002
- Martin, F. (2018) Cambio en la sub-tribu Laelinae, Parte 2: Guarianthe. En Boletín No. 201. Asociación Guatemalteca de Orquideología. Guatemala.

- Morán (2015) Microorganismo. Consultado el 09.09.2015 a las 14:00pm [En Red] Disponible en: <http://www.ecured.cu/index.php/Microorganismo>
- Mundocompresor (2016) Caudal de aire comprimido [En Red] Disponible en: <https://www.mundocompresor.com/diccionario-tecnico/caudal-de-aire-comprimido>
- Nauray, C. (2013) Manual de Orquídeas. Primera Edición. Centro de Documentación Ambiental. Ministerio del Ambiente. Perú.
- Orozco, J. (2002) Cultivo de células vegetales en biorreactores: un sistema potencial para la producción de metabolitos secundarios. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.
- Osorio (2015) Propiedades físicas y químicas. Universidad de Antioquía [En Red] Disponible en: <http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/ocw/mod/page/view.php?id=226>
- Paredes, E. (2005) Sistema de Inmersión Temporal en Biorreactores, Nueva tecnología en micropropagación de plantas en Chile. INIA, Quilamapu, Chile
- Partap, Plunkett y O'Brien (s.f.) Types of Bioreactors in Tissue Engineering from Bioreactors in Tissue Engineering. Ireland, College Dublin. [En Red] Disponible en: www.intechopen.com
- Peralta, M. (2016) Manejo agronómico de *Phalaenopsis* sp. En maceta bajo invernadero en finca San Patricio, la Democracia, Escuintla sistematización de práctica profesional. Universidad Rafael Landívar, Sede Regional de Escuintla, Escuintla, Guatemala.
- Pérez, J. y López, R. (2008) Estudio preliminar de las orquídeas de la isla de ometepe. Universidad y Ciencia UNAM; Managua
- Pulpin, F. y D. Rakosy (2013) Orchid Diversity and Classification, with a Focus on the Golfo Dulce Region, Costa Rica. In: D. Rakosy, M. Speckmaier, A. Weber, W. Huber y A. Weissenhofer (eds.). Orchids: Botanical Jewels of the Golfo Dulce Region, Costa Rica. Verein zur Förderung der Tropenstation La Gamba, University of Vienna. p 28-33.
- Probiotek (2017) Murashige & Skoog Medium [En Red] Disponible en: <http://www.probiotek.com/productos/reactivos/murashige-and-skoog-ms-medium/>
- RAE (2018) Definición de Costo [En Red] Disponible en: <http://dle.rae.es/srv/fetch?id=B7MbcqN|B7QOlcz|B7RFb89>
- Rosales (2003) Diseño y construcción de un sistema de inmersión temporal. Centro Agrícola. Nuevo León, México y Holguín, Cuba.

- Rolz (1990) Diseño, construcción y montaje de un biorreactor heterogéneo de mezcla perfecta para hidrolizar sacarosa utilizando biomasa de levadura inmovilizada. Tesis inédita. Universidad Rafael Landívar.
- Sedano, Manzo Roldán y Castellanos. (2015) Propagación in vitro de orquídeas y otras ornamentales en Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. [En Red] Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263139243061>
- Segretín (s.f.) los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales) [En Red] Disponible en: <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20II%20Euge.pdf>
- Solórzano (2016) Diseño y construcción de un sistema de biorreactores de inmersión temporal neumática para la multiplicación de ananas comosus var. roja trujillana. Tesis inédita Universidad Nacional de Trujillo
- Tirado et cols (2005) Propagación in vitro de Phalaenopsis (Orchidaceae) a partir de protocormos, mediante el sistema de inmersión temporal "RITA" en Revista colombiana de Biotecnología Volumen 7 Número 1, p. 25-31. [En Red] Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/482/853>
- Vesania, C. (2005) Reproducción de las Orquídeas [Imagen de blog] Recuperado de: <https://orquidea.blogia.com/>
- Vilchez et cols. (2011) Multiplicación en sistemas de inmersión temporal y enraizamiento ex vitro de ocumo blanco (Xanthosoma sagittifolium (L.) Schott) [En Red] Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752011000100013
- Vitropic, S. A. (2018) Recipiente con Inmersión temporal para cultivo de tejidos de plantas. [En Red] Disponible en: <http://vitropic.pagesperso-orange.fr/rita/es/accueil.htm>
- Yara (s.f.). Manual básico de nutrición vegetal y suelos. Oslo, Noruega. Páginas 39-72.

IX. ANEXOS

8.1 Glosario

Fenotipo: característica observable de un organismo. Es la expresión de los genes de un organismo.

Genotipo: conjunto de genes característicos de una especie, recibidos por los progenitores y contenidos en el ADN.

Macropropagación: cualquier forma de multiplicación asexual o vegetativa de plantas.

Micropropagación: conjunto de técnicas y métodos de cultivo de tejidos usados para propagar plantas asexualmente de manera rápida, eficiente y en grandes cantidades.

Polinizadores: agentes encargados de relacionar plantas para su supervivencia y reproducción.

Proceso biogeoquímico: vinculación de la composición de elementos químicos y biológicos de la tierra y su interacción con la vida.

RITA: sistema de inmersión temporal automático

Segmento nodal: reproducción por partes de tallo o raíz de planta madre para obtener planta independiente idéntica.

SIT: sistema de inmersión temporal

8.2 Diagrama de equipo

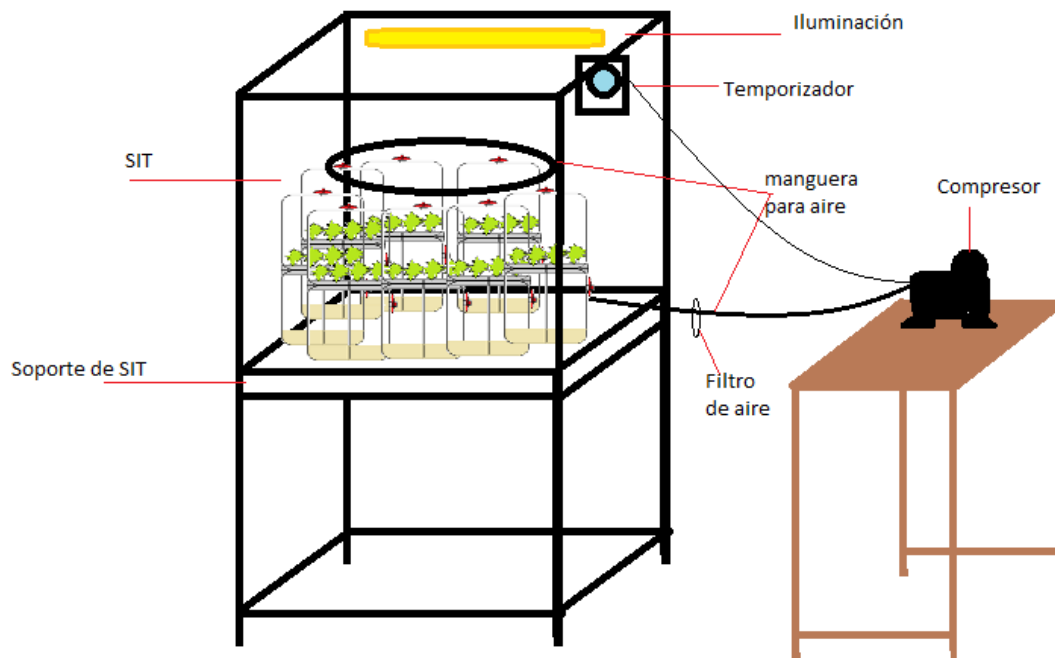


Ilustración 15. Diagrama de equipo de SIT en cámara de crecimiento. Fuente: elaboración propia (2018)

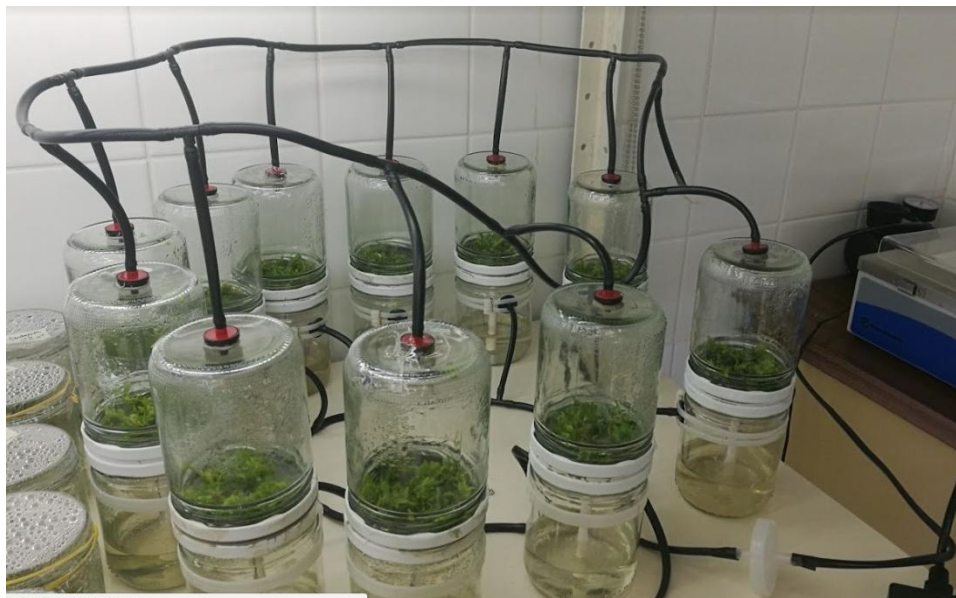


Ilustración 16. Sistema de Inmersión Temporal en cámara de crecimiento. Fuente: elaboración propia (2018)

8.3 Datos originales

Tabla 11. Datos originales del Sistema de Inmersión Temporal

Datos del SIT	Valor
Altura del contenedor	10cm ± 0.005cm
Diámetro del contenedor	8cm ± 0.005cm
Diámetro de orificio al accesorio de aire	0.6cm ± 0.005cm
Altura tubo interno rígido	10cm ± 0.005cm
Altura de fondo a orificio de accesorio aire	7cm ± 0.005cm
Diámetro de manguera externo	0.5cm ± 0.005cm
Diámetro de manguera interno	0.4cm ± 0.005cm
Volumen de medio de cultivo	150ml
Volumen total de contenedor	502.65cm ³
Desplazamiento de medio de cultivo	10cm ± 0.005cm
Altura de medio en contenedor	3cm ± 0.005cm
Número de biorreactores	12 unidades

Fuente: elaboración propia (2018)

Tabla 12. Datos originales para el aire y medio

Dato	Aire a 23°C	Medio a 23°C
Peso específico	11.693 N/m ³	9780 N/m ³
Densidad	1.192 kg/m ³	997 kg/m ³
Viscosidad dinámica	1.83x10 ⁻⁵ Pa(s)	8.91x10 ⁻⁴ Pa(s)
Viscosidad cinemática	1.54x10 ⁻⁵ m ² /s	8.94x10 ⁻⁷ m ² /s

Fuente: elaboración propia (2018)

Tabla 13. Datos originales adicionales

Dato	Valor
Gravedad	9.81m/s ²

Fuente: elaboración propia (2018)

Tabla 14. Datos originales de tiempo para medición de caudal

Corrida	Tiempo
1	0.19s ± 0.236s
2	0.39s ± 0.236s
3	0.23s ± 0.236s

Fuente: elaboración propia (2018)

Tabla 15. Datos adicionales del compresor de aire

Dato	Valor
Área de compresor	0.0143m ² ± 0.00012m ²
Volumen alcanzado de recipiente	0.0019m ³ ± 6.65x10 ⁻⁶ m ³

Fuente: elaboración propia (2018)

Tabla 16. Datos originales de crecimiento y desarrollo de explantes

Característica	Biorreactores	Método tradicional
Promedio de altura de explantes	1.6cm ± 0.005cm	1.5cm ± 0.005cm
Promedio de número de hojas	6	5
Promedio de número de raíces	3	2
Promedio número de explantes	55	54

Fuente: elaboración propia (2018)

Tabla 17. Costos según método tradicional

Costo	Valor
Costo para producción de orquídeas desde siembra hasta desarrollo de brotes para ambos métodos (tradicional y SIT)	Q0.14/planta
Costo para producción de orquídeas después de salir de unidad de cultivo (método tradicional)	Q0.71/planta
Costo de agar-agar para medio de cultivo en método tradicional (500g)	Q1080.00

Fuente: elaboración propia (2018)

8.4 Datos calculados

Tabla 18. Cálculo de caudal y velocidad de flujo promedio

Corrida	Caudal (m ³ /s)	Velocidad flujo (m/s)
1	$9.76 \times 10^{-5} \pm 8.43 \times 10^{-7}$	$0.0064 \pm 4.9 \times 10^{-5}$
2	$8.98 \times 10^{-5} \pm 6.88 \times 10^{-7}$	$0.0063 \pm 2.6 \times 10^{-4}$
3	$8.58 \times 10^{-5} \pm 6.13 \times 10^{-7}$	$0.0060 \pm 5.0 \times 10^{-5}$
Promedio	$9.11 \times 10^{-5} \pm 7.15 \times 10^{-7}$	$0.0063 \pm 8.2 \times 10^{-5}$

Fuente: elaboración propia (2018)

Tabla 19. Datos calculados referentes a la presión de alimentación

Datos compresor	Valor
Presión de alimentación del compresor	0.012MPa (1.74 lb _f /pulg ²)
Pérdidas totales por fricción	0.117m

Fuente: elaboración propia (2018)

Tabla 20. Rendimiento de SIT calculado

Rendimiento	Rendimiento
Promedio de altura de explantes	6.67%
Promedio de número de hojas	20.0%
Promedio de número de raíces	50.0%
Promedio número de explantes	1.85%

Fuente: elaboración propia (2018)

Tabla 21. Costos calculados y retorno de inversión para SIT

Variable	Valor
Tiempo de producción de orquídeas en laboratorio con método tradicional	2 a 5 años
Costo de sistema de inmersión temporal	Q740.00
Retorno de inversión con SIT	5 años
Costo para producción de orquídeas después de salir de unidad de cultivo (SIT)	Q0.38/planta
Costo estimado de energía anual	Despreciable (Q0.0004/planta)
Costo anual por cambio de filtros	Q0.09/año
Total de dinero ahorrado utilizando SIT en lugar de método tradicional	Q157.45

Fuente: elaboración propia (2018)

8.5 Descripción de ecuaciones utilizadas

Ecuación 1: Caudal:

Q: caudal (m³/s)

V: volumen (m³)

t: tiempo (s)

$$\dot{Q} = \frac{V}{t}$$

Ecuación 2: Promedio de caudal

Q_i: caudal (m³/s)

n: número de datos

$$\bar{Q} = \frac{\sum_{i=0}^3 \dot{Q}_i}{n}$$

Ecuación 3: Velocidad de flujo

V_e: velocidad de flujo (m/s)

Q: caudal (m³/s)

A: área (m²)

$$V_e = \frac{\dot{Q}}{A}$$

Ecuación 4: Ecuación de Bernoulli

P: presión (Pa)

γ: peso específico (N/m³)

z: altura (m)

v: velocidad de flujo (m/s)

g: gravedad (m/s²)

h_L: pérdidas por fricción (m)

$$\frac{P_1}{\gamma} + z_1 + \frac{v_1^2}{2g} + h_L = \frac{P_2}{\gamma} + z_2 + \frac{v_2^2}{2g}$$

Ecuación 5: Pérdidas por fricción para tubería (manguera)

f: factor de fricción

L: longitud de tubería (m)

D: diámetro interno de tubería (m)

v: velocidad (m/s)

g: gravedad (m/s²)

$$H_L = (f) \left(\frac{L}{D} \right) \left(\frac{v^2}{2g} \right)$$

Ecuación 6: Número de Reynolds

Re: número de Reynolds

ρ : densidad (kg/m^3)

v: velocidad (m/s)

D: diámetro interno de tubería (m)

μ : viscosidad dinámica (N/m^2)

$$Re = \frac{\rho v D}{\mu}$$

Ecuación 7: Factor de fricción según número de Reynolds

f: factor de fricción

Re: número de Reynolds

$$f = \frac{64}{Re}$$

Ecuación 8: Pérdida por fricción para expansión y contracción súbita

K: coeficiente de resistencia de entrada/salida

v: velocidad (m/s)

g: gravedad (m/s^2)

$$H_L = 2K \left(\frac{v^2}{2g} \right)$$

8.6 Muestra de cálculo

Paso 1. Cálculo de caudal

Dado el tiempo y volumen de llenado de aire en el recipiente utilizado, se procedió a determinar el caudal para cada una de las corridas. Ejemplo para la corrida 1:

$$\dot{Q} = \frac{V}{t} = \frac{0.0019m^3}{19.46s} = 9.76 \times 10^{-5} m^3/s$$

Donde Q es el caudal, V el volumen y t el tiempo por corrida. Obtenido el caudal para cada una de las corridas se calculó el promedio:

$$\bar{Q} = \frac{\sum_{i=0}^3 \dot{Q}_i}{n} = \frac{9.76 \times 10^{-5} + 8.99 \times 10^{-5} + 8.58 \times 10^{-5}}{3} = 9.11 \times 10^{-5} m^3/s$$

Paso 2. Cálculo de velocidad de flujo

Con el caudal y el área se procedió a calcular la velocidad de flujo para cada corrida. Ejemplo para la corrida 1:

$$V_e = \frac{\dot{Q}}{A} = \frac{9.76 \times 10^{-5} \frac{m^3}{s}}{0.0143m^2} = 0.0068 m/s$$

Donde V_e es la velocidad de flujo, Q el caudal y A el área del compresor. También se sacó el promedio de las tres corridas como en el cálculo del caudal.

Paso 3. Cálculo de presión a la salida de aire de los biorreactores al ambiente

Tomando en consideración pérdidas por fricción, la ecuación de Bernoulli queda de la siguiente forma:

$$\frac{P_1}{\gamma} + z_1 + \frac{v_1^2}{2g} + h_L = \frac{P_2}{\gamma} + z_2 + \frac{v_2^2}{2g}$$

Tomando en cuenta que la presión de la manguera que queda en contacto con el ambiente tiene presión de 0, no existe diferencia de altura entre este punto y la salida

de aire de biorreactores, y que la velocidad de flujo es la misma ya que no hay cambio significativo en el diámetro de la manguera se establece que:

$$h_L = \frac{P_2}{\gamma}$$

Donde H_L es la pérdida por fricción de accesorios y debe calcularse, P es la presión que hay a la salida de los biorreactores. Se conoce γ que es el peso específico del aire a 23°C.

Paso 3.1 Cálculo de H_L :

Para las pérdidas por fricción se tomó en cuenta la manguera correspondiente a la sección analizada (280cm) y el filtro (expansión y contracción súbita):

Para la manguera utilizada:

$$H_L = (f) \left(\frac{L}{D} \right) \left(\frac{v^2}{2g} \right)$$

Donde f es el factor de fricción para plásticos, L es la longitud de la manguera, D es el diámetro interno de la manguera, v es la velocidad de flujo y g la gravedad:

Paso 3.1.1 Cálculo de factor de fricción

Para calcular el factor de fricción es necesario obtener el número adimensional de Reynolds con la ecuación, donde ρ es la densidad del aire a 23°C, v es la velocidad de flujo, D es el diámetro interno de la manguera y μ es la viscosidad dinámica del aire a 23°C:

$$Re = \frac{\rho v D}{\mu} = \frac{\left(1.192 \frac{kg}{m^3} \right) \left(0.0063 \frac{m}{s} \right) (0.004m)}{1.85 \times 10^{-5} Pa(s)} = 1.63$$

Como $Re < 2000$, se considera flujo laminar, por lo tanto el factor de fricción se obtiene de la siguiente manera:

$$f = \frac{64}{Re} = \frac{64}{1.63} = 39.19$$

Por lo tanto,

$$H_L = (39.19) \left(\frac{2.80m}{0.004m} \right) \left(\frac{0.0063^2 \frac{m^2}{s^2}}{2 \left(9.81 \frac{m}{s^2} \right)} \right) = 0.055m$$

Para el filtro:

Tanto para expansión súbita como para contracción súbita, la ecuación a utilizar es:

$$H_L = 2K \left(\frac{v^2}{2g} \right)$$

Donde K es el coeficiente de entrada/salida. De acuerdo con la figura 10.13 del libro de Mecánica de Fluidos de Robert Mott (página 293), cuando la tubería se proyecta hacia adentro el coeficiente de resistencia de entrada y salida se considera $K=1.0$, por lo tanto:

$$H_L = (2)(1) \left(\frac{0.0063^2 \frac{m^2}{s^2}}{2 \left(9.81 \frac{m}{s^2} \right)} \right) = 3.98 \times 10^{-6} \approx \text{despreciable}$$

La pérdida por fricción de este primer trayecto da como resultado 0.055m por lo que la presión a la salida de los biorreactores es:

$$P_2 = (h_L)(\gamma) = (0.055m) \left(11.693 \frac{N}{m^3} \right) = 0.638Pa$$

Paso 4. Cálculo de presión de la salida de aire en los biorreactores

Para establecer la presión dentro de los biorreactores se planteó un sistema de ecuaciones. La primera, cuando el medio de cultivo sale del contenedor respectivo. El segundo cuando el medio de cultivo pasa a través del tubo rígido. El tercero cuando el medio de cultivo entra completamente al contenedor donde está el explante. Se inicia

con la ecuación de Bernoulli, y tomando en cuenta que existe presión de aire y de agua en el biorreactor según la fase en la que se analiza.

Paso 4.1 Planteamiento de cálculo de presión para primera parte de biorreactores

Partiendo de la ecuación de Bernoulli, mencionada en el paso 3, con la variante de que la velocidad de flujo se mantiene igual y agregando la variable de la presión del medio, se obtiene la fórmula:

$$\frac{P_{b1}}{\gamma} + z_{b1} + h_L - \frac{P_{medio}}{\gamma_{medio}} = \frac{P_{b2}}{\gamma} + z_{b2}$$

Donde la presión del medio está dada por densidad, gravedad y altura. Se asume propiedades del agua a 23°C por lo que se tiene:

$$P_{medio} = \rho gh = \left(997.4 \frac{kg}{m^3}\right) \left(9.81 \frac{m}{s^2}\right) (0.03m) = 293.53Pa$$

No existe pérdida por fricción y la diferencia de altura corresponde a 3cm, que es la altura que se desplaza el medio de cultivo en el contenedor. Aún no se conoce el valor de las presiones por lo que se deja indicada la ecuación como:

$$P_{b2} = 0.03\gamma + P_{b1} - 293.53Pa$$

Paso 4.2 Planteamiento de cálculo de presión para segunda parte de biorreactores

En esta etapa del biorreactor (dentro del tubo rígido), se toma en cuenta que las velocidades de flujo son iguales, y que la diferencia de altura corresponde a 10cm que es la altura del tubo rígido:

$$\frac{P_{b2}}{\gamma} + h_L - \frac{P_{medio}}{\gamma_{medio}} = \frac{P_{b3}}{\gamma} + 0.10\gamma$$

Paso 4.2.1 Cálculo de pérdidas por fricción

Con pérdidas por fricción establecidas por el tubo rígido y la expansión y reducción súbita de cada extremo:

$$h_L = (39.19) \left(\frac{0.1m}{0.004m} \right) \left(\frac{0.0063^2 \frac{m^2}{s^2}}{2 \left(9.81 \frac{m}{s^2} \right)} \right) + (2)(1) \left(\frac{0.0063^2 \frac{m^2}{s^2}}{2 \left(9.81 \frac{m}{s^2} \right)} \right) = 0.002m$$

Además la presión del medio queda establecida como:

$$P_{medio} = \rho gh = \left(997.4 \frac{kg}{m^3} \right) \left(9.81 \frac{m}{s^2} \right) (0.1m) = 978.44Pa$$

Por lo tanto, la ecuación del paso 4.2 pasa a escribirse como:

$$\frac{P_{b2}}{\gamma} + 0.002m = \frac{P_{b3}}{\gamma} + 0.10m - \frac{P_{medio}}{\gamma_{medio}}$$

$$P_{b2} = P_{b3} + 0.098\gamma - 978.44Pa$$

Integrando la ecuación que quedó en el paso 4.1 con la anterior, se obtiene:

$$P_3 + 0.098\gamma - 978.44Pa = 0.03\gamma + P_1 - 293.53Pa$$

Paso 4.3 Planteamiento de cálculo de presión para tercera parte de biorreactores

Esta etapa comprende el desplazamiento del medio de cultivo al contenedor de explantes de modo que el aire se desplace la altura completa del contenedor (10cm):

$$\frac{P_{b3}}{\gamma} + z_{b3} + \frac{v_{b3}^2}{2g} + h_L - \frac{P_{medio}}{\gamma_{medio}} = \frac{P_2}{\gamma} + z_2 + \frac{v_2^2}{2g}$$

La presión del medio queda igual que para el caso 4.1: 293.53Pa

Con velocidad de flujo igual para ambos lados de la igualdad, y sin pérdidas por fricción al igual que en el paso 4.1, la ecuación queda de la siguiente forma:

$$\frac{P_{b3}}{\gamma} + z_{b3} = \frac{P_2}{\gamma} + z_2 - \frac{P_{medio}}{\gamma_{medio}}$$

$$P_{b3} = P_2 + 0.10\gamma - 293.53Pa$$

Paso 4.4 Resolución de sistema de ecuaciones

Con las ecuaciones planteadas en los pasos anteriores se procede a resolver el sistema, con base a que la presión P_2 es 0.638Pa:

$$P_{b3} = 0.638Pa + (0.10)(11.693) - 293.53Pa$$

$$P_{b3} = -291.72Pa$$

El signo negativo indica que va hacia arriba, buscando la salida del biorreactor

$$P_{b2} = P_{b3} + 0.098\gamma - 978.44Pa$$

$$P_{b2} = -291.72Pa + (0.098)(11.693) - 978.44Pa$$

$$P_{b2} = -1269.01Pa$$

Este punto es la presión necesaria en el tubo rígido que conecta a ambos contenedores.

$$P_{b2} = 0.03\gamma + P_{b1} - 293.53Pa$$

$$1269.01Pa = (0.03)(11.693) + P_{b1} + 293.53Pa$$

$$P_{b1} = 975.83Pa$$

Este punto es la presión necesaria para desplazar el medio de cultivo de su contenedor. Cabe mencionar que es de un biorreactor, por lo tanto, se debe multiplicar por 12

$$P_{b1} = (12)(975.83Pa) = 11,701.55Pa$$

Esta es la presión de los doce biorreactores.

Paso 5. Cálculo de presión de la entrada de los biorreactores y la salida del compresor.

Esta etapa comprende el paso de aire que sale del compresor y llega a los doce biorreactores. Para ello se asume que las velocidades en los puntos evaluados son las mismas, no se toma en cuenta la presión del medio. También se calcula la pérdida por fricción de conectores. Por lo tanto:

$$\frac{P_{b1}}{\gamma} + z_{b1} + h_L = \frac{P_a}{\gamma} + z_a$$

Paso 5.1 Calculo pérdidas por fricción

Para el cálculo de pérdidas por fricción en tubería se tiene longitud de 310cm:

$$H_L = (39.19) \left(\frac{3.1m}{0.004m} \right) \left(\frac{0.0063^2 \frac{m^2}{s^2}}{2 \left(9.81 \frac{m}{s^2} \right)} \right) = 0.06m$$

Para el filtro, al igual que en el paso 3.1.1, para expansión súbita y la contracción súbita, la ecuación a utilizar es:

$$H_L = 2K \left(\frac{v^2}{2g} \right)$$

Donde K es el coeficiente de entrada/salida. De acuerdo con la figura 10.13 del libro de Mecánica de Fluidos de Robert Mott (página 293), cuando la tubería se proyecta hacia adentro el coeficiente de resistencia de entrada y salida se considera K=1.0, por lo tanto:

$$H_L = (2)(1) \left(\frac{0.0063^2 \frac{m^2}{s^2}}{2 \left(9.81 \frac{m}{s^2} \right)} \right) = 3.98 \times 10^{-6} \approx \text{despreciable}$$

La pérdida por fricción de este primer trayecto da como resultado 0.06m por lo que la presión a la salida de los biorreactores es:

$$\frac{P_{b1}}{\gamma} + z_{b1} + h_L = \frac{P_a}{\gamma} + z_a$$

$$\frac{P_{b1}}{\gamma} + 0.06m = \frac{P_a}{\gamma} + 0.1m$$

Paso 5.2 Cálculo presión de alimentación del compresor de aire

Conociendo la presión P_1 y el peso específico, se despeja para P_a :

$$P_a = 11701.55Pa + (-0.06m + 0.1m)(11.693)$$

$$P_a = 11,701.08Pa = 0.012MPa = 1.74 \frac{lb_f}{pulg^2}$$

Esta es la presión que debe tener el compresor para hacer funcionar el sistema adecuadamente.

Paso 6. Cálculo de costo de siembra de semilla

Se toma en cuenta que cada gramo de agar-agar tiene valor de Q2.¹⁶, que para cada planta se utilizan 0.012gramos de agar-agar y que el costo del medio de cultivo sin agar-agar es de 2 centavos por planta.

$$Q_s = \left(Q_{\frac{agar}{gramo}} \right) \left(C_{\frac{gramo}{planta}} \right) + Q_{\frac{medio}{planta}}$$

$$Q_s = \left(\frac{2.16Q}{g} \right) \left(\frac{0.012g}{planta} \right) + \frac{0.02Q}{planta} = \frac{0.048Q}{planta}$$

Paso 7. Cálculo de costo de brotes previo a ingreso a SIT

$$Q_b = (Q_s)(n)$$

Donde n es el número de transferencias (t) realizadas para obtener al tamaño adecuado los brotes, tomando en cuenta la siembra (s):

$$n = s + t$$

$$n = 1 + 2 = 3$$

$$Q_b = \left(\frac{0.048Q}{planta} \right) (3) = \frac{0.14Q}{planta}$$

Paso 8. Cálculo de costo orquídeas método tradicional

$$Q_{MT} = (Q_s)(n) + Q_b$$

$$Q_{MT} = \left(\frac{0.048Q}{planta}\right)(12) + \frac{0.14Q}{planta} = \frac{0.71Q}{planta}$$

Paso 9. Cálculo de costo orquídeas con SIT

$$Q_{SIT} = \left(Q_{\frac{medio}{planta}}\right)(n) + Q_b$$

$$Q_{SIT} = \left(\frac{0.02Q}{planta}\right)(12) + \frac{0.14Q}{planta} = \frac{0.38Q}{planta}$$

Paso 10. Cálculo de ahorro

$$A = Q_{MT} - Q_{SIT}$$

$$A = Q0.71 - Q0.38 = Q0.33$$

Paso 11. Cálculo de costo de energía eléctrica

$$C_E = \frac{(0.012KW) \left(\frac{4min}{dia}\right) \left(\frac{365dia}{año}\right) \left(\frac{1hora}{60min}\right) \left(\frac{1.20Q}{KWh}\right)}{(55plantas)(12biorreactores)} = 5.3 \times 10^{-4} \frac{Q}{año} \approx \text{despreciable}$$

Paso 12. Cálculo de costo de filtros PFTE

$$C_F = \frac{(\$8) \left(\frac{Q7.5}{\$1}\right)}{(55plantas)(12biorreactores)} = \frac{0.09Q}{planta \text{ año}}$$

Paso 13. Análisis de retorno de inversión

Tabla 22. Análisis de Retorno de Inversión

Mes	Inversión	Costo	Ahorro
2	Q740.00		
15		Q0.09	Q0.33

Fuente: elaboración propia (2018)

Paso 14. Calculo de retorno de inversión

$$Utilidad = Beneficio - Costo$$

$$Q0.33 - Q0.09 = Q0.24$$

Utilidad por plantas obtenidas

$$(Q0.24)(55plantas)(12biorreactores) = Q157.45$$

Inversión respecto a utilidad por plantas obtenidas

$$\frac{740.00}{157.45} = 4.69 \approx 5 \text{ años}$$

8.7 Análisis estadístico

Todo el análisis estadístico se hizo a través del programa InfoStat, donde se evaluaron las mediciones de los sistemas y el resultado se muestra a continuación:

Pruebas estadísticas para altura de plantas en los dos métodos evaluados

Tabla 23. Prueba T para altura de plantas.

Prueba T para muestras Independientes

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	Media(1)	Media(2)	Media
(1)-Media(2)	LI(95)	LS(95)	pHomVar	T	p-valor	prueba		
Tratamiento	Altura	{mt}	{sit}	108	220	1.46	1.58	
-0.12	sd	0.03	0.4760	-1.30	0.0974	UnilatIzq		

Fuente: elaboración propia (2018)

Tabla 24. Prueba Wilcoxon para altura de plantas.

Prueba de Wilcoxon para muestras independientes

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	Media(1)	Media(2)	DE(1)	DE
(2)	W	p(2 colas)							
Tratamiento	Altura	mt	sit	108	220	1.46	1.58	0.75	
0.80	17105.00	0.4118							

Fuente: elaboración propia (2018)

Pruebas estadísticas para número de hojas de plantas en los dos métodos evaluados

Tabla 25. Prueba T para hojas de plantas.

Prueba T para muestras Independientes

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	Media(1)	Media(2)	Media
(1)-Media(2)	LI(95)	LS(95)	pHomVar	T	p-valor	prueba		
Tratamiento	Altura	{mt}	{sit}	108	192	5.06	6.48	
-1.41	sd	-0.92	<0.0001	-4.70	<0.0001	UnilatIzq		

Fuente: elaboración propia (2018)

Tabla 26. Prueba Wilcoxon para hojas de plantas.

Prueba de Wilcoxon para muestras independientes

Clasific (2)	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	Media(1)	Media(2)	DE(1)	DE
W	p(2 colas)								
Tratamiento	Altura	mt	sit	108	192	5.06	6.48	2.03	
3.17	13689.50	0.0003							

Fuente: elaboración propia (2018)

Pruebas estadísticas para número de raíces de plantas en los dos métodos evaluados

Tabla 27. Prueba T para raíces de plantas.

Prueba T para muestras Independientes

Clasific (1)-Media(2)	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	Media(1)	Media(2)	Media
LI(95)	LS(95)	pHomVar	T	p-valor	prueba			
Tratamiento Raices	{mt}	{sit}		108	220	1.94	2.59	
-0.64	sd	-0.38	0.0446	-4.12	<0.0001	UnilatIzq		

Fuente: elaboración propia (2018)

Tabla 28. Prueba Wilcoxon para raíces de plantas.

Prueba de Wilcoxon para muestras independientes

Clasific (2)	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	Media(1)	Media(2)	DE(1)	DE
W	p(2 colas)								
Tratamiento	Raices	mt	sit	108	220	1.94	2.59	1.24	
1.48	14340.50	<0.0001							

Fuente: elaboración propia (2018)

8.8 Imágenes complementarias



Ilustración 17. Medición de Altura de explantes. Fuente: elaboración propia (2018)



Ilustración 18. Diferencia visual entre unidad de cultivo de método tradicional (izquierdo) Respecto al biorreactor diseñado (derecho). Fuente: elaboración propia (2018)

8.9 Tablas de seguridad de reactivos utilizados

Tabla 29. Propiedades físico-químicas de compuestos químicos

Compuesto	Fórmula Química	Masa Molar (g/mol)	Apariencia	Densidad (g/ml) a 20°C	Punto de fusión (°C) 1atm	Punto ebullición (°C) 1atm	Solubilidad
Agua	H ₂ O	18	Líquido transparente e inodoro	1.00	0	100	Etanol
Ácido clorhídrico	HCl	36.4	Líquido incoloro	1.05 (10%)	-74 (en sol ac)	53 (en sol ac)	Agua, alcoholes, éter, benceno.
Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	80.04	Cristal sólido blanco	1.72	170	210	Agua
Nitrato de potasio	KNO ₃	101.10	Sal iónica color blanco	2.11	333	400	Agua
Sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO ₄ *7H ₂ O	246.3	Sólido inodoro blanco	NA	NA	NA	Agua
Fosfato ácido de potasio	KH ₂ PO ₄	174.18	Sólido blanco inodoro	NA	340	NA	Agua
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl ₂ *2H ₂ O	147.02	Sólido blanco inodoro	0.835	175.5	NA	Agua
Acido bórico	H ₃ BO ₃	61.83	Sólido blanco inodoro	1.43	171	300	Agua
Sulfato de manganeso tetrahidratado	MnSO ₄ *4H ₂ O	151	Sólido rosado inodoro	2.11	27	NA	Agua
Sulfato de zinc heptahidratado	ZnSO ₄ *7H ₂ O	287.6	Sólido blanco inodoro	3.54	100	NA	Agua
Yoduro de potasio	KI	166	Sólido blanco inodoro	3.1	680	1330	Agua
Molibdato de sodio dihidratado	NaMoO ₄ *2H ₂ O	205.9	Sólido blanco inodoro	3.78	687	NA	Agua
Sulfato de cobre pentahidratado	CuSO ₄ *5H ₂ O	249.7	Sólido azul inodoro	2.28	110	NA	Agua
Cloruro de cobalto hexahidratado	CoCl ₂ *6H ₂ O	237.9	Sólido púrpura	1.92	87	1920	Agua
Triplex III	Na ₂ EDTA*2H ₂ O	372.24	Sólido blanco inodoro	1.02	NA	NA	Agua

Sulfato de hierro heptahidratado	FeSO ₄ *7H ₂ O	278.05	Sólido verde-azul inodoro	1.89	64	300	Agua
Myo-inositol	C ₆ H ₁₂ NO ₆	180.16	Sólido blanco inodoro	1.75	227	NA	Agua
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	75.07	Sólido blanco inodoro	1.67	233	NA	Agua
Acido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	123.11	Sólido blanco inodoro	1.47	237	NA	Agua
Piridoxina	C ₈ H ₁₂ CINO ₃	205.64	Sólido blanco inodoro	NA	204	NA	Agua
Tiamina	C ₁₂ H ₁₇ CIN ₄ OS.HCl	337.27	Sólido blanco	NA	248	NA	Agua
Sacarosa	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.3	Sólido dulce blanco	0.95	170	NA	Agua
Alcohol	CH ₃ CH ₂ OH	46.07	Líquido incoloro viscoso	0.789	-114	78.37	Soluble agua y solventes polares.
Hipoclorito de sodio	NaClO	74.45	Líquido amarillento	1.21	NA	NA	Agua

Fuente: MSDS (2018)

Tabla 30. Toxicología de compuestos químicos

Compuesto	Dosis letal	Toxicidad	Antídoto	Desecho
Agua destilada	N/A	Ingestión: NA Inhalación: irritación leve Piel: NA Ojos: NA	Ingestión: NA Inhalación: trasladar al aire Piel: NA Ojos: NA	Depositar en contenedores especiales
Ácido clorhídrico	2.6mg/kg	Ingestión: quemaduras Inhalación: irritación Piel: quemaduras Ojos: Irritación en la córnea	Ingestión: beber abundante agua Inhalación: trasladar al aire fresco Piel: lavar con abundante agua Ojos: Lavar con abundante agua	Llevar a pH 7, diluir en agua a concentración 1:1 Descartar en el lavadero.
Nitrato de amonio	2217mg/kg	Ingestión: mareo, vómito, diarrea Inhalación: tos, dolor garganta Piel: picazón Ojos: Irritación y dolor	Ingestión: beber abundante agua Inhalación: trasladar al aire fresco Piel: lavar con abundante agua Ojos: Lavar con abundante agua	Llevar a pH 7, diluir en agua a concentración 1:1 Descartar en el lavadero.
Nitrato de potasio	3750mg/kg	Ingestión: NA Inhalación: irritación Piel: picazón Ojos: lagrimeo y enrojecimiento	Ingestión: beber abundante agua Inhalación: trasladar al aire fresco Piel: lavar con abundante agua Ojos: Lavar con abundante agua	Llevar a pH 7, diluir en agua a concentración 1:1 Descartar en el lavadero.
Sulfato de magnesio heptahidratado	NA	Ingestión: vómito y diarrea Inhalación: irritación Piel: picazón Ojos: irritación	Ingestión: beber abundante agua Inhalación: trasladar al aire fresco Piel: lavar con abundante agua Ojos: Lavar con abundante agua	Llevar a pH 7, diluir en agua a concentración 1:1 Descartar en el lavadero.
Fosfato ácido de potasio	NA	Ingestión: vómito, gastroenteritis, diarrea Inhalación: irritación Piel: picazón, ardor Ojos: irritación, picazón	Ingestión: beber abundante agua Inhalación: trasladar al aire fresco Piel: lavar con abundante agua Ojos: Lavar con abundante agua	Llevar a pH 7, diluir en agua a concentración 1:1 Descartar en el lavadero.

Cloruro de calcio dihidratado	1000mg/kg	Ingestión: vómito, náusea, Inhalación: irritación, tos Piel: irritación Ojos: irritación, quemadura	Ingestión: beber abundante agua Inhalación: trasladar al aire fresco Piel: lavar con abundante agua Ojos: Lavar con abundante agua	Llevar a pH 7, diluir en agua a concentración 1:1 Descartar en el lavadero.
Acido bórico	2660mg/kg	Ingestión: vómito, náusea, Inhalación: irritación, dolor garganta Piel: irritación y ardor Ojos: irritación, enrojecimiento	Ingestión: beber abundante agua Inhalación: trasladar al aire fresco Piel: lavar con abundante agua Ojos: Lavar con abundante agua	Llevar a pH 7, diluir en agua a concentración 1:1 Descartar en el lavadero.
Sulfato de magnesio tetrahidratado	2150mg/kg	Ingestión: vómito, náusea, Inhalación: irritación, dolor garganta Piel: irritación y ardor Ojos: irritación, enrojecimiento	Ingestión: beber abundante agua Inhalación: trasladar al aire fresco Piel: lavar con abundante agua Ojos: Lavar con abundante agua	Llevar a pH 7, diluir en agua a concentración 1:1 Descartar en el lavadero.
Sulfato de zinc heptahidratado	2150mg/kg	Ingestión: vómito, náusea, Inhalación: irritación, dolor garganta Piel: irritación y ardor Ojos: irritación, enrojecimiento	Ingestión: beber abundante agua Inhalación: trasladar al aire fresco Piel: lavar con abundante agua Ojos: Lavar con abundante agua	Llevar a pH 7, diluir en agua a concentración 1:1 Descartar en el lavadero.
Yoduro de potasio	1862mg/kg	Ingestión: vómito, náusea, fiebre Inhalación: irritación, tos Piel: irritación Ojos: irritación	Ingestión: beber abundante agua Inhalación: trasladar al aire fresco Piel: lavar con abundante agua Ojos: Lavar con abundante agua	Llevar a pH 7, diluir en agua a concentración 1:1 Descartar en el lavadero.
Molibdato de sodio dihidratado	250mg/kg	Ingestión: vómito, náusea, Inhalación: irritación, dolor garganta Piel: irritación y ardor Ojos: irritación, enrojecimiento	Ingestión: beber abundante agua Inhalación: trasladar al aire fresco Piel: lavar con abundante agua Ojos: Lavar con abundante agua	Llevar a pH 7, diluir en agua a concentración 1:1 Descartar en el lavadero.
Sulfato de cobre pentahidratado	300mg/kg	Ingestión: vómito, náusea, Inhalación: irritación, dolor garganta Piel: irritación y ardor Ojos: irritación, enrojecimiento	Ingestión: beber abundante agua Inhalación: trasladar al aire fresco Piel: lavar con abundante agua Ojos: Lavar con abundante agua	Llevar a pH 7, diluir en agua a concentración 1:1 Descartar en el lavadero.
Cloruro de cobalto hexahidratado	766mg/kg	Ingestión: vómito, náusea, Inhalación: irritación, dolor garganta Piel: irritación y ardor Ojos: irritación, enrojecimiento	Ingestión: beber abundante agua Inhalación: trasladar al aire fresco Piel: lavar con abundante agua Ojos: Lavar con abundante agua	Llevar a pH 7, diluir en agua a concentración 1:1 Descartar en el lavadero.
Triplex III	NA	Ingestión: vómito, náusea, Inhalación: irritación, dolor garganta Piel: irritación y ardor Ojos: irritación, enrojecimiento	Ingestión: beber abundante agua Inhalación: trasladar al aire fresco Piel: lavar con abundante agua Ojos: Lavar con abundante agua	Llevar a pH 7, diluir en agua a concentración 1:1 Descartar en el lavadero.
Sulfato de hierro heptahidratado	500mg/kg	Ingestión: vómito, náusea, Inhalación: irritación, dolor garganta Piel: irritación y ardor Ojos: irritación, enrojecimiento	Ingestión: beber abundante agua Inhalación: trasladar al aire fresco Piel: lavar con abundante agua Ojos: Lavar con abundante agua	Llevar a pH 7, diluir en agua a concentración 1:1 Descartar en el lavadero.
Myo-inositol	1000mg/kg	Ingestión: vómito, náusea, Inhalación: irritación, dolor garganta Piel: irritación y ardor Ojos: irritación, enrojecimiento	Ingestión: beber abundante agua Inhalación: trasladar al aire fresco Piel: lavar con abundante agua Ojos: Lavar con abundante agua	Llevar a pH 7, diluir en agua a concentración 1:1 Descartar en el lavadero.
Glicina	2600mg/kg	Ingestión: vómito, náusea, Inhalación: irritación, dolor garganta Piel: irritación y ardor Ojos: irritación, enrojecimiento	Ingestión: beber abundante agua Inhalación: trasladar al aire fresco Piel: lavar con abundante agua Ojos: Lavar con abundante agua	Llevar a pH 7, diluir en agua a concentración 1:1 Descartar en el lavadero.
Acido nicotínico	300mg/kg	Ingestión: vómito, náusea, Inhalación: irritación, dolor garganta Piel: irritación y ardor Ojos: irritación, enrojecimiento	Ingestión: beber abundante agua Inhalación: trasladar al aire fresco Piel: lavar con abundante agua Ojos: Lavar con abundante agua	Llevar a pH 7, diluir en agua a concentración 1:1 Descartar en el lavadero.
Piridoxina	4000mg/kg	Ingestión: vómito, náusea, Inhalación: irritación, dolor garganta Piel: irritación y ardor	Ingestión: beber abundante agua Inhalación: trasladar al aire fresco Piel: lavar con abundante agua Ojos: Lavar con abundante agua	Llevar a pH 7, diluir en agua a concentración 1:1 Descartar en el

		Ojos: irritación, enrojecimiento		lavadero.
Tiamina	8226mg/kg	Ingestión: vómito, náusea, Inhalación: irritación, dolor garganta Piel: irritación y ardor Ojos: irritación, enrojecimiento	Ingestión: beber abundante agua Inhalación: trasladar al aire fresco Piel: lavar con abundante agua Ojos: Lavar con abundante agua	Llevar a pH 7, diluir en agua a concentración 1:1 Descartar en el lavadero.
Sacarosa	29700 mg/kg	Ingestión: vómito, náusea, Inhalación: irritación, dolor garganta Piel: irritación y ardor Ojos: irritación, enrojecimiento	Ingestión: beber abundante agua Inhalación: trasladar al aire fresco Piel: lavar con abundante agua Ojos: Lavar con abundante agua	Llevar a pH 7, diluir en agua a concentración 1:1 Descartar en el lavadero.
Alcohol	8 g/kg en adultos y 3g/kg en niños	Inhalación: Irritación Edemas y bronconeumonía. Piel: Quemaduras Ojos: Quemaduras y ceguera. Ingestión: Quemaduras	Ingestión: beber abundante agua Inhalación: trasladar al aire fresco Piel: lavar con abundante agua Ojos: Lavar con abundante agua	Llevar a pH 7, diluir en agua a concentración 1:1 Descartar en el lavadero.
Hipoclorito de sodio	5000mg/kg	Ingestión: vómito, náusea, Inhalación: irritación, dolor garganta Piel: irritación y ardor Ojos: irritación, enrojecimiento	Ingestión: beber abundante agua Inhalación: trasladar al aire fresco Piel: lavar con abundante agua Ojos: Lavar con abundante agua	Llevar a pH 7, diluir en agua a concentración 1:1 Descartar en el lavadero.

Fuente: MSDS (2018)