



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

CENTRO UNIVERSITARIO UAEM TEXCOCO

DISEÑO Y AUTOMATIZACIÓN DE UN NUEVO BIORREACTOR PARA
SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA COMPUTACIÓN**

PRESENTA

CLARA ANABEL ARREDONDO RAMÍREZ

TUTOR ACADÉMICO

DR. JOEL AYALA DE LA VEGA

TUTORES ADJUNTOS

DRA. EN ED. IRENE AGUILAR JUÁREZ

DR. EN C. DE LA COMP. FARID GARCÍA LAMONT

TEXCOCO ESTADO DE MÉXICO, FEBRERO 2019



Universidad Autónoma del Estado de México

Centro Universitario UAEM Texcoco

DICTÁMEN DE AUTORIZACIÓN Y OBTENCIÓN DE GRADO DE MAESTRÍA

Texcoco, Méx., a 7 de Enero del 2019

Título del proyecto:

DISEÑO Y AUTOMATIZACIÓN DE UN NUEVO BIORREACTOR PARA SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL

Tesista:

CLARA ANABEL ARREDONDO RAMÍREZ

Dictamen:

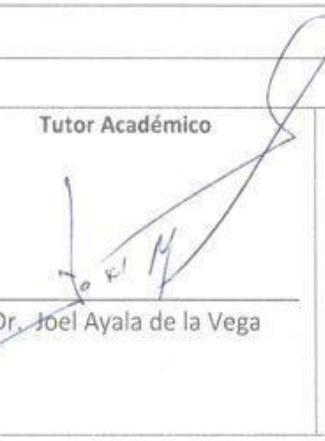
No. de revisión: 3

- Rechazado
 Sujeto a modificaciones
 Aceptado, condicionado
 Aceptado

Observaciones generales:

Aceptado para la impresión

Aceptado para la defensa de grado

Tutor Adjunto	Tutor Académico	Tutor Adjunto
 Dra. Irene Aguilar Juárez	 Dr. Joel Ayala de la Vega	 Dr. Farid García Lamont



Centro Universitario UAEM Texcoco
Av. Jardín Zumpango s/n. Fracc. El Tejocote
C.P. 56259 Texcoco, Estado de México.
Tels. (595) 9211216 - 9211247 - 9210368 - 9210493
e-mail: cutex.uaem@gmail.com.

CUTex

DEDICATORIA

A mi madre:

Por ser un ejemplo de superación profesional durante todos estos años, enseñándome a esforzarme por alcanzar mis metas. Por tu amor, dedicación y comprensión.

A mis hermanos Héctor y Gustavo.

Por su confianza, su cariño y su afecto. Que esto sea un parteaguas para que ellos se motiven a alcanzar sus metas y sus sueños.

A mi padre

Por todo el amor que siempre me has dado y el apoyo incondicional que me has brindado a lo largo de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por todos los recursos económicos recibidos para llevar a cabo esta investigación.

A la Universidad Autónoma del Estado de México por haberme formado en el ámbito académico, por todas las enseñanzas y las experiencias obtenidas durante toda mi estancia en este recinto, especialmente a mi tutor el Dr. Joel Ayala de la Vega por su paciencia, dedicación, ser un excelente guía y por su gran ayuda a lograr mi propósito.

Al Colegio de Posgraduados por todas las facilidades brindadas al momento de realizar la investigación como el préstamo de las instalaciones, material bibliográfico, etc., y sobre todo al Dr. Gregorio Arellano Ostoia por su paciencia al explicarme temas que no son de mi dominio, su apoyo, la gran paciencia y la confianza depositada.

A todas las personas que directa o indirectamente apoyaron al desarrollo de esta investigación. Al Dr. Oziel Lugo Espinosa por motivarme a realizar este proyecto, a la Dra. Irene Aguilar Juárez por todos los consejos. A mi primo Luis Alberto Gómez por su apoyo, a mis compañeros de clase y a todas las personas que han formado parte de este proyecto. Gracias a todos.

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria.....	i
Agradecimientos.....	ii
Índice General.....	iii
Índice de Imágenes.....	vi
Índice de diagramas.....	viii
Resumen.....	ix
Introducción.....	1
Capítulo 1: Definición de la problemática.....	3
1.1 Planteamiento del problema.....	3
1.2 Objetivos.....	5
1.2.1 Objetivo General.....	5
1.2.2 Objetivos Específicos.....	5
1.3 Hipótesis.....	5
1.4 Justificación.....	5
1.5 Metodología.....	6
1.6 Antecedentes.....	8
Capítulo 2 Marco Teórico.....	10
2.1 Propagación <i>in vitro</i>	10
2.2 Teoría de los Sistemas de Inmersión Temporal.....	11
2.3 Etapas del proceso de propagación masiva en un SIT.....	12
2.3.1 Establecimiento del cultivo.....	14
2.3.2 Desinfestación.....	15
2.3.3 Multiplicación.....	16
2.3.4 Enraizamiento.....	16
2.3.5 Aclimatación.....	17
2.4 Medios de cultivo.....	19
2.4.1 Medios de cultivo semisólido.....	19
2.4.2 Medios de cultivo líquido.....	19
2.5 Características del Sistema de Inmersión Temporal.....	19
2.6 Métodos de esterilización.....	22
2.6.1 Calor.....	24
2.6.2 Nanopartículas de plata.....	25

<i>Capítulo 3</i> Antecedentes. trabajos relacionados.....	28
3.1 Columna charola	28
3.2 Biorreactor Growtek	30
3.3 Biorreactor de inmersión temporal BIT	31
3.4 Biorreactor de inmersión por gravedad BIG	32
3.5 Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado RITA.....	33
3.6 Biorreactor tipo Matis.....	35
<i>Capítulo 4</i> Análisis de requerimientos y Modelado.....	37
4.1 Introducción	37
4.2 Perspectiva del producto	37
4.2.1 Limitaciones del sistema.....	38
4.2.2 Ambiente físico	38
4.3 Funcionalidad del producto	38
4.4 Características del usuario	39
4.5 Modelado de la Interfaz	40
4.6 Elementos adicionales.....	41
4.6.1 Hardware	41
4.6.2 Software.....	41
4.6.3 Diagrama de casos de uso	41
<i>Capítulo 5</i> Desarrollo	48
5.1 Prototipo N. 1.....	48
5.1.1 Materiales.....	48
5.1.2 Procedimiento.....	51
5.1.3 Resultados del Prototipo N. 1.....	57
5.2 Prototipo N. 2.....	58
5.2.1 Materiales.....	58
5.2.2 Procedimiento.....	60
5.2.3 Resultados Prototipo N. 2.....	67
5.3 Resultados	68
5.3.1 Integración de hardware y automatización.....	68
5.3.2 Hardware	68
5.3.3 Software.....	74
5.3.4 Interfaz	87
<i>Capítulo 6</i> Conclusiones.....	90
6.1 Discusión general	90
6.2 Trabajos futuros	92
Referencias.....	93
<i>Anexo A</i> : Comparativa de costes RITA, Prototipo N. 1 y Prototipo N. 2.....	97

Anexo B : Acuse Artículo Científico 99

ÍNDICE DE IMÁGENES

Ilustración 1 Funcionamiento de un SIT	3
Ilustración 2 Biorreactor Artesanal de vidrio.....	4
Ilustración 3 Ejemplo de micropropagación in vitro	8
Ilustración 4 Fases de micropropagación en Sistemas de Inmersión Temporal	13
Ilustración 5 Corte de un explante.....	14
Ilustración 6 Desinfestación del explante utilizando un fungicida.	15
Ilustración 7 Aclimatación de un brote.....	18
Ilustración 8 Esterilización por medio de nanopartículas de plata	26
Ilustración 9 Biorreactor tipo columna charola	29
Ilustración 10 Biorreactor tipo Growtek.....	31
Ilustración 11 Sistema tipo RITA semi automatizado	35
Ilustración 12 Biorreactor tipo Matis.....	36
Ilustración 13 Recipiente utilizado para diseñar el prototipo N. 1.....	49
Ilustración 14 Coladera de plástico para contener los explantes.....	50
Ilustración 15 Manguera de látex de laboratorio	50
Ilustración 16 Bomba de vacío utilizada en Colpos	51
Ilustración 17 Barrenos realizados para la colocación de las mangueras	52
Ilustración 18 Coladera fijada dentro del contenedor de plástico	52
Ilustración 19 Manguera clorada dentro del recipiente	53
Ilustración 20 Manguera fijada al fondo del contenedor	53
Ilustración 21 Orificios realizados a lo largo de la manguera.....	54
Ilustración 22 Ensamble del prototipo N. 1	54
Ilustración 23 Manguera PVC	55
Ilustración 24 Mangueras colocadas dentro del contenedor.....	56
Ilustración 25 Láminas de vidrio dentro del contenedor	56
Ilustración 26 Prototipo N. 1 terminado (segunda etapa).....	57
Ilustración 27 Recipiente de plástico hermético	59
Ilustración 28 Motor a pasos	59
Ilustración 29 Tornillo CNC	60
Ilustración 30 Diseños propuestos.....	60
Ilustración 31 Recipiente N. 1 deformado	61
Ilustración 32 Plataforma fabricada con acrílico	62
Ilustración 33 Deformación del émbolo con acrílico	62

Ilustración 34 Resultados de la introducción al autoclave	63
Ilustración 35 Embolo fabricado con nylamind	64
Ilustración 36 Tapa del contenedor	65
Ilustración 37 Colocación de guías de nylamind.....	65
Ilustración 38 Cople para el motor a pasos	66
Ilustración 39 Contenedor armado.....	66
Ilustración 40 Prototipo N. 2.....	67
Ilustración 41 Elementos de un motor a pasos	69
Ilustración 42 Placa Arduino	70
Ilustración 43 Elementos de Raspberry pi	71
Ilustración 44 Interfaz Raspbian	73
Ilustración 45 Configuración de la placa Arduino	77
Ilustración 46 Configuración del puerto de Arduino	78
Ilustración 47 Variables principales a utilizar en Arduino	78
Ilustración 48 Configuración de pines	78
Ilustración 49 Código Arduino	80
Ilustración 50 Descripción de expresiones CRON.....	84
Ilustración 51 Construcción de valores.....	85
Ilustración 52 Obtención de datos.....	85
Ilustración 53 Revisión de errores	86
Ilustración 54 Ingreso de datos.....	86
Ilustración 55 Agregando una nueva librería.....	87
Ilustración 56 Código de conexión Arduino-java	87
Ilustración 57 Interfaz de usuario	88
Ilustración 58 Muestra de mensaje de error	89

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1 Diagrama del ciclo de vida V aplicado al desarrollo del biorreactor	7
Diagrama 2 Pasos del establecimiento in vitro.....	21
Diagrama 3 Pasos del establecimiento in vitro en un SIT.....	22
Diagrama 4 Métodos de esterilización	24
Diagrama 5 Funcionamiento de un biorreactor tipo BIT	32
Diagrama 6 Funcionamiento de un biorreactor tipo RITA.....	34
Diagrama 7 Diagrama de casos de uso	42
Diagrama 8 Diagrama de flujo	76

RESUMEN

El siguiente trabajo presenta una propuesta útil para la elaboración de un biorreactor automatizado que permite ser una alternativa viable para la micropropagación de diferentes especies vegetales, se logró la mejora significativa en cuanto a costos de producción comprado con el sistema utilizado actualmente. Además, se logró aumentar la capacidad de propagación de estos biorreactores.

Se presentan los pasos llevados a cabo durante la realización del presente trabajo como:

- La fundamentación teórica obtenida de material bibliográfico
- La descripción del entorno de trabajo
- Se identificaron las propiedades requeridas del personal
- La validación de materiales viables, así como forma y costos
- Se describe el desarrollo de los prototipos
- Y las pruebas para validar su eficacia

Además se presenta también el desarrollo de software para su automatización, para la cual se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- Análisis de requerimientos: En el cual se modelan, especifican y verifican las solicitudes del usuario, en este caso, el investigador biológico y se definen los lineamientos y pautas para analizarlas y definir el alcance del proyecto
- Especificaciones: Se determina la forma en cómo debe comportarse el sistema y su interacción con el usuario
- Diseño: Se determina cómo funcionará el sistema de forma general y cómo se incorporan distintos componentes que dan respuesta a las funcionalidades requeridas por el usuario
- Desarrollo: Se tienen los lineamientos para la generación de código
- Pruebas: Se comprueba que el software responda correctamente a las indicaciones especificadas

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la implementación tecnológica se ha convertido en una herramienta importante para la elaboración de diferentes actividades humanas beneficiando a la sociedad en distintos ámbitos. Una de estas actividades es la agricultura, la cual está en constante crecimiento por ser un pilar importante para el sustento de la humanidad.

Las actividades basadas en tecnologías agrícolas que ayudan a la producción de especies vegetales no sólo tienen la finalidad de beneficiar los cultivos produciendo los alimentos necesarios para el desarrollo humano, sino que además benefician la conservación de diversos hábitats en peligro de extinción o la preservación de alguna especie endémica. Por lo tanto, el saber aplicar estas tecnologías en diversas actividades agrícolas ha sido de mucha importancia para continuar innovando en beneficio de todas las especies y la naturaleza.

Se ha destacado que la reproducción de especies vegetales es importante para el desarrollo humano. Gracias a la colaboración de Centros de investigación como el Colegio de Posgraduados, México es un país que ha buscado el desarrollo de una agricultura sustentable empleando diversas tecnologías a su servicio. (Campos Figueroa & Llanderal Cazáres, 2003)

Hoy en día los cultivos expuestos a la intemperie han tenido menor producción que aquellos cultivados mediante la implementación de tecnologías y sistemas específicos, que aceleran la producción y mejoran la calidad del producto al tener un entorno regulado (Campos Figueroa & Llanderal Cazáres, 2003).

Al no contar con un ambiente controlado, se afecta directamente a los productores ya que en muchos casos la producción se lleva a cabo de un solo cultivo o un solo ciclo, limitando la competitividad y sin recuperar la inversión y lo cosechado sólo es apto para el propio consumo. Los aportes de las ciencias computacionales pueden orientarse al cuidado de cultivos por medio de programación de labores automáticas y observación o revisión continua del desarrollo del cultivo con el fin de mejorar la producción y calidad de las cosechas (Rodríguez & Santana, 2015) El sistema de biorreactores de inmersión temporal (SIT), es una técnica que se ha empleado para la micropropagación de varias especies agrícolas y forestales (Etienne, y otros, 1997). También se tienen grandes ventajas al disminuir la manipulación manual intensiva, incrementar la tasa de proliferación (Jones Castro & Flores Mora, 2007) reducir costos de producción y mejorar la calidad del material vegetal (Etienne & Berthouly, Temporary immersion systems in plant micropropagation, 2002) incluyendo la clonación de especies difíciles de propagar o aquellas que están en peligro de extinción. Los cultivos pueden ser iniciados a partir de varias porciones de

tejido vegetal, por ejemplo de una hoja pueden regenerarse embriones somáticos o brotes adventicios (Mallón, Covelo, & Veitez, 2011) que para mantener su multiplicación se requiere del control del medio de cultivo, así como del fotoperiodo la calidad de la luz y la temperatura de forma continua y periódica durante el día y la noche, desde el inicio de su desarrollo hasta que son capaces de sobrevivir en condiciones de invernaderos (Pino, Jova, Kosky, Torres, & García, 2011)

Un SIT se compone de frascos (biorreactores), cada uno tiene dos compartimentos, uno superior donde crecen los explantes y otro en la parte inferior, donde se coloca el medio de cultivo líquido (Etienne & Berthouly, Temporary immersion systems in plant micropropagation, 2002) A este sistema se le aplica un flujo de aire a presión por medio de un compresor que hace que suba el medio de cultivo líquido y lo pone en contacto con los explantes por tiempos intermitentes. Después de que cesa la inyección de aire el medio de cultivo desciende por gravedad. Este sistema provoca cambios en la atmosfera interna del frasco, trayendo consigo un mayor crecimiento y desarrollo del cultivo, además de que se mantiene una capa superficial de medio de cultivo hasta la próxima inmersión (Maldonado, De Francisco, & Gómez).

La automatización de un SIT y sus efectos en cuanto a mejora y aumento de producción agrícola, tiene una relación directa con el desarrollo sustentable al contribuir con la conservación de hábitats naturales mediante la propagación de especies amenazadas, como ya se ha mencionado anteriormente. Hoy en día existen aplicaciones y mecanismos que interfieren en el control del SIT, por ejemplo se han empleado electroválvulas conectadas a un compresor con encendido automático y mangueras de silicón que llegan hasta el fondo del biorreactor controlando su activación con un temporizador programable para determinar la frecuencia y duración de la inmersión (Pino, Jova, Kosky, Torres, & García, 2011). Se han usado técnicas para regular la temperatura o el suministro de nutrientes al biorreactor, para mejorar el crecimiento y la multiplicación de los explantes. Cabe mencionar que el uso, control y manejo de estos elementos es complicado y requiere de la preparación del personal así como de su supervisión constante para mejorar y aumentar la producción vegetal.

Es de gran importancia la automatización de los SIT y el manejo de un ambiente controlado que garantice la supervivencia de las especies, además de liberarla de cualquier infección o plaga que pueda llegar a contraer durante su desarrollo.

CAPÍTULO 1: DEFINICIÓN DE LA PROBLEMÁTICA

1.1 Planteamiento del problema

En el laboratorio de biorreactores de inmersión temporal del Postgrado en Fruticultura del Colegio de Postgraduados (ColPos), se tiene establecida la técnica de micro propagación convencional y en biorreactores de inmersión temporal; sin embargo, los biorreactores presentan algunas desventajas, entre ellas: el volumen de los ellos es reducido, por lo que sólo se propaga una cantidad limitada de los cultivos, los biorreactores son de policarbonato que es un material que se va opacando con las esterilizaciones y además son de importación por lo que son costosos.

El Sistema de Inmersión Temporal estándar que utiliza contenedores pequeños es inapropiado para la gran producción de masa que se pretende adquirir, ya que requiere un gran número de envases y tiene altos costos de producción debido a que es un material de importación como ya se mencionó.

En la ilustración 1 se muestra el funcionamiento de un Sistema tipo RITA®, en él se observan 3 biorreactores de 1 L cada uno, los cuales contienen material vegetal que ya ha comenzado el proceso de diferenciación. Los 3 están conectados entre sí por medio de una manguera de látex por donde pasa el aire filtrado para dar inicio a la inmersión.



*Ilustración 1 Funcionamiento de un SIT
Fuente: Elaboración propia en ColPos*

En el caso del Colegio de Posgraduados, aparte de contar con el Sistema tipo RITA, se han diseñado diferentes tipos de biorreactores que trabajan bajo el mismo concepto del RITA con algunas desventajas:

- Son complicados para su manipulación por el frágil material que los compone que en su mayoría es de vidrio.
- Son peligrosos, ya que muchas veces al momento de su limpieza se llegan a romper causando accidentes
- El tamaño y volumen no es óptimo

A continuación se presenta la siguiente imagen donde se puede observar la estructura de un biorreactor artesanal de vidrio. En la ilustración A se visualiza un grupo de biorreactores los cuales funcionan bajo el mismo principio el biorreactor tipo RITA. En la imagen B se observa más de cerca su estructura en la cual se pueden visualizar dos anillos en la parte central, estos anillos dan soporte a toda la estructura y al mismo tiempo evitan que aire contaminado se filtre por las hendiduras.



A



B

*Ilustración 2 Biorreactor Artesanal de vidrio
Fuente: Elaboración propia en ColPos*

Sin embargo, es importante señalar, que a pesar de todos los avances que se han tenido en el área de cultivo *in vitro* y las metodologías tradicionales de propagación, hasta la fecha no se ha logrado satisfacer al cien por ciento la demanda de las plantas que se requieren, debido a que

normalmente se requieren medios de cultivo semisólidos gelificados, alto número de recipientes de cultivo, salas de crecimiento con numerosos estantes y mayor cantidad de personas dedicadas a la siembra y mantenimiento mediante subcultivos de plantas en las diferentes fases de la micropropagación. Por lo tanto, esta tecnología se aplica sólo a aquellas especies que presentan dificultad para propagarse por semilla o están enfermas y/o un alto retorno económico; en el resto de los casos, los costos de producción de las vitroplantas es tan elevado que limita su uso comercial. (Albarrán, y otros, 2014).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Diseñar y construir un biorreactor automatizado mediante software de bajo costo y fácil manejo que permita propagar especies a través de sistemas de inmersión temporal

1.2.2 Objetivos Específicos

- Proponer materiales adecuados para construir, diseñar y disminuir costos de producción de un biorreactor de mayor volumen que permita la aplicación de la técnica de micropropagación a través de sistemas de inmersión temporal.
- Realizar la prueba de calor en el autoclave de los materiales a utilizar en la construcción de biorreactor para verificar su rendimiento
- Construcción del biorreactor de acuerdo a los requerimientos especificados por el investigador biológico
- Automatizar el biorreactor mediante un software que permita la inmersión temporal de los explantes con la mínima intervención humana.
- Validar y generar propuestas de mejora

1.3 Hipótesis

Con el diseño y construcción del biorreactor propuesto se podrá incrementar la capacidad de regeneración de plantas micropropagadas, respecto al modelo convencional; y permitirá disminuir costos de producción así como el aumento de la tasa de rendimiento y facilitará la técnica de propagación a través de la automatización.

1.4 Justificación

Como ya se ha mencionado anteriormente, tanto el mercado nacional como el internacional requieren cada vez más una mayor reproducción de especies vegetales.

Uno de las mayores dificultades que han surgido al utilizar el sistema RITA es su alto costo por ser material de importación, además de que su volumen es pequeño que hace que se requieran varios biorreactores para cumplir con la demanda de plantas. Por otro lado, la autoatización del sistema de inmersión temporal (SIT) por lo general se logra con el uso de PLC's o timers, que dificultan la operación cuando se tienen varios biorreactores ya sea de tipo RITA o BiT por mencionar algunos.

Recientemente desarrollaron un software (Lugo Espinosa, Arellano Ostoa, & Hernández Cote, 2017) utilizando plataformas libres para controlar la automatización del SIT que se tiene en el laboratorio de Inmersión temporal del PREGEP-FRUTICULTURA y que ha servido de base para desarrollar o innovar otros tipos de biorreactores con el objetivo de aumentar el volumen de ellos para incrementar la capacidad de propagación de las especies que ahí se desarrollan y que sea de bajo costo.

1.5 Metodología

El proyecto consiste desde la descripción del diseño del nuevo biorreactor que cumpla con las características deseables para su correcto funcionamiento hasta el desarrollo del mismo, el cual implica además, todos los aspectos de la obtención de materiales y su construcción, incluyendo su automatización.

Para llevar a cabo este proyecto se utilizó una metodología de desarrollo de hardware y software embebidos conocida como ciclo de desarrollo clásico V o metodología V. El concepto de embebido se refiere al hardware y software que trabajan en conjunto como un todo y de manera “invisible” al usuario como lo indica (Pérez, Berreteaga, Ruíz de Olano, Urkidi, & Pérez, 2006).

En el modelo V se definen las siguientes etapas de desarrollo:

- Definición de especificaciones (Fase 1): Se deben definir y documentar los diferentes requisitos del sistema a desarrollar.
- Diseño global (Fase 2): También es llamado diseño de alto nivel. Su objetivo es obtener un diseño y visión general del sistema.
- Diseño en detalle (Fase 3): Consiste en detallar cada bloque obtenido de la fase anterior.
- Implementación (Fase 4): Es la fase en la que se materializa el diseño en detalle.
- Test Unitario (Fase 5): En esta fase se verifica cada módulo de hardware y software de forma unitaria, comprobando su funcionamiento adecuado.
- Integración (Fase 6): En esta fase se integran los distintos módulos que forman al sistema. Se comprueba además el funcionamiento de los requisitos establecidos.
- Test operacional del sistema (Fase 7): Se realizan las últimas pruebas pero sobre un escenario real, en su ubicación final, registrando las pruebas llevadas a cabo y los resultados obtenidos.

En el siguiente diagrama se pueden visualizar los pasos a seguir para llevar a cabo el desarrollo del presente proyecto aplicando las etapas del modelo V.

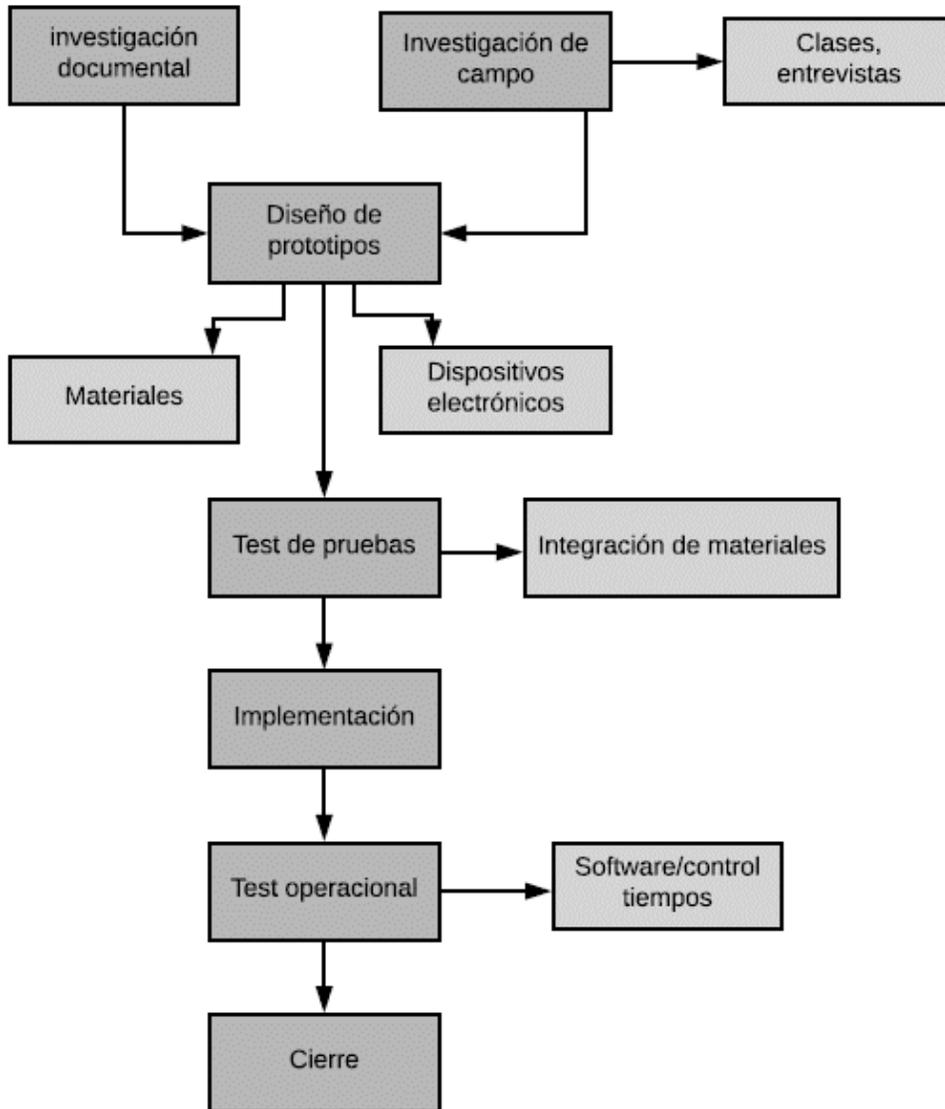


Diagrama 1 Diagrama del ciclo de vida V aplicado al desarrollo del biorreactor
Fuente: Elaboración propia

1.6 Antecedentes

Desde hace tiempo se han buscado variantes para lograr hacer una herramienta útil para la propagación del mayor número de plantas, es decir, buscar alternativas que sean sustentables y eficientes.

Una de las técnicas más famosas es utilizar un sistema propagación *in vitro*, que significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial, esta es una técnica que exige un control específico del ambiente, tanto físico como químico en el que se va a situar el brote también denominado explante.

A continuación se presenta una imagen dónde se muestra cómo es la técnica de cultivo *in vitro*. Se observa que se tiene un frasco de vidrio pequeño con material vegetal, lo que se muestra al fondo del frasco es un medio de cultivo en gel llamado agar que realiza las funciones similares como si el explante estuviera en el ambiente físico. El frasco debe estar completamente hermético para evitar cualquier contaminación de los brotes.



Ilustración 3Ejemplo de micropropagación in vitro
Fuente: Elaboración propia en ColPos

La técnica de biorreactores surgió como alternativa a esta. En el laboratorio de Inmersión temporal del Posgrado de Recursos Genéticos-Fruticultura del Colegio de Posgraduados, se trabaja con el sistema tipo RITA, el cual gracias a la semi automatización se ha logrado tener una mejoría en cuanto al control de las especies cultivadas, además de disminuir el uso del recurso humano; todo esto por medio de la programación de electro válvulas, un manómetro de contacto, un timer y una bomba de vacío.

En el año 2017 en el Posgrado de Ciencias de la Computación en el área de Cómputo Aplicado de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM) junto con el Posgrado de Recursos Genéticos y Fruticultura (ColPos) se dieron a la tarea de desarrollar un software para la automatización de un SIT del laboratorio de biorreactores de Inmersión Temporal del CP, con la

finalidad de disminuir la necesidad de ocupar personal para el monitoreo del SIT. (Lugo Espinosa, Arellano Ostoa, & Hernández Cote, 2017).

Todo el desarrollo de esa investigación, han sido una parte muy importante para la realización del presente trabajo, ya que indica de dónde hay que partir para poder hacer cambios relevantes a lo que ya se opera hoy en día, pero como ya se ha mencionado, se requiere realizar un nuevo diseño de biorreactores para tener mayor capacidad que pueda mejorar significativamente el uso de biorreactores.

Este sistema instalado en la actualidad ha facilitado la operación del sistema por personal que trabaja en el laboratorio de inmersión temporal del Colegio de Posgraduados, sin embargo, ahora se pretende controlar un sistema de biorreactores de una manera más sencilla, por lo que se requiere continuar avanzando en la innovación y el desarrollo de otras técnicas para la producción de plantas, minimizando los costos sin sacrificar la calidad de las plantas obtenidas, es decir; conseguir los mejores resultados posibles, aplicando los conocimientos necesarios para poder realizarlo. Todo esto, nos embarca a una tarea que se sabe que no terminará, ya que se pretende seguir avanzando de acuerdo a las necesidades que vayan surgiendo con el tiempo. Pensando en los trabajos realizados en el pasado, se da una perspectiva más amplia de los objetivos a los que se quiere llegar y las necesidades que se deben cubrir.

Capítulo 2 MARCO TEÓRICO

2.1 Propagación *in vitro*

La propagación *in vitro* es un conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento y/o crecimiento de células o tejidos en un medio nutritivo en condiciones ambientales controladas, es decir; cultivar plantas en un frasco de vidrio en un ambiente artificial (Castillo, 2004)

Se ha enfatizado ya la importancia de la propagación vegetativa. Esto forma parte de las técnicas agrícolas convencionales, que no satisfacen las demandas para el autoabastecimiento de nuestro país por la baja eficiencia de los métodos de propagación desarrollados.

El científico alemán de nombre Haberlandt, postuló a principios del siglo pasado que las plantas eran capaces de reproducir su crecimiento a partir de células aisladas, pero fue en la década de los cincuentas cuando se determina la importancia del balance hormonal en las plantas, con el descubrimiento de las hormonas vegetales más usadas en la actualidad.

La expresión cultivo *in vitro* de plantas se caracteriza por dos principios fundamentales:

- Asepsia: Desinfección de las superficies (tejidos y áreas de trabajo), es decir; libre de gérmenes.
- Control de diversos factores (ambiente, nutrición y balance hormonal) que afectan el crecimiento de las plantas.

Una vez que se inicia el cultivo de los explantes bajo las condiciones de laboratorio se agraga otro concepto importante:

- Suministrar al explante todo aquello que antes obtenía de forma natural en las plantas.

Para controlar todos estos factores, en los últimos años se ha avanzado en el estudio de las plantas a nivel celular y molecular que hace posible la reproducción de las mismas en el laboratorio.

Sin embargo, la generación en condiciones de laboratorio y controlar todos los factores que conforman el ambiente de una planta es complicado; es por ello que para un sistema de propagación *in vitro* se realiza una simplificación de la realidad con lo cual se escogen aquellos factores que se puedan mantener controlados y se utilizan los llamados explantes, que son una

parte del órgano o tejido vegetal que se va a cultivar *in vitro*, es decir, no se estudia del todo el ser vivo, sino con una parte del mismo.

La micropropagación o es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro* de tejidos y consiste en que a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. El explante más usado para los procesos de propagación *in vitro* son las yemas vegetativas de las plantas. Los frascos que contienen las plantas se ubican en estanterías con luz artificial dentro de la cámara de crecimiento, donde se fija la temperatura en valores que oscilan entre los 22 y 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas luz por 8 de oscuridad. Por su parte, el medio de cultivo se compone de una mezcla de sales minerales, vitaminas reguladores de crecimiento, azúcar, agua y agar. La composición del medio depende de la especie vegetal y de la etapa del proceso de micropropagación.

2.2 Teoría de los Sistemas de Inmersión Temporal

Conjuntamente con las técnicas biotecnológicas del cultivo *in vitro* se ha trabajado en los últimos años a nivel mundial en la automatización de la micropropagación, para lograr la propagación de especies vegetales de interés agrícola y económico.

Como alternativa a la problemática se ha llevado a cabo el desarrollo de tecnologías que permitan automatizar los procedimientos de micropropagación (proliferación, elongación y enraizamiento) que puedan ser aplicados a diferentes cultivos y que además favorezcan la aclimatización y endurecimiento de plantas en condiciones de umbráculo. De esta manera, se utiliza la tecnología de los biorreactores tradicionales.

El empleo de un Sistema de Inmersión Temporal basado en el contacto intermitente del medio de cultivo con los explantes, facilita el desarrollo de los procesos a gran escala, reduce los costos de producción, y genera un aumento de la productividad del material propagado (Etienne & Berthouly, Temporary immersion systems in plant micropropagation, 2002).

El principio de un Sistema de Inmersión Temporal es aquel en el que pequeñas plántulas introducidas en frascos con las características adecuadas y los nutrientes adecuados pueden desarrollarse y multiplicarse satisfactoriamente, es decir; el SIT, se basa en la inmersión de explantes en medios de cultivo por cortos periodos de tiempo que producen el incremento de su multiplicación. El principio de la inmersión temporal se basa en que el medio de cultivo líquido se pone en contacto con los tejidos vegetales de forma intermitente (puede ser en frascos independientes, caso del BIT o en el mismo recipiente pero en la parte inferior de este, caso RITA), a estos frascos se les ha denominado biorreactores, ya que en ellos se llevan a cabo todos los procesos biológicos para la división celular, fotosíntesis entre otros. Este sistema semi automatizado fue creado en el año 1997 en el CIRAD (Centro de Cooperación Internacional en Investigación Agronómica para el Desarrollo) de Francia; y se logró a partir de que un medio de cultivo líquido que contenía la concentración de nutrientes, hormonas, vitaminas y azúcares

adecuadas y condiciones físicas óptimas permiten el crecimiento de los tejidos que estaban contenidos en la parte superior de un frasco y fueron bañados a partir de la aplicación de un flujo de aire comprimido, para después que cesara la aplicación del aire consecutivamente el medio descendiera por gravedad.

Dependiendo de la especie, el período de tiempo empleado para la regeneración de plantas utilizando biorreactores puede ser relativamente corto y genera gran cantidad de plantas, lo cual influye drásticamente en la disminución de los costos de producción. El efecto positivo de la inmersión temporal sobre la micropropagación se presenta en la proliferación de brotes, microestacas, microtuberización y embriogénesis somática de diferentes especies (Etienne & Berthouly, Temporary immersion systems in plant micropropagation, 2002). Esta tecnología se ha desarrollado exitosamente en diferentes países para la propagación de banano, café (Albarrán, y otros, 2014) cítricos, caucho (Etienne, y otros, 1997) papa, eucalipto (Castro & González Olmedo, 2002) y piña (Escalona, González Olmedo, Lorenzo Feijoo, & Desjardins, 1999).

Estos biorreactores se diseñaron basándose en el uso de medios de cultivo líquidos y la semiautomatización del proceso para la micropropagación de varias especies con la finalidad de aumentar las tasas de multiplicación de especies vegetales de interés agrícola, forestal y medicinal; de esta manera se obtiene un mayor número de plantas por recipiente, el reemplazo del medio de cultivo es sencillo y demanda poca mano de obra.

Se ha comprobado que el cultivo en sistemas de inmersión temporal ha logrado el aumento en la tasa de multiplicación, comparado con el medio semisólido, sin embargo, las principales desventajas son el alto grado de hiperhidratación y oxidación de los tejidos, estos aspectos han sido asociados con factores tales como el tiempo, la frecuencia de la inmersión y la concentración de carbohidratos y macronutrientes en el medio (Castro & González Olmedo, 2002).

En general los sistemas de propagación *in vitro* han sido muy útiles en cuanto a la reducción de costos de multiplicación de cultivos o plantas. Cabe destacar que los sistemas *in vitro* han mejorado continuamente para que cada vez más personas que se dedican al área de cultivos puedan tener un mayor acceso a ellos.

2.3 Etapas del proceso de propagación masiva en un SIT

Se ha demostrado que se tiene justificado el uso de técnicas de propagación *in vitro*, que ofrecen la ventaja de obtener un gran número de plantas en un tiempo y espacio relativamente cortos, al compararlas con las vías de propagación tradicionales; además, que posibilita obtener plantas libres de patógenos a los materiales regenerados. A continuación se presenta un breve esquema dónde se puede visualizar de manera concreta las etapas de la micropropagación.

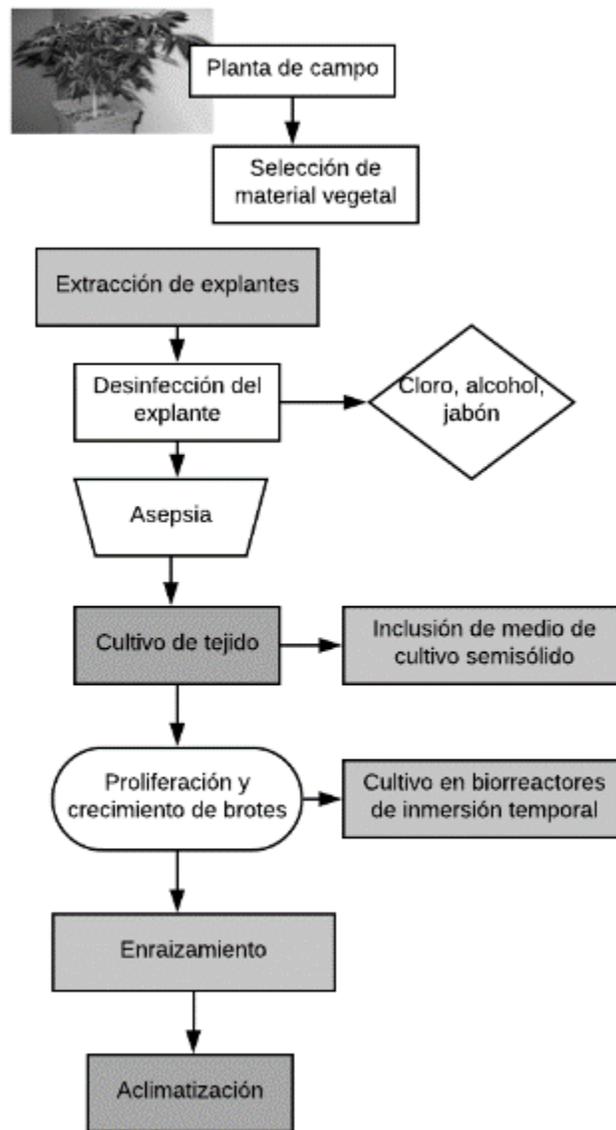


Ilustración 4 Fases de micropropagación en Sistemas de Inmersión Temporal
 Fuente: (Albarrán, y otros, 2014)

En la imagen anterior se observan cada una de las etapas de la micropropagación, desde la selección de la planta madre para extraer el material fuente (explante), se extrae el explante, desinfección del mismo con cloro, agua y jabón, seguidamente pasa por el proceso de asepsia la cual consta de una desinfección aproximada de 30 minutos, inmediatamente se da el cultivo de tejidos en medio semisólido y la proliferación y crecimiento de los brotes ya se da en los biorreactores para pasar después a las últimas etapas que son el enraizamiento y la climatización. Cada una de las etapas se explica mejor en los siguientes párrafos.

2.3.1 Establecimiento del cultivo

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donadora de yemas, durante un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades. El explante se siembra en un medio de cultivo semisólido para que ocurra la desdiferenciación y diferenciación de brotes. (Castillo, 2004)

El explante más usado para estos procesos son las yemas vegetativas de las plantas que son el extremo joven de un vástago y, por lo tanto, lleva hojas inmaduras. Los frascos que contienen las plantas se ubican en estanterías con luz artificial dentro de una cámara de crecimiento y se fija una temperatura entre los 21°C Y 23°C. (Castillo, 2004)



*Ilustración 5 Corte de un explante.
Fuente: Elaboración propia en ColPos*

En la imagen se visualiza el corte de un explante. Se realiza en una cámara de flujo laminar para evitar contaminación, ya que todos los materiales están perfectamente esterilizados y una mínima partícula de aire contaminado puede infectar todo el material vegetal.

Por otra parte, para la selección del explante se debe antes seleccionar la planta madre que es aquella a partir de la cual se va a obtener la materia vegetal para producir clones que será idénticas a la original. (Castillo, 2004)

Se recomienda a la planta madre en un invernadero bajo condiciones controladas:

- Condiciones sanitarias óptimas
- Control de la nutrición
- Riego adecuados para un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades

Además la planta donadora:

- No debe estar en estado de floración
- Debe estar en buenas condiciones sin plagas ni enfermedades
- Debe ser joven para ayudar a mantener mejores resultados

2.3.2 Desinfestación

Una vez elegida la planta madre, se extraerán los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantes, pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, etc. Antes de extraer los explantes se hará una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los contaminantes externos como los hongos y las bacterias que habitan en forma natural en el ambiente. Esto puede llevarse a cabo partiendo del uso de detergente comercial y abundante agua, sumergirse en concentraciones distintas de hipoclorito de sodio por un periodo de 5 a 15 minutos y finalmente enjuagar con agua destilada estéril de 3 a 4 veces. (Castillo, 2004).

La tasa a la cual los cultivos *in vitro* crecen y producen yemas durante la micropropagación pueden estar influidas por la naturaleza física del medio (George , 1993). Según esta característica, existen tres tipos de medios en los que se puede realizar un cultivo *in vitro*: semisólido, líquido y en sistemas de inmersión temporal.

Los siguientes son elementos importantes a tomar en cuenta en la desinfección en el laboratorio:

- Agua corriente
- Soluciones desinfectantes (etanol-hipoclorito de sodio)
- Enjuagues con agua estéril en cabina de flujo laminar
- Antibióticos y/o fungicidas



*Ilustración 6 Desinfección del explante utilizando un fungicida.
Fuente: Elaboración propia en ColPos*

Como se observa en la imagen anterior, el explante está siendo desinfectado con un fungicida que es lo que le da la coloración blanca a la solución, esta solución se encuentra dentro de un matraz para su mejor manejo y cubierto con papel aluminio para evitar que se llegue a contaminar.

Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia. Se trabajará en cabinas de flujo laminar que son un recinto que emplea un ventilador para forzar el paso de aire a través de un filtro y proporcionar aire limpio a la zona de trabajo. Estas se fabrican generalmente en forma prismática con una única cara libre que da acceso al interior, donde se localiza la superficie que permanece limpia y estéril la cual nos sirve para extraer los explantes a partir del material vegetal. (Castillo, 2004)

2.3.3 Multiplicación

Luego de la desinfección superficial, las semillas o las yemas dependiendo del material seleccionado, se ponen en medio de cultivo estéril. Es el desarrollo y multiplicación de los vástagos o brotes en los biorreactores de inmersión temporal se da a partir de las células que se han involucrado inicialmente en el medio de cultivo semisólido. (Albarrán, y otros, 2014)

Las mayores diferencias entre el cultivo *in vitro* convencional y el SIT en biorreactores se producen en la etapa de multiplicación: el medio nutritivo que utiliza el SIT es líquido en vez de sólido (agar), el contacto del medio con el tejido se realiza de manera intermitente (temporal) y no permanente, y se utiliza un mayor número de explantes en cada contenedor. (Albarrán, y otros, 2014)

En esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron a las primeras fases originen brotes con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego de ser puesta en contacto con el medio de cultivo. El número de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo. La micropropagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados. (Castillo, 2004)

2.3.4 Enraizamiento

Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea. (Fundación para la Innovación Agraria. Ministerio de Agricultura, 2009)

Las mayores diferencias entre el cultivo *in vitro* convencional y el SIT en biorreactores se producen en la etapa de multiplicación: el medio nutritivo que utiliza el SIT es líquido en vez de sólido (agar), el contacto del medio con el tejido se realiza de manera intermitente (temporal) y

no permanente, y se utiliza un mayor número de explantes en cada contenedor. (Albarrán, y otros, 2014)

Se puede inducir en el biorreactor de inmersión temporal con el mismo medio de cultivo o cambiándolo a uno de composición química distinta; y en algunos casos, es necesario inducir el enraizamiento en un medio de cultivo semisólido. (Albarrán, y otros, 2014)

Para enraizar los explantes se utilizan principalmente plantines individuales de un tamaño aproximado de 2 centímetros. Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea. (Castillo, 2004)

2.3.5 Aclimatación

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación. En el momento en que se extraen los explantes enraizados de los frascos, están poco adaptados a crecer en un invernáculo, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas (estructuras responsables de regular la transpiración y pérdida de agua en la planta) que no son completamente funcionales frente a descensos de la humedad relativa, y por lo tanto demasiado lentos para evitar la desecación del explante. (Castillo, 2004)

Generalmente, las plantas propagadas en sistemas de inmersión temporal, no necesitan una etapa de aclimatación o es muy corta (Etienne & Berthouly, Temporary immersion systems in plant micropropagation, 2002) si se compara con los métodos de propagación en medios de cultivo semisólido, donde, a consecuencia de la falta de intercambio gaseoso entre el interior del recipiente y el exterior, la transición de la condición *in vitro* a *ex vitro*, es mayor para disminuir la tasa de mortalidad de las vitroplantas. (Albarrán, y otros, 2014)

Luego de enjuagar cuidadosamente las raíces de las plántulas para evitar dañarlas, estas deben ser aclimatadas a las condiciones de humedad del invernadero disminuyendo progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de luz. Se plantarán en contenedores cubiertos por un plástico, para mantener la humedad relativa elevada. La elección de un sustrato con buenas características físicas, es clave para el éxito de esta etapa. Para la elección del sustrato las mezclas son diferentes y muy variadas de acuerdo a la especie con la que se está trabajando. (Castillo, 2004)

En general existe un método que se conforma al colocar el vaso de plástico sobre los brotes con su respectivo sustrato. Gradualmente se van perforando pequeños orificios al vaso para que poco a poco la planta vaya aclimatándose, así evitando que sufra algún daño por exponerla

repentinamente al ambiente. Todos los días se debe controlar el nivel de humedad y si es necesario se aplica un riego para mantener un ambiente húmedo a nivel de sustrato.



Ilustración 7 Aclimatación de un brote
Fuente: Elaboración propia en ColPos

En la imagen anterior se observa cómo se inicia el proceso de aclimatación. En el vaso blanco se encuentran los brotes con el sustrato y el vaso transparente que se encuentra en la parte superior es el que se utiliza como filtro el cual como se mencionó anteriormente, se realizan orificios para que el brote se aclimate al ambiente.

Otro método comúnmente usado, es colocar una cobertura de nylon en lugar del vaso de plástico. A los 15 días del trasplante, se puede comenzar a levantar la cobertura en las horas de menor calor (temprano en la mañana o en la última hora de la tarde). Al comienzo las plantas se dejan media hora por día destapadas. A la semana siguiente se dejan destapadas durante una hora. Al mes del trasplante, se dejan tapadas durante la noche y si hay crecimiento de nuevas hojas, las plantas pueden permanecer destapadas. Las condiciones del cultivo *in vitro*, generan cambios en algunos aspectos anatómicos y fisiológicos de las plantas, por esta causa, durante la aclimatación, los cambios deben ser muy graduales, para minimizar el estrés y tener mayor tasa de sobrevivencia. (Castillo, 2004)

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación. En esta etapa las plantas sufrirán cambios de diferente tipo que permitirán la adaptación de las mismas a vivir en condiciones naturales. (Castillo, 2004). En el momento en que se extraen los explantes enraizados de los frascos, están poco adaptados a crecer en un invernadero, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas (estructuras responsables de regular la transpiración y pérdida de agua en la planta) que no son completamente funcionales frente a descensos de la humedad relativa, y por lo tanto

demasiado lentos para evitar la desecación del explante. Por otra parte, crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula con cera bien desarrollada, que representa la barrera física para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta.

A partir de este proceso de propagación, se pueden multiplicar una gran cantidad de especies de interés alimenticio, medicinales, forestales, con buenos rendimientos utilizándose una combinación de medios de cultivos sólidos y líquidos. El sistema tradicional de propagación *in vitro* con medios de cultivo semisólidos, presenta algunas desventajas relacionadas con una mayor heterogeneidad del material propagado (brotes de diferentes tamaños en el mismo recipiente); muy poco intercambio gaseoso, lo cual afecta el crecimiento de las plantas; requiere una inversión inicial y mano de obra, que en muchos casos, representa entre el 40 y 60 % de los costos de producción. (Albarrán, y otros, 2014)

2.4 Medios de cultivo

2.4.1 Medios de cultivo semisólido

Son aquellos a los cuales se les ha agregado un agente gelificante y son ampliamente usados en el establecimiento de explantes (George, 1993). El agar es el agente solidificante más utilizado. (Fundación para la Innovación Agraria. Ministerio de Agricultura, 2009)

El explante se mantiene estático sobre el medio, con sólo uno de sus extremos en contacto por donde se realiza la absorción de nutrientes. (Lorenzo, y otros, 1998)

Aunque se usa ampliamente, este medio presenta una serie de desventajas como: la baja tasa de multiplicación en algunas especies y cultivares, la necesidad de cambiar el medio periódicamente por el agotamiento de nutrientes, y la necesidad de lavar el agar de las raíces antes de trasladar las plántulas al sustrato.

2.4.2 Medios de cultivo líquido

La utilización de este sistema da como resultado mayores tasas de crecimiento que en medios semisólidos, debido a la mayor superficie de contacto del explante con el medio y a las menores gradientes de difusión entre el medio y el explante, lo que facilita la absorción de nutrientes (George, 1993). Sin embargo, la inmersión continua de los tejidos provoca síntomas de estrés por oxidación y vitrificación. (Damiano, Gentile, La Starza, Fratalleri, & Monticelli, 2003).

2.5 Características del Sistema de Inmersión Temporal

Los problemas que presentan los medios líquidos pueden ser superados por métodos alternativos, como ya se ha mencionado anteriormente, los biorreactores (Damiano, Gentile, La

Starza, Fratalleri, & Monticelli, 2003) tienen el principio básico es la inmersión periódica de los explantes en el medio de cultivo, lo que permite el intercambio gaseoso dentro del recipiente.

Este sistema de micropropagación permite incrementar considerablemente el coeficiente de multiplicación de brotes y una disminución de los costos de producción, en comparación con las formas convencionales de micropropagación, además de un mejoramiento del porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia de las plantas en la etapa de aclimatación, todos aspectos limitantes en la micropropagación de vegetales. (Fundación para la Innovación Agraria. Ministerio de Agricultura, 2009).

Las características de mantener un cultivo en un SIT incluyen:

- Un mayor contacto entre la biomasa vegetal y el medio
- La inexistencia de restricciones en el intercambio gaseoso
- La posibilidad de controlar la composición del medio, así como la de la atmósfera dentro del biorreactor (Ziv, 1995)
- Realiza mínima fotosíntesis
- Crecimiento en condiciones controladas
- Crecimiento en condiciones de asepsia
- Alta humedad relativa
- Estomas no funcionales
- Ausencia de pelos radiculares
- Ausencia de cera en la cutícula
- Al trabajar en medios líquidos temporales se puede mantener una gran cantidad de plántulas en un mismo volumen
- El contacto intermitente del medio con los explantes reduce el nivel de toxinas presentes, ya que se mantienen limpias de sus propios exudados que pueden ser perjudiciales para su crecimiento
- El mecanismo permite renovar y/o modificar la atmósfera interna de los contenedores y eventualmente, controlar ciertos aspectos de su desarrollo (preaclimatación)
- Aumento importante en las tasas de multiplicación
- Mejoramiento en el porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia de las plantas en la etapa de aclimatación
- Aumento en los niveles de mecanización de algunas etapas de la micropropagación
- Reducción en el uso de la mano de obra
- Reducción en los costos de reactivos e insumos por planta final
- Menor costo por planta
- Aumento de la rentabilidad del proceso

Estas características se reflejan en mayores tasas de multiplicación y en un mejor desarrollo de los explantes.

Para el funcionamiento efectivo de un SIT deben existir condiciones óptimas de cultivo (Ackermann, Bruschi, Sonntag, & Sellner, 2003) además de factores ambientales como intensidad lumínica y temperatura, se debe considerar: frecuencia y tiempo de inmersión, densidad del cultivo, volumen del medio y composición y duración del cultivo. Estos factores se deben determinar para cada especie y etapa de desarrollo. (Albarrán, y otros, 2014)

Cuando se propagan plantas utilizando medios de cultivo líquidos en sistemas de inmersión temporal los costos disminuyen, entre otros por evitar el uso de agentes gelificantes los cuales son costosos, los cambios de medio de cultivo son más sencillos requiriendo menor cantidad de mano de obra, las plantas son más uniformes, el mayor intercambio gaseoso estimula la tasa de crecimiento y de multiplicación, así como una aclimatación directa. (Albarrán, y otros, 2014)

En algunas especies puede ocurrir hiperhidricidad en los tejidos bajo condiciones de inmersión en medio de cultivo líquido, afectando su crecimiento. En estos casos, al sumergirse totalmente el tejido en el medio de cultivo líquido, la disponibilidad de oxígeno es mínima, las células se asfixian afectando sus funciones fisiológicas y bioquímicas. (Albarrán, y otros, 2014)

Pueden ocurrir grandes pérdidas de material vegetal por contaminación bacteriana o fúngica como producto de la manipulación de los biorreactores de inmersión temporal, por tal motivo, se debe trabajar con la mayor asepsia posible. (Albarrán, y otros, 2014). Es importante indicar que la magnitud de cada una de estas ventajas puede variar según el proceso de incorporación de esta tecnología (procedimientos) y de las especies/variedades con las que se trabaje.

Este método muestra un impacto importante en los métodos tradicionales de micropropagación, ya que se ha logrado una mayor tasa de multiplicación y aclimatación, así como mayores niveles de supervivencia en condiciones de campo.

Para una idea más general, en los siguientes diagramas se muestra la diferencia significativa de los pasos a seguir entre la micropropagación *in vitro* tradicional y el cultivo en sistemas de inmersión temporal, el cual, como se puede observar los pasos de la multiplicación y la elongación se realiza en un solo paso con el SIT. (Fundación para la Innovación Agraria. Ministerio de Agricultura, 2009)

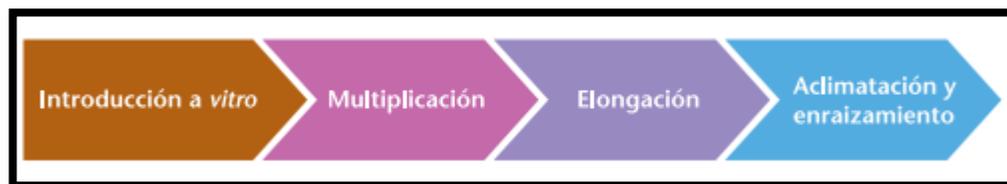


Diagrama 2 Pasos del establecimiento *in vitro*
Fuente: (Fundación para la Innovación Agraria. Ministerio de Agricultura, 2009)

La imagen anterior muestra los pasos esenciales de la micropropagación *in vitro* desde la introducción *in vitro* hasta la aclimatación y enraizamiento. Los pasos son sencillos y fáciles de llevar siguiendo el protocolo adecuado.

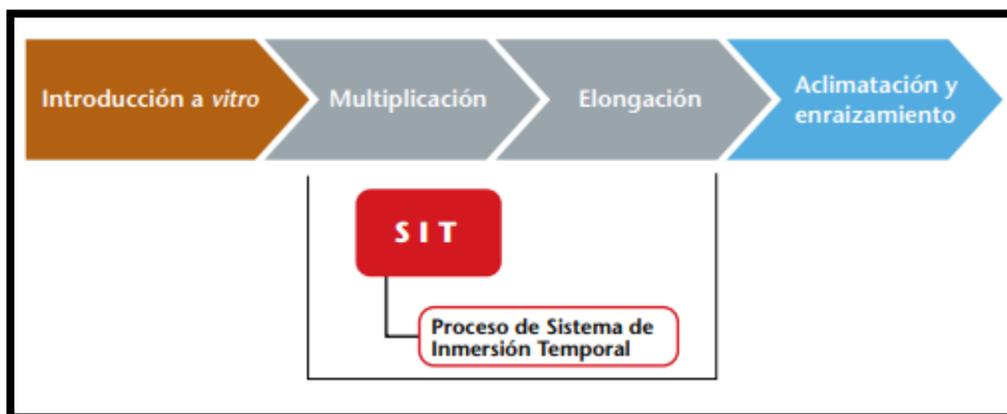


Diagrama 3 Pasos del establecimiento *in vitro* en un SIT

Fuente: (Fundación para la Innovación Agraria. Ministerio de Agricultura, 2009)

A comparación de la imagen anterior, se observa cómo los pasos en la micropropagación en un SIT son diferentes, ya que la multiplicación y elongación del explante se realiza en un solo paso dentro del proceso de inmersión temporal, es decir; dos pasos en uno para terminar con la aclimatación y enraizamiento.

2.6 Métodos de esterilización

La esterilización es el proceso mediante el cual se eliminan todos los microorganismos de un objeto (incluyendo formas de resistencia), medio o superficie y su aplicación garantiza la ausencia de microorganismos en el material, explantes y medios de cultivo a ser empleados. Es decir, es la muerte y/o eliminación de todo microorganismo.

Es muy importante aclarar el punto de la desinfección y la esterilización ya que mientras la desinfección nos sirve para destruir parte de la vida microbiana, además que se inhiben los efectos nocivos, en este caso para las plantas; la esterilización destruye toda la vida microbiana, es por ello que puede decirse que la esterilización se refiere a una limpieza extrema.

Es de vital importancia que el medio de cultivo, los frascos, los aparatos y explantes se mantengan desinfectados desde el principio del proceso. Cualquier bacteria u hongo que se introduzca en los frascos crecerá más rápido que las plántulas y pronto ocupará su espacio hasta matarlas. La presencia de microorganismos contaminantes, hongos y bacterias es uno de los principales problemas durante el establecimiento en los Sistemas de Inmersión Temporal para los explantes. (Albarrán, y otros, 2014)

La contaminación microbiana no se puede controlar en su totalidad, sin embargo, existen métodos los cuales hacen un tanto más efectiva la desinfección para el correcto desarrollo de

los explantes. (Ramírez-Gama, Luna Millán, Velásquez Madrazo, & Vierna García, 2006). Entonces, se deduce que el evitar las contaminaciones con microorganismos es un aspecto muy importante para asegurar el éxito, es por ello que se debe de trabajar en ambientes adecuados, esterilizar los recipientes para el medio de cultivo, desinfectar superficialmente los explantes para liberarlos de micro organismos y manejar adecuadamente las normas de asepsia. Además, es importante destacar que el aire que se suministra también debe ser estéril y no deben existir roturas mecánicas que podrían permitir la entrada de microorganismos. Aunque hay que tomar en cuenta que no existe un método cuantitativo seguro y confiable para medir el número o la concentración de contaminantes en el sistema. (Fundación para la Innovación Agraria. Ministerio de Agricultura, 2009)

Los métodos más usuales para la correcta esterilización de los materiales a utilizar en el área de cultivo se presentan en el siguiente diagrama. Se observa que son distintos métodos para esterilizar, sin embargo, para este estudio no requiere adentrarse en cada uno, pero como información, adicional se enumeran los distintos métodos que van desde calor seco que se utiliza para materiales de desecho o contaminados, nanopartículas de plata para materiales de laboratorio que se están realizando pruebas con ello, radiaciones para condiciones de laboratorio igualmente, filtración para la esterilización del aire y el calor húmedo, por ejemplo, medios de cultivo. (Pisa Farmacéutica, s.f.)

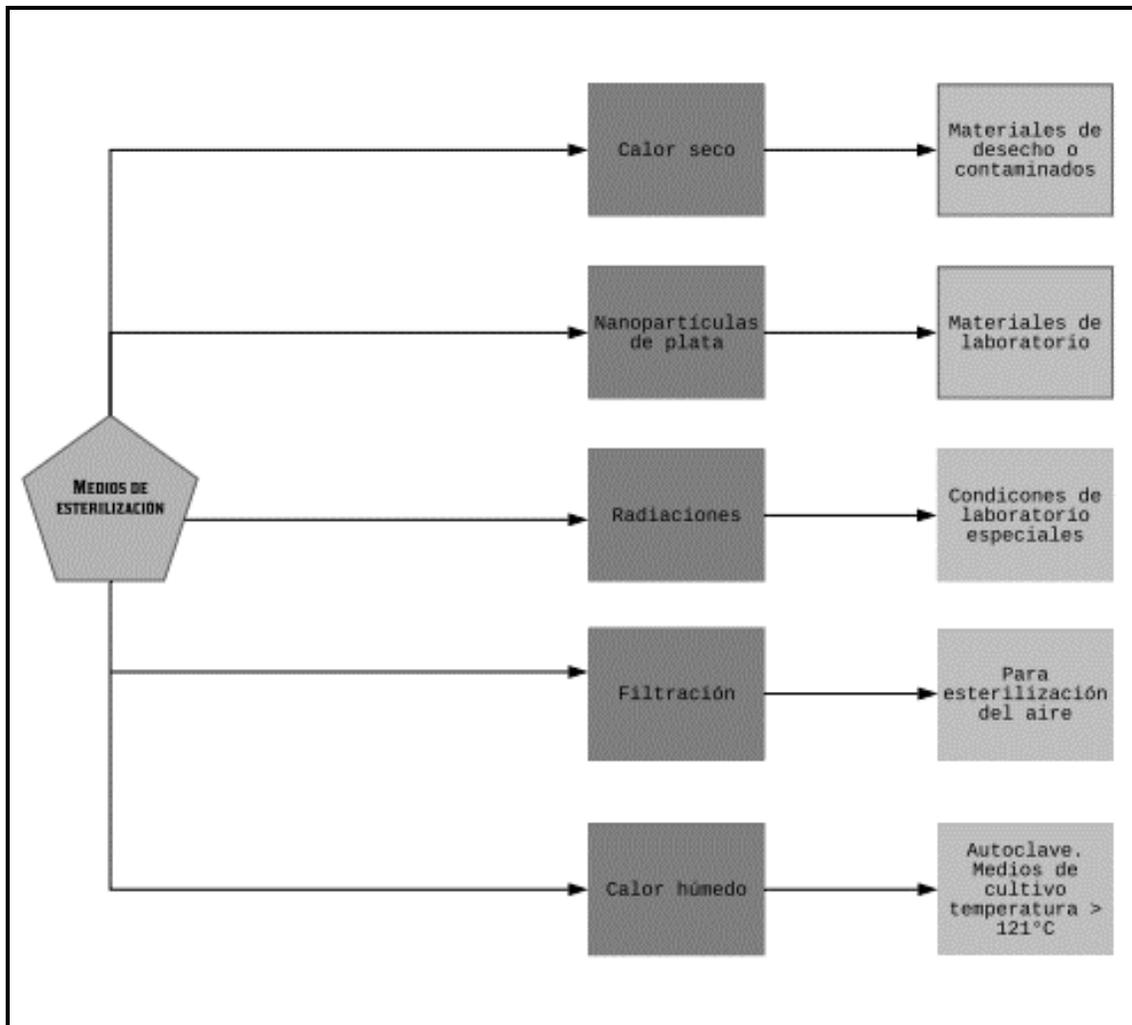


Diagrama 4 Métodos de esterilización
Fuente: Elaboración propia

Para efectos de la investigación del proyecto, se toma en cuenta la esterilización por medio de calor, sin embargo, hay otro método el cual está dando buenos resultados para este efecto, que es la esterilización con nano partículas de plata que se revisa brevemente.

2.6.1 Calor

Las células vegetativas son eliminadas rápidamente a temperaturas relativamente bajas, pero para la destrucción de las esporas se necesitan temperaturas mayores a 121°C. El calor desnaturaliza las estructuras y macromoléculas (membranas, proteínas, etc.). En general, las formas vegetativas bacterianas mueren por calentamiento de 50-70°C. Las endoesporas, (la forma de vida más termo resistentes) requieren más temperatura y tiempo de exposición. (Universidad de Granada, 2017)

2.6.1.1 Calor húmedo

Los materiales húmedos conducen mejor el calor, el agua tiene mayor coeficiente de transferencia de calor, ya que el vapor de agua es más eficaz que el calor seco matando a los microorganismos, la esterilización en presencia de vapor de agua requiere menos temperatura y tiempo. Esterilizar exclusivamente en calor húmedo: medios de cultivos, recipientes contaminados, material de goma, y todo elemento que no resista las altas temperaturas del calor seco.

- Autoclave de vapor: Sistema cerrado donde se forma el vapor de agua que se somete a una presión elevada, una atmósfera, lo que hace que el agua alcance una temperatura de 121°C causando la desnaturalización de enzimas lo que conlleva a la muerte de microorganismos y la destrucción de esporas. Habitualmente se esteriliza a 121°C durante 20 minutos, sin embargo, para terminar el proceso por completo, se requieren aproximadamente 2 horas, ya que se debe esperar a que la temperatura del autoclave baje para poder abrirla sin causar ningún tipo de accidente.

2.6.1.2 Calor seco

Deshidrata las bacterias, virus, etc. y facilita la coagulación o desnaturalización de las proteínas. Se requieren mayores temperaturas para producir daño irreversible (muerte). Se acepta que el calor seco actúe oxidando los constituyentes intracelulares. Resulta lento por la menor eficacia del calor seco y por la lentitud del transporte del calor (convección y radiación). Esterilizar exclusivamente a calor seco: Cera, vaselina, talco, recipientes cerrados herméticos de vidrio o metálicos sin filo.

- Flameado e incineración: Se aplica directamente la llama de un mechero. Se utiliza para la esterilización de asas e hilos de siembra, pinzas, así como las bocas de tubos y matraces antes y después de utilizarlos. La incineración se emplea para destruir materiales de desecho contaminados

2.6.2 Nanopartículas de plata

El término nanopartícula hace referencia a todo material o elemento con al menos una de sus dimensiones está en un rango de tamaño de 1 a 100 nanómetros (un nanómetro corresponde a la millonésima parte de un milímetro). Por su tamaño, estos materiales pueden interactuar de forma específica con las células y tejidos humanos.

La plata (Ag) ha sido ampliamente utilizada desde hace miles de años en la historia de la humanidad, en aplicaciones como la joyería, utensilios, fotografía, etc. Incluso civilizaciones antiguas como los griegos utilizaban la plata para cocinar y mantener la seguridad del agua. Sus propiedades antimicrobianas ya se explotaban antiguamente con la medicina tradicional. (Castro, Flores, García, & Alvarez, 2016)

En los últimos años, la plata ha generado mucho interés debido a su buena conductividad, estabilidad química y su actividad catalítica y antibacteriana. Las AgNPs se están convirtiendo en una de las categorías de productos de mayor crecimiento en la industria de la nanotecnología. Su fuerte actividad antimicrobiana es la principal característica para el desarrollo de productos con AgNPs, actualmente, una amplia categoría de productos se encuentran disponibles en el mercado. (Avalos , Haza, Mateo, & Morales, 2013).

La acción de la Plata Coloidal consiste en inhibir las enzimas implicadas en el proceso respiratorio de óxido-reducción celular de las bacterias, provocando su muerte en pocos minutos. El microorganismo no puede desarrollar mecanismos de resistencia como ocurre con los antibióticos u otros compuestos orgánicos. Inhibe la reproducción del microbio porque bloquea que se replique el DNA, desestabiliza la membrana de la célula, detiene la respiración e inhibe la ingestión y la división celular. En el Colegio de Posgraduados se están observando resultados favorables en cuanto a la esterilización por medio de nanopartículas de plata, pero ello no implica dejar de utilizar el autoclave de vapor que es el método más convencional con el que se trabaja en la esterilización de los materiales para el cultivo. (Castro, Flores, García, & Alvarez, 2016)

Para la esterilización tanto de los materiales como del medio de cultivo, se utiliza el calor húmedo. Se están haciendo prueba con nanopartículas de plata, las cuales son más económicas, sin embargo, aún no se tuene una dosis exacta de cómo utilizarlas y saber si realmente son viables para el caso de este estudio.



*Ilustración 8 Esterilización por medio de nanopartículas de plata
Fuente: Elaboración propia en ColPos*

En la imagen se observa cómo está en proceso de esterilización una semilla de aguacate, el cual es el mismo proceso que se sigue para la esterilización con un fungicida, se deja actuar aproximadamente durante 30 minutos en el agitador.

Capítulo 3 ANTECEDENTES. TRABAJOS RELACIONADOS

Se entiende hasta el momento que desde el inicio de los sistemas de propagación en biorreactores de inmersión temporal, se ha buscado la forma de crear nuevas técnicas que permitan realizar la micropropagación más sencilla y con los mejores resultados posibles.

Hasta ahora, se han desarrollado diversas técnicas de biorreactores que desembocan en diversos resultados. Sin embargo, muy pocas técnicas excepto los biorreactores tipo RITA con el que se ha obtenido un rendimiento más óptimo.

A continuación se enlista una breve descripción de algunos biorreactores que han sido de utilidad para el diseño del nuevo prototipo. Sin duda, hay varias alternativas de los cuales se pudieron haber obtenido información relevante para el desarrollo del nuevo diseño, sin embargo, sólo se tomaron aquellos que en cierto grado, pudieron ser útiles para dicho propósito en su momento.

Existe una gran variedad de biorreactores disponibles en el mercado, ante ello, se realizó una pequeña síntesis de aquellos cuyas características que sirvieron como puntos de apoyo para esta investigación, verificando su funcionalidad, ventajas y desventajas.

3.1 Columna charola

Está formado por un contenedor cilíndrico en cuyo interior se encuentran charolas perforadas en las que se encuentra el medio inoculado.

Dispone de:

- Sistema de burbujeo que suministra oxígeno al medio
- Sistema de regulación de temperatura a través de la chaqueta de enfriamiento o calentamiento
- Dispone de una bomba a través de la cual se airea por flujo forzado, promoviendo a la vez, agitación

La columna o contenedor cilíndrico es de 13 pulgadas de altura y un diámetro de 10 pulgadas. En su interior se encuentran ocho charolas perforadas, las cuales tienen una capacidad de 140 ml cada una. La transferencia del oxígeno es por burbujeo a través de un distribuidor de aire, permitiendo la transferencia a un flujo de 194 ml/min. La temperatura es regulada por una chaqueta de enfriamiento y/o calentamiento, por lo que es posible controlar y medir los cambios

de temperatura. Bajo este sistema se permite una mejor distribución de oxígeno por aireación hacia las charolas. (Ruíz-Leza, Rodríguez-Jasso, Rodríguez-Herrera, Contreras-Ezquivel, & Aguilar, 2007)

Nombre	Ventajas	Desventajas	Creadores
Columna charola	<ul style="list-style-type: none"> • Económico • Alta transferencia de oxígeno, mayor transferencia de nutrientes. 	<ul style="list-style-type: none"> • Optimizar la cantidad y tamaño de las charolas. • No automatizado. 	Diseño realizado por el departamento de Investigación de Alimentos de la Universidad de Coahuila.

Tabla 1 Características de un biorreactor tipo columna charola
Fuente: Elaboración propia

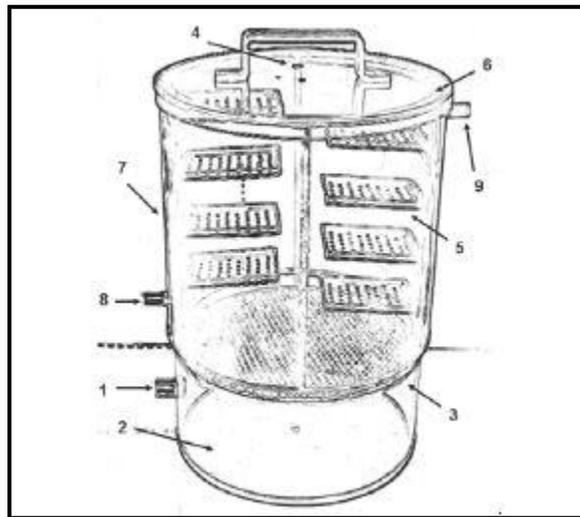


Ilustración 9 Biorreactor tipo columna charola
Fuente: (Ruíz-Leza, Rodríguez-Jasso, Rodríguez-Herrera, Contreras-Ezquivel, & Aguilar, 2007)

La imagen anterior muestra la estructura de un biorreactor tipo columna charola. Se ve que está conformado por las ocho charolas perforadas donde se colocaran los explantes o el material vegetal y todo el biorreactor está conformado por los siguientes elementos: 1. Entrada de aire estéril, 2. Entrada de agua estéril, 3. Distribuidor de aire, 4. Entrada para el termómetro, 5. Charola, 6. Chaqueta para el control de temperatura, 7. Columna de acrílico, 8. Entrada de agua, 9. Salida de agua.

3.2 Biorreactor Growtek

Nombre	Ventajas	Desventajas	Creadores
Growtek	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor contacto entre el medio de cultivo y el soporte sólido • Menor acumulación en la cama de sustrato 	<ul style="list-style-type: none"> • No cuenta con sistema de aireación • Sólo se puede manejar una carga de 400 ml de medio líquido 	Diseño realizado por el departamento de Biotecnología, Agricultura e Ingeniería en alimentos del Instituto Tecnológico de la India. Growtek.

Tabla 2 Características de un biorreactor Growtek
Fuente: *Elaboración propia*

Consiste de un envase de 16 cm de altura y 11.3 cm de diámetro, que tiene un tubo, de 2.6 cm de diámetro y 8.5 cm de altura, pegado a la base con una inclinación de 15° con respecto a la vertical. El cuerpo del recipiente y del tubo externo están hechos de policarbonato, y las tapas de ambos son de polipropileno. Este biorreactor tiene dentro del envase un depósito de polipropileno que contiene una tela de fibra de vidrio en el fondo, donde se sostiene el sustrato. Dicho dispositivo permite la dosificación de agua para mantener la humedad adecuada para el crecimiento microbiano. Sin embargo, no cuenta con un sistema de medición de la variación de temperatura. (Ruíz-Leza, Rodríguez-Jasso, Rodríguez-Herrera, Contreras-Ezquivel, & Aguilar, 2007)

En la imagen siguiente se presenta la estructura de este biorreactor que consiste de: 1. Cuerpo del biorreactor de policarbonato transparente, 2a. Depósito, 2b base del depósito perforada donde se deposita el sustrato sólido, 3 tubo lateral que facilita la entrada del medio, 4 tapa enroscada de aireación estéril, 5 tapa enroscada del tubo exterior, 6 mangos del depósito.

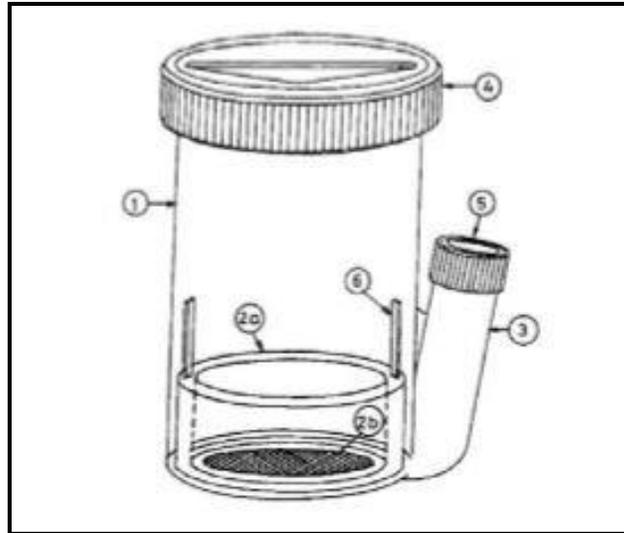


Ilustración 10 Biorreactor tipo Growtek

Fuente: (Ruíz-Leza, Rodríguez-Jasso, Rodríguez-Herrera, Contreras-Ezquivel, & Aguilar, 2007)

3.3 Biorreactor de inmersión temporal BIT

El sistema BIT es diseñado con dos recipientes transparentes de vidrio o plástico de un litro de capacidad, uno de los cuales contiene el material vegetal de interés y el otro sirve como contenedor del medio de cultivo líquido. Los dos recipientes se conectan mediante mangueras de silicona, el flujo aire pasa a través de microfiltros de 0.2 μm . La presión que ejerce el aire permite que el medio líquido pase de un recipiente a otro, sumergiendo totalmente las plántulas. Posteriormente el flujo de aire se invierte para devolver el medio líquido a su recipiente de origen, este proceso es controlado mediante válvulas de solenoide y temporizadores, que facilitan establecer el tiempo de contacto o inmersión de las plántulas con el medio líquido. (Oviedo Pereira, Sepúlveda Jiménez , Evangelista Lozano, & Rodríguez Monroy, 2015)

Nombre	Ventajas	Desventajas	Creadores
Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT)	Soluciona algunos problemas habituales como: <ul style="list-style-type: none"> • La hiperhidricidad, baja calidad de los propágulos • Se evita transplantar o multiplicar las plántulas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Sincronización de dos válvulas solenoides para el movimiento del medio de cultivo • Poca capacidad • Elevado costo 	Diseñado por el Centro de Bioplasmas en Cuba (Escalona, González Olmedo, Lorenzo Feijoo, & Desjardins, 1999)

Tabla 3 Características de un Biorreactor tipo BIT

Fuente: Elaboración propia

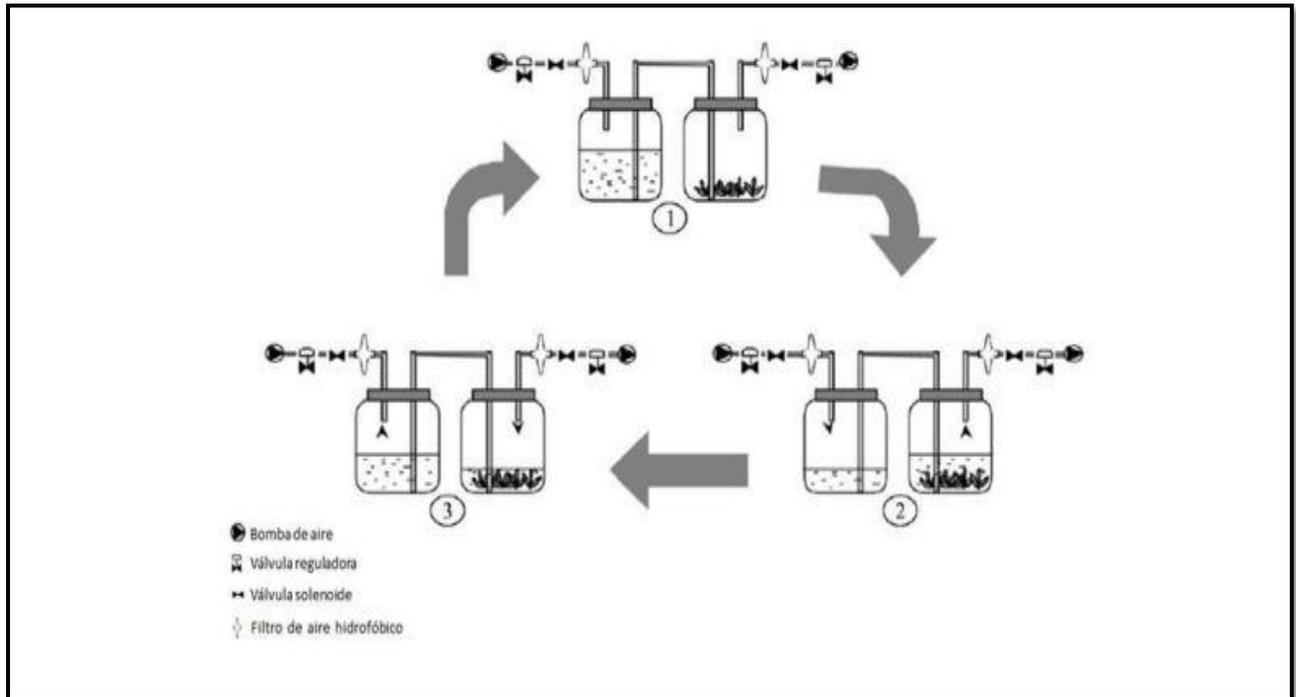


Diagrama 5 Funcionamiento de un biorreactor tipo BIT

Fuente: (Oviedo Pereira, Sepúlveda Jiménez, Evangelista Lozano, & Rodríguez Monroy, 2015)

En el diagrama anterior se muestran los pasos del funcionamiento del biorreactor tipo BIT. En el paso N. 1 se tiene dos recipientes: el primero con medio de cultivo y el segundo con explantes. Al momento de abrir la bomba de aire el medio de cultivo pasa al explante como se observa en el paso N. 2 y el paso N. 3 se visualiza cómo el medio de cultivo regresa a su sitio. También se (Escobar, Muñoz, Montoya, Tohme, & Roca)muestran los elementos que conforma el diagrama que son: la bomba de aire, la válvula reguladora, la válvula solenoide y el filtro hridrofóbico.

3.4 Biorreactor de inmersión por gravedad BIG

Consiste en un frasco de vidrio o plástico de capacidad variable, conectado a una manguera de silicona, posteriormente conectada a una válvula solenoide y finalmente a un compresor de aire. Al accionarse la válvula solenoide el flujo de aire eleva el medio de cultivo hacia el frasco superior y pasando un tiempo el medio regresa a su estado de reposo.

Nombre	Ventajas	Desventajas	Creadores
Biorreactor de Inmersión por Gravedad (BIG)	<ul style="list-style-type: none"> • Bajo costo • Capacidad variable • Uso de una sola válvula solenoide, permitiendo con ello disminuir los gastos de inversión y electricidad del sistema neumático. 	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor grado de contaminación de los explantes 	Utilizado por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Colegio de Postgraduados Campus Córdoba-Creado por el Centro de Bioplantas, Cuba. (Escalona, González Olmedo, Lorenzo Feijoo, & Desjardins, 1999)

*Tabla 4 Características del biorreactor tipo BIG
Fuente: Elaboración propia*

3.5 Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado RITA

El sistema consiste en un recipiente de policarbonato dividido en dos compartimentos. En el superior se coloca el tejido o explante y en la parte inferior el medio de cultivo. Este sistema cuenta con dos filtros hidrofóbos de 0.2 μm reutilizables; uno central, que es para la entrada de aire y uno lateral que es para la salida de aire. El filtro central se conecta al sistema de aireación, es decir, una bomba de vacío a una presión de salida de 0.2 bar para que impulse el medio líquido del compartimiento inferior al compartimiento superior durante un corto periodo de tiempo, a esto se le llama inmersión, que para el caso de lugar donde se realiza el estudio normalmente la inmersión se programa durante un minuto en intervalos de horas entre inmersión e inmersión depende de las necesidades del cultivo. (Albarrán, y otros, 2014)

Este baño de medio de cultivo que reciben los explantes está controlado por medio de un reloj temporizador que permite la abertura de la electro válvula que controla el sistema.

Nombre	Ventajas	Desventajas	Creadores
RITA	<ul style="list-style-type: none"> • Se incrementa la tasa de propagación • Economía de los nutrientes macromoleculares o factores de crecimiento 	<ul style="list-style-type: none"> • Elevado costo debido a las piezas importadas • Alto grado de hiperhidratación • Oxidación de tejidos 	CIRAD Francia

Tabla 5 Características de un biorreactor tipo RITA
Fuente: Elaboración propia

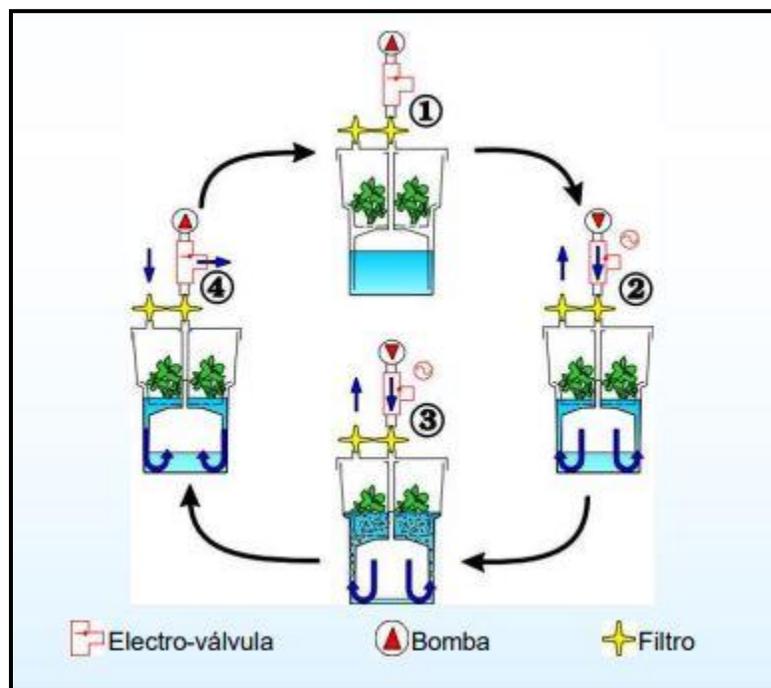


Diagrama 6 Funcionamiento de un biorreactor tipo RITA
Fuente: (Escobar, Muñoz, Montoya, Tohme, & Roca)

Este diagrama representa los pasos sintetizados del funcionamiento de un biorreactor tipo RITA, los cuales se ejemplifican en cuatro: 1. El medio de cultivo está en segundo compartimento mientras que los explantes están en el compartimento superior. 2. Se enciende la bomba con lo cual comienza a subir el medio de cultivo a los explantes. 3. El medio de cultivo baña completamente a los explantes. 4. Después del tiempo indicado, el medio de cultivo baja nuevamente al segundo compartimento.

Para el caso de este estudio, en el Colegio de Posgraduados Campus Montecillo se hicieron algunos cambios muy significativos, los cuales han marcado la diferencia en su control. El cambio

más significativo es la implementación de software por el cual se tiene un control completo de las inmersiones. Este sistema ha sido de gran éxito y se continúa mejorando para poder controlar todo el SIT con un menor esfuerzo.



*Ilustración 11 Sistema tipo RITA semi automatizado
Fuente: Elaboración propia en ColPos*

En la imagen anterior se observa el funcionamiento de un sistema tipo RITA semi automatizado completo en el Colegio de Posgraduados. Se nota que pueden conectarse varios biorreactores al mismo tiempo por medio de las mangueras de silicona.

3.6 Biorreactor tipo Matis

La forma de actuar de este tipo de biorreactor se puede deducir que es igual a la del biorreactor tipo RITA, la diferencia data en que es más grande y por ello, alberga más cantidad de explantes por lo que se tiene una tasa de micropropagación más alta. No hay en realidad, grandes diferencias con respecto a Rita y debido a que la misma compañía que creo RITA, creó este modelo, es natural que se base en los mismos principios. (MATIS R., 2019)

Nombre	Ventajas	Desventajas	Creadores
Matis	Mayor capacidad a comparación con el RITA, mejor manejo de explantes	Elevado costo	CIRAD Francia

*Tabla 6 Características de un biorreactor tipo Matis
Fuente: Elaboración propia*



Ilustración 12 Biorreactor tipo Matis
Fuente: (MATIS R., 2019)

La imagen muestra la estructura del biorreactor tipo Matis, se puede observar que contiene dos compartimientos igual que el tipo RITA, y prácticamente el mismo funcionamiento, pero con una mayor capacidad.

Capítulo 4 ANÁLISIS DE REQUERIMIENTOS Y MODELADO

4.1 Introducción

Como se mencionó anteriormente, se pretende que el presente sistema de inmersión temporal sea una alternativa al que se está usando actualmente, sea capaz de llevar a cabo las inmersiones que se le sean especificadas en tiempo y forma, con una interfaz de fácil acceso y manejo, pueda cumplir con las expectativas del investigador biológico y además sea un modelo a seguir para mejoras que permita seguir trabajando en el futuro y poder realizar una micro propagación masiva de especies vegetales de manera exitosa.

Los requerimientos del sistema fueron determinados por el laboratorio de fruticultura del Colegio de Posgraduados Campus Montecillo, en el cual se hacen los trabajos pertinentes y las pruebas para la micropropagación de especies vegetales.

De las reuniones con el investigador biológico en las cuales se realizó investigación de campo, así como entrevistas y se tuvo acceso a información concreta acerca del trabajo que se lleva a cabo en el laboratorio; se ha podido llegar a la conclusión acerca de lo que se requiere para poder cumplir con las expectativas de dicho sistema.

Además para tener un conocimiento más amplio en esta área en la cual se tiene la mínima experiencia, se tomaron clases teóricas y prácticas que ayudaron a comprender más acerca de los requerimientos y sobre todo, a que tanto el diseño y desarrollo del prototipo los satisfaga.

4.2 Perspectiva del producto

La manera de realizarse el sistema es dada la petición del cliente, el cual cuenta con una interfaz intuitiva que permite al usuario poder manejarlo fácilmente, todo esto con la finalidad que personal autorizado pueda acceder tanto al sistema como al SIT. Para ello, se realizaron entrevistas al personal que colabora en el laboratorio y están al tanto de las necesidades que surgen al momento de realizar la micropropagación, ya sea con el sistema tipo RITA o el sistema artesanal que ya se ha descrito anteriormente.

El punto a tratar es el hecho que el sistema y el nuevo biorreactor que se han desarrollado puedan llegar a ser la mejor alternativa para la micropropagación.

De forma general se describe el proceso de desarrollo de un nuevo Sistema de Inmersión temporal que dé la oportunidad de que en un futuro de sustituir el Sistema RITA que se está

utilizando actualmente en el Laboratorio de fruticultura en el Colegio de Posgraduados, conjuntamente con esto, se requiere desarrollar el software que permita el manejo del mismo. Con el Sistema tipo RITA se han obtenido buenos resultados en cuanto a ello, sin embargo, se requiere llevar a cabo la misma tarea pero con un menor costo.

A continuación se describe la solución propuesta, tomando en cuenta el análisis de requerimientos para el diseño del nuevo biorreactor y por último su elaboración para su futura aprobación.

4.2.1 Limitaciones del sistema

- El sistema no guarda copias de seguridad de las inmersiones anteriores, ya que no contiene ninguna base de datos dentro del mismo que permitan visualizarlos
- El sistema no puede hacer inmersiones simultáneas ya que este es el primer prototipo a probar y sólo está diseñado para un biorreactor
- El sistema está configurado solamente para un periodo de inmersión de 30 días, en cuanto termine ese periodo se debe reprogramar una nueva inmersión, esto debido a que es el periodo estándar de inmersión, una vez que sea probado y aprobado el prototipo se procede a aumentar el periodo de acuerdo a las necesidades de cada proyecto
- El sistema no manda mensajes de error remotos para poder controlarlo

4.2.2 Ambiente físico

- Ubicación del equipo. El equipo se encuentra en el laboratorio de fruticultura del Colegio de Posgraduados
- Tanto el sistema como el equipo pueden trabajar correctamente dentro del laboratorio sin ningún inconveniente, ya que la temperatura del lugar normalmente se encuentra estable con mínimos cambios para el material biológico que se encuentra, sin embargo, no afecta la funcionalidad del sistema.

4.3 Funcionalidad del producto

El sistema debe ser capaz de responder a las necesidades del material vegetal y personal calificado para realizar inmersiones de forma adecuada, ya sea en tiempos de inmersión, fecha, hora e intervalos.

- Identificar fecha de inicio de inmersión
- Identificar hora de inicio de inmersión

Tanto el ingreso de la fecha de inmersión y de la hora serán de forma interactiva, en el cual el usuario o investigador biológico responsable del sistema podrá de acuerdo a las necesidades de cada proyecto seleccionar tanto fecha y hora de inicio.

- Identificar el tiempo de inmersión

El tiempo de inmersión será de acuerdo al criterio del investigador biológico. Cabe recalcar que el tiempo está considerado en minutos, ya que el tiempo que permanece el explante dentro del medio de cultivo será valorizado en minutos de acuerdo a las necesidades de cada material vegetal.

- Intervalo de inmersión

En este caso, el intervalo de inmersión será dado en horas, el usuario o investigador biológico de igual manera podrá seleccionar de manera interactiva como en los rubros anteriores.

- Visualización de datos

La aplicación consta de una tabla en la cual se pueden visualizar los datos anteriormente insertados, esto con la finalidad de que el investigador biológico pueda visualizar la última tarea que inició y al mismo tiempo, detenerla o borrar los datos de acuerdo a las necesidades de cada proyecto o si la tarea en ejecución ya haya sido completada.

El sistema debe mandar mensajes de control y error cada que algún lineamiento o rubro no sea agregado correctamente para que el personal calificado verifique la información insertada correctamente.

Se tienen botones ajustados y acomodados estratégicamente para que el usuario no tenga inconveniente al momento de querer identificar o utilizar alguno.

A continuación se presentan la lista de requerimientos de acuerdo a su funcionalidad:

<i>Requerimientos</i>	
<i>Requerimientos Funcionales</i>	<i>Requerimientos No funcionales</i>
R1. El sistema debe ser capaz de identificar la fecha seleccionada de inicio de inmersiones R2. El sistema debe ser capaz de identificar la hora seleccionada de inicio de inmersiones R3. El sistema debe contabilizar los minutos requeridos durante la inmersión ingresados por el investigador biológico R4. El sistema debe realizar el conteo de horas entre inmersiones requeridas ingresadas por el investigador biológico	R1. El sistema no debe depender de una pc para realizar las tareas especificadas R2. No es necesario que el equipo se conecte a la red R3. Los niveles de seguridad del sistema son mínimos, el personal autorizado no necesita seguridad extra para el control del biorreactor R4. Interfaz intuitiva para el usuario

4.4 Características del usuario

- El usuario que interactúa con el sistema, debe tener conocimientos mínimos de computación por la sencillez de la interfaz.

- El sistema será utilizado sólo por personal capacitado, por el hecho que los datos a insertar deben ser revisados por el personal biológico que es quien está encargado de llevar a cabo todos los proyectos de investigación y micropropagación.
- El sistema tiene ciertas restricciones que le impedirán al usuario insertar datos incorrectos al mismo ya que le mandará mensajes de error en el cual no dejará finalizar el procedimiento, de hecho ni siquiera podrá iniciarlo.

4.5 Modelado de la Interfaz

La interfaz de aplicación se desarrollará en el IDE de Netbeans, el cual es un entorno de desarrollo integrado libre para lenguaje de programación Java.

La aplicación en general y manejo del sistema van a ser manipulados por personal autorizado, el cual desde la interfaz introducirá los datos necesarios para el inicio del sistema. Para un mejor manejo de la entrada de datos evitando algún ingreso erróneo por parte del usuario o alguna inconsistencia que pueda enviar algún tipo de mensaje de error, la interfaz se mantendrá estática, es decir; cada campo tendrá un formato específico o ciertas restricciones por el cual el usuario no podrá cambiar ni modificar. Tales restricciones son:

- Campo fecha: El usuario podrá introducir la fecha de inicio de sistema de acuerdo a las necesidades del material vegetal para el inicio de la inmersión. El campo estará delimitado por un calendario el cual el usuario podrá ingresar el dato correspondiente con el formato que ya especificado en la interfaz.
- Campo Hora: Al igual que el anterior, el usuario ingresará la hora de inicio del sistema, en este caso, delimitado a un formato de 24 horas.
- Campo tiempo inmersión: En este campo el usuario podrá introducir los minutos que el material estará en el medio de cultivo. La aplicación se desarrollará para sólo aceptar cierta cantidad de minutos necesarios para realizar la micropropagación vegetal. En este caso el campo estará restringido para ir desde 1 a 5 minutos.
- Intervalo de inmersión. El usuario tendrá la oportunidad de ingresar el intervalo de horas entre una inmersión y otra, el sistema por otra parte, validará las horas que el usuario ingrese para comenzar un ciclo que se repita hasta que se haya cumplido la condición de término del sistema.

Una vez concluido las condiciones de ingreso de datos, se realiza el modelado de la interfaz, la cual su manejo se hará de una manera sencilla, ya que en realidad los campos a introducir son pocos pero concretos. La interfaz deberá cumplir con los siguientes requisitos:

- Fácil de utilizar para cualquier persona, dando por hecho que las personas que tendrán acceso al mismo serán únicamente aquellas con conocimientos previos a lo que es un sistema de inmersión temporal, ya sea el investigador biológico, estudiantes o personal de servicio autorizado

- Buena presentación y armonía de colores
- Botones con tamaño adecuado y colocados de forma estratégica de acuerdo a la interfaz
- Imágenes o tablas fáciles de entender
- Mensajes de aviso o error sencillos y específicos

4.6 Elementos adicionales

4.6.1 Hardware

- Motor a pasos que reemplaza una bomba de vacío
- Tornillo CNC
- Pantalla LCD para visualizar y controlar la aplicación
- Placa Raspberry PI 3
- Placa Arduino UNO

4.6.2 Software

- IDE netbeans de fácil acceso y libre distribución para desarrollar la aplicación
- IDE arduino para controlar motor

4.6.3 Diagrama de casos de uso

El sistema en realidad como se pudo visualizar contiene una interfaz sencilla, pero realmente se tuvieron que desarrollar varios procesos para que se puedan llevar a cabo los pasos correctamente.

El siguiente diagrama de casos de uso representa el modelado del Sistema de Inmersión Temporal que es el encargado de llevar a cabo las inmersiones dentro del medio de cultivo del material vegetal que se maneja en el Colegio de Posgraduados, con diferentes tareas que todas en conjunto llevan a cabo el funcionamiento de todo el sistema, dichas tareas son simples pero esenciales, con alguna de ellas que en dado momento se omitiera, el sistema cambiaría el sentido para lo que está diseñado.

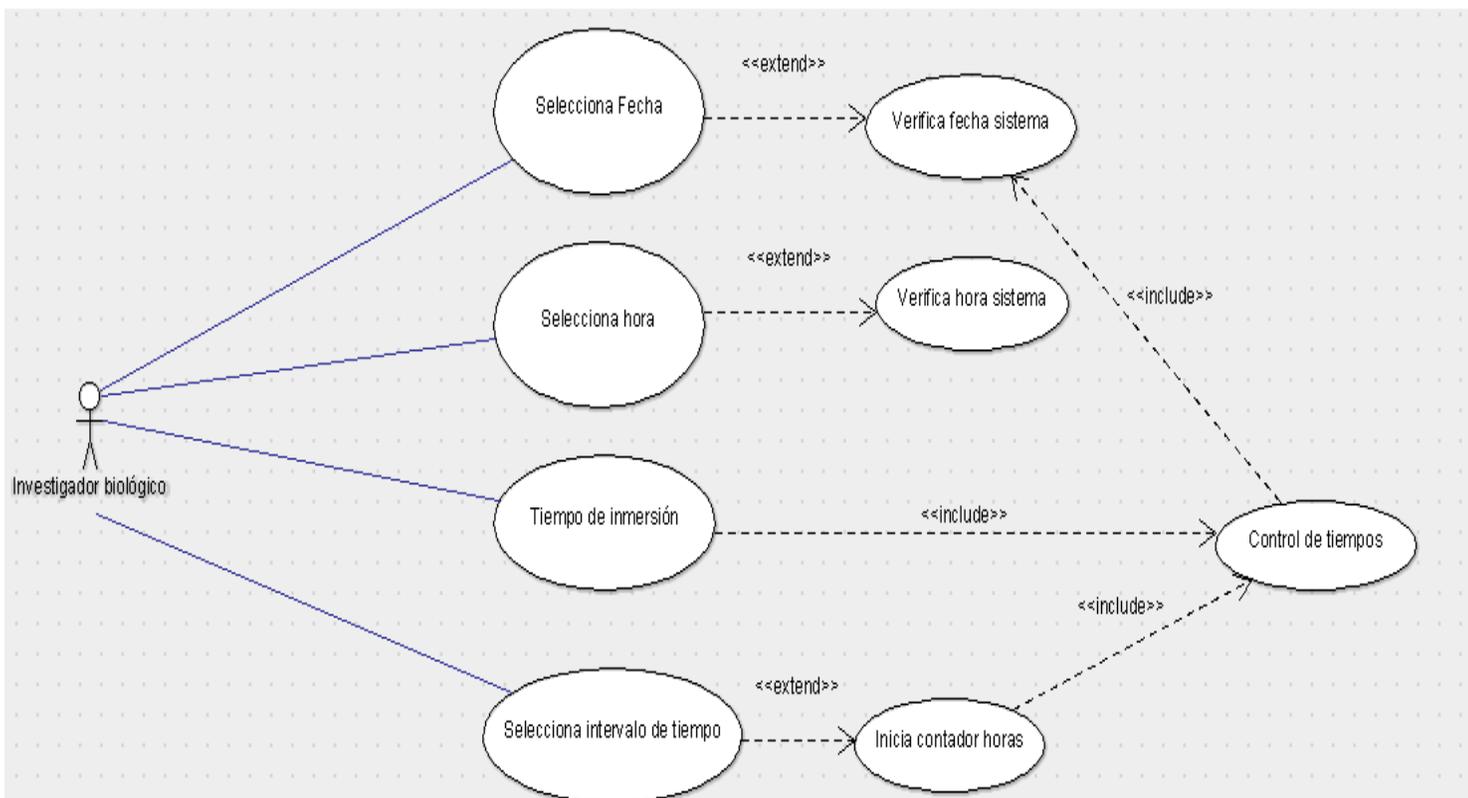


Diagrama 7 Diagrama de casos de uso
Fuente: Elaboración propia

A continuación se describen las características de cada caso de uso y los actores que participan

Nombre del caso de uso:	Selecciona fecha	
Id del caso de uso:	CU1	
Fuente:		
Actor Primario:	Investigador biológico	
Requerimiento	R1	
Descripción:	El investigador biológico o usuario ingresa la fecha en que debe dar inicio el sistema	
Precondición:	Ingresar fecha válida	
Disparador:		
Curso Típico de Eventos:	Acciones del Actor	Respuesta del Sistema
	1.- Ingresar fecha	2.- Valida fecha
Cursos alternos:		
Conclusión:	Sistema guarda fecha	

*Tabla 7 Caso de uso CU1
Fuente: Elaboración personal*

Nombre del caso de uso:	Selecciona hora	
Id del caso de uso:	CU2	
Fuente:		
Actor Primario:	Investigador biológico	
Requerimiento	R2	
Descripción:	El investigador biológico o usuario ingresa la hora en que debe dar inicio el sistema	
Precondición:	Ingresar hora válida	
Disparador:		
Curso Típico de Eventos:	Acciones del Actor	Respuesta del Sistema
	1.- Ingresar hora	2.- Sistema valida hora
Cursos alternos:		
Conclusión:	Sistema guarda hora	

*Tabla 8 Caso de uso CU2
Fuente: Elaboración personal*

Nombre del caso de uso:	Ingresar tiempo-inmersión	
Id del caso de uso:	CU3	
Fuente:		
Actor Primario:	Investigador biológico	
Requerimiento	R3	
Descripción:	El investigador biológico o usuario ingresa el tiempo en que los explantes deben estar sumergidos en el medio de cultivo, ingresado en minutos	
Precondición:	Tiempo de inmersión validada en minutos	
Disparador:		
Curso Típico de Eventos:	Acciones del Actor	Respuesta del Sistema
	1.- Ingresar minutos de inmersión	2.- Sistema valida minutos de inmersión ingresados por el usuario
Cursos alternos:		
Conclusión:	Sistema guarda los minutos de inmersión ingresados	

*Tabla 9 Caso de uso CU3
Fuente: Elaboración personal*

Nombre del caso de uso:	Ingresar intervalo de tiempo entre inmersiones	
Id del caso de uso:	CU4	
Fuente:		
Actor Primario:	Investigador biológico	
Requerimiento	R4	
Descripción:	El investigador biológico o usuario ingresa el intervalo entre una inmersión y otra en horas	
Precondición:	Tiempo de inmersión debe estar ingresado en horas	
Disparador:		
Curso Típico de Eventos:	Acciones del Actor	Respuesta del Sistema
	1.- Ingresar número de horas entre inmersiones	2.- Sistema valida número de horas ingresadas por el usuario
Cursos alternos:		
Conclusión:	Sistema guarda número de horas ingresadas	

*Tabla 10 Caso de uso CU4
Fuente: Elaboración personal*

Nombre del caso de uso:	Comprobar fecha sistema	
Id del caso de uso:	CU5	
Fuente:		
Actor Primario:	Investigador biológico	
Requerimiento	R1	
Descripción:	El sistema verifica que el ingreso de la fecha ingresada por el usuario sea correcta	
Precondición:	La fecha lógica de acuerdo al sistema	
Disparador:		
Curso Típico de Eventos:	Acciones del Actor	Respuesta del Sistema
	1.- Ingresa hora	2.- El sistema verifica que los datos ingresados sean lógicos y coincidan con los datos del equipo, es decir, verificar que no se haya ingresado una fecha que ya haya pasado.
Cursos alternos:		
Conclusión:	Inicia control de tiempos	

*Tabla 11 Caso de uso CU5
Fuente: Elaboración personal*

Nombre del caso de uso:	Comprobar hora sistema	
Id del caso de uso:	CU6	
Fuente:		
Actor Primario:	Investigador biológico	
Requerimiento	R2	
Descripción:	El sistema verifica que el ingreso de la hora de inicio de inmersiones se ingresado correctamente por el usuario	
Precondición:	El usuario ingresa hora lógica de acuerdo al sistema	
Disparador:		
Curso Típico de Eventos:	Acciones del Actor	Respuesta del Sistema
	1.- Ingresa hora	2.- El sistema verifica que los datos ingresados sean lógicos y coincidan con los datos del equipo, es decir, verificar que no se haya ingresado una hora que ya haya pasado.
Cursos alternos:		
Conclusión:	Inicia control de tiempos	

*Tabla 12 Caso de uso CU6
Fuente: Elaboración personal*

Nombre del caso de uso:	Contador de horas	
Id del caso de uso:	CU7	
Fuente:		
Actor Primario:	Investigador biológico	
Requerimiento	R4	
Descripción:	El sistema inicia el conteo de horas entre inmersiones. Se realiza un ciclo de 24 horas para completar un día.	
Precondición:	El usuario debe ingresar hora entre inmersiones antes de dar inicio al sistema	
Disparador:		
Curso Típico de Eventos:	Acciones del Actor	Respuesta del Sistema
	1.- Ingresa hora	2.- Sistema valida el número de horas entre inmersiones
Cursos alternos:		
Conclusión:	Inicia control de tiempos	

*Tabla 13 Caso de uso CU7
Fuente: Elaboración personal*

Nombre del caso de uso:	Control de tiempos	
Id del caso de uso:	CU8	
Fuente:		
Actor Primario:	Investigador biológico	
Requerimiento	R1, R2, R3, R4	
Descripción:	<p>Una vez validadas las condiciones tanto de ingreso de fecha, ingreso de hora, tiempo de inmersión e intervalos de tiempo entre inmersiones, el sistema procede a dar un retardo de 10 segundos que es el tiempo en que tardan en bajar los explantes para sumergirlos en el medio de cultivo, ya en la posición indicada, inicia el conteo de minutos para la inmersión. Al terminar, el sistema nuevamente sube la plataforma de los explantes a su posición original. Inicia el conteo de intervalo de horas entre inmersiones. Al cumplirse la condición nuevamente comienza el ciclo de inmersión en el medio de cultivo.</p> <p>Con los datos anteriores el sistema inicia el cálculo de minutos de inmersiones e intervalos entre inmersiones para completar un ciclo de 24 horas durante 30 días. Al completar dicho ciclo, se detiene por completo el sistema</p>	

Precondición:	Todos los datos ingresados anteriormente deben ser validados correctamente por el sistema	
Disparador:		
Curso Típico de Eventos:	Acciones del Actor	Respuesta del Sistema
	1.- Ingresar hora	2.- Sistema valida el número de horas entre inmersiones
Cursos alternos:		
Conclusión:	Inicia control de tiempos	

*Tabla 14 Caso de uso CU8
Fuente: Elaboración personal*

Capítulo 5 DESARROLLO

Los Biorreactores son los equipos donde se realiza el proceso de cultivo, ya sea en estado sólido o líquido. Su diseño debe ser tal que asegure homogeneidad entre los componentes del sistema y condiciones óptimas para el crecimiento de los brotes y la obtención del producto deseado.

A continuación se describe de manera explícita los prototipos diseñados.

5.1 Prototipo N. 1

Para la construcción del nuevo biorreactor se utilizaron productos cotidianos que se pueden encontrar fácilmente en tlapalerías, productos para el hogar, vidrierías, etc. De hecho, en este primer prototipo en primera instancia lo que se ha querido lograr ha sido economizar en materiales para cumplir así con el primer objetivo que es la disminución de costos.

En este caso, antes de comenzar con la construcción de un nuevo prototipo, es indispensable tener los conocimientos básicos acerca de la importancia que tiene un biorreactor para la propagación de especies propagadas *in vitro*, así como los materiales que son los adecuados para evitar cualquier tipo de contaminación. Se han llevado a cabo investigaciones diversas para cumplir con estos requisitos, es por ello que se ha ahondado sobre todo en qué material es el más óptimo para llevar a cabo la esterilización en el autoclave y que pudiera resistir sus altas temperaturas.

5.1.1 Materiales

Se utilizó un recipiente de plástico el cual tiene una capacidad de almacenar 6 litros de líquido de la marca Alica. Se realizó la prueba de autoclavado y se verificó que pudiera resistir la temperatura deseada, fue satisfactoria y se decidió utilizarlo para el primer prototipo.



*Ilustración 13 Recipiente utilizado para diseñar el prototipo N. 1
Fuente: (Alica, 2019)*

La imagen muestra el primer contenedor para el desarrollo del primer prototipo. Es completamente transparente el cual beneficia la entrada de luz hacia los explantes con las siguientes características:

- Largo: 31 cm
- Ancho: 17 cm
- Tapa: 25x38 cm

Seguidamente se procedió a adquirir una coladera de plástico, esto es porque se pretende respetar uno de los principios con los que funciona un Sistema de Inmersión Temporal, que es que el medio de cultivo suba hacia los explantes por medio de la bomba de vacío. Esta coladera se ajusta perfectamente dentro del primer recipiente.

La imagen siguiente muestra la coladera utilizada para contener los explantes, es ligera y práctica para que se pueda ajustar correctamente al contenedor.



Ilustración 14 Coladera de plástico para contener los explantes
Fuente: (Envasur, 2019)

Mangueras de laboratorio



Ilustración 15 Manguera de látex de laboratorio
Fuente: Elaboración propia

- Se utilizó una manguera material silicona como se muestra en la imagen de arriba de 8mm color ámbar



*Ilustración 16 Bomba de vacío utilizada en Colpos
Fuente: Elaboración propia en COLPOS*

La imagen anterior muestra la bomba de vacío de $\frac{1}{4}$ hp y 110 voltios que se utiliza en el Colpos para la dispersión del aire dentro del contenedor.

Materiales varios:

- Silicón
- Vidrio
- Conectores para manguera de laboratorio
- Mechero de bunsen
- Agujas
- Taladro
- Resistol
- Kola Loka
- Agua
- Filtros

5.1.2 Procedimiento

Con el taladro se hizo un orificio en la parte inferior del recipiente principal que será el que contenga el medio de cultivo, esto para colocar la manguera que servirá para enviar el aire desde la bomba de vacío hacia el interior del recipiente. El orificio es del tamaño de una broca de 3/16 y se lima para un mejor ajuste.



A



B

*Ilustración 17 Barrenos realizados para la colocación de las mangueras
Fuente: Elaboración propia en ColPos*

La imagen anterior muestra la realización de los barrenos correspondientes para la colocación de las mangueras. Primero se realizó el barreno en la tapa del contenedor justo como se muestra en la imagen A y después en la parte inferior del contenedor como se muestra en la imagen B

Se fijó la coladera dentro del recipiente, de esta manera se verificó que su ajuste sea el ideal y sólo reforzó con silicón blanco para que no se desprenda. Se dejó actuar por toda una noche.

En la imagen siguiente se muestra como quedó fijada la coladera dentro del contenedor. Hasta el momento, el resultado es el adecuado.



*Ilustración 18 Coladera fijada dentro del contenedor de plástico
Fuente: Elaboración propia en ColPos*

Después de asegurarnos que la coladera de plástico por el momento si cubría la necesidad que se tenía para poder colocarla en el recipiente, se tuvo que desprender para continuar con el siguiente paso.



*Ilustración 19 Manguera colocada dentro del recipiente
Fuente: Elaboración propia en ColPos*

La imagen muestra cómo se verifica que la manguera que se seleccionó se pueda conectar a la bomba de vacío, al mismo tiempo se distribuye en su interior. La idea es que dicha manguera vierta el aire de la bomba de vacío dentro del contenedor para que pueda esparcir el medio de cultivo hacia los explantes.

El primer inconveniente que se tuvo en este caso, fue que al momento de realizar las primeras pruebas con líquido, la manguera de látex se desprendió, ya que el material con el que se fijó no es apto para manejarse dentro de un medio líquido.

Se llega a la conclusión que se necesita un material extra para lograr que la manguera se fije dentro del recipiente, se hacen varias pruebas con diferentes pegamentos, sin embargo, al momento de verter líquido, la manguera sigue desprendiéndose, se opta por mezclar silicón caliente y kola loka, pero esta vez colocando una mica transparente al fondo del contenedor. Esto sirve para lograr una mayor fijación y evitar cualquier posibilidad de desprendimiento. Se deja actuar toda una noche.



*Ilustración 20 Manguera fijada al fondo del contenedor
Fuente: Elaboración propia en ColPos*

En la imagen anterior se muestra cómo quedó fijada la manguera dentro del contenedor y se colocan los fitting que para unir las mangueras.

Se observa que el método de fijar la manguera de látex a la mica transparente funcionó bien, al ingresar el líquido dentro del contenedor el pegamento resistió y se prosigue a realizar los siguientes pasos.

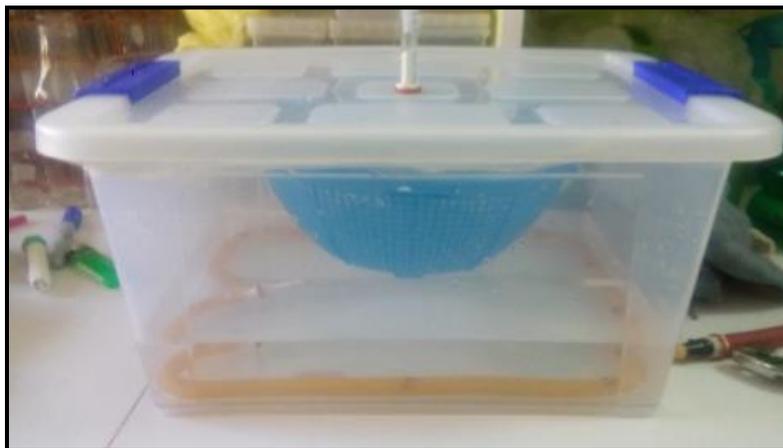
Para que el aire que expulsado de la bomba de vacío pueda esparcirse por todo el contenedor, se realizaron orificios alrededor de la manguera con la ayuda de un mechero de bunsen y un clavo a una distancia de 5 cm entre uno y otro y así el aire pueda cubrir toda la superficie.



*Ilustración 21 Orificios realizados a lo largo de la manguera
Fuente: Elaboración propia en ColPos*

Se visualiza en la imagen anterior el resultado de los orificios a lo largo de la manguera por donde se va a esparcir el aire.

A continuación se procede a ensamblar todas las piezas de este primer prototipo, la primera prueba se realizó con 2 litros de agua corriente y después con 3.



*Ilustración 22 Ensamble del prototipo N. 1
Fuente: Elaboración propia en ColPos*

En esta imagen se muestra la forma en que queda ensamblado esta primera etapa del prototipo. Se observa que al momento de conectar la bomba de vacío para comenzar a realizar las pruebas con material vegetal el agua no sube correctamente hacia la superficie, de hecho, sólo se visualiza que escapan burbujas por los orificios de la manguera y una mínima parte de agua llega a esparcirse y obviamente no llega a cubrir la coladera que contendrá los explantes

Se decide realizar una segunda etapa y como ya se demostró el inconveniente es que el agua no llega a cubrir correctamente el contenedor, se da por el hecho que la manguera de látex no es óptima para realizar el procedimiento, es por ello que se decide cambiar el tipo de manguera por una más densa que sea más fácil de manipular para este caso de material PVC, eso quiere decir que más firme y rígida.

La imagen siguiente muestra la manguera de silicona de 1/8 de pulgada que se utilizó para esta segunda etapa del prototipo, en este caso se puede observar que es transparente lo que ayuda a tener una mejor visualización de lo que hay dentro.

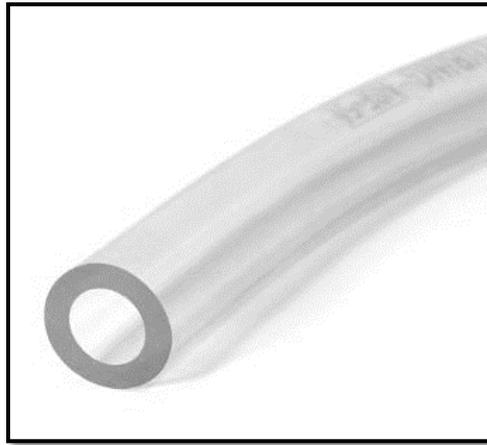


Ilustración 23 Manguera PVC
Fuente: Elaboración propia en ColPos

La manguera transparente se coloca alrededor del contenedor en la parte interior y se procede a unir con la manguera color ámbar con un conector en Y. Como se observa en la siguiente imagen.

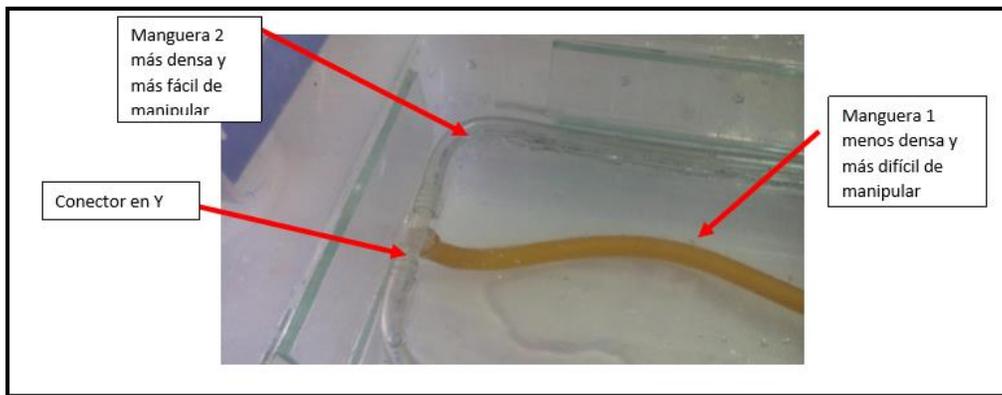


Ilustración 24 Mangueras colocadas dentro del contenedor
Fuente: Elaboración propia en ColPos

Se observa que aun así se requiere elevar más las mangueras para facilitar que el medio suba hacia los explantes, esto es porque el contenedor es de una superficie mayor, es por ello, que nos percatamos que se necesita una mayor fuerza para lograr que el agua logre subir y bañar los explantes.

Al no ser suficiente la potencia con la que sube el medio líquido, se decide prescindir de la coladera que se tenía en un principio y se opta por sustituirla por láminas de vidrio.



Ilustración 25 Láminas de vidrio dentro del contenedor
Fuente: Elaboración propia en ColPos

El grosor de las láminas de vidrio son de 1 in aproximadamente, las cuales se colocan dentro del contenedor en forma horizontal a distancias de abajo hacia arriba de 4.5 cm y 6 cm respectivamente. Como se muestra en la imagen anterior.

Finalmente, se vuelve a armar todo el prototipo para realizar las pruebas correspondientes.



*Ilustración 26 Prototipo N. 1 terminado (segunda etapa)
Fuente: Elaboración propia en ColPos*

Se muestra la segunda etapa del prototipo N. 1 terminada con todas las conexiones y filtros correspondientes.

5.1.3 Resultados del Prototipo N. 1

Como resultado el primer diseño de prototipo no es apto por todos los inconvenientes citados con anterioridad, la dificultad con la que se armó y el hecho de que los materiales no son especiales para este caso y por ende, no se adaptan a los requerimientos, sin embargo, este prototipo si es apto para seguir haciendo pruebas y verificar más materiales más eficientes y más fácil de manejar.

Las pruebas que se realizaron fueron contundentes para percatarnos que tanto su eficiencia como su operatividad no fueron lo óptimo para el estudio que se puede realizar.

En el siguiente cuadro puede observar los criterios evaluados para este primer prototipo lo cuales se explican brevemente.

Materiales	Observaciones
Agua	Se utilizan mínimo tres litros de agua para lograr que llegue a bañar los explantes.
Recipiente o contenedor	Muy amplio para multiplicar la micropropagación, no es hermético, hay mayor probabilidad de contaminación. Autoclavable
Llenado	Lento, ya no se realizó una entrada extra para que el llenado del contenedor fuera más eficiente, ya que se debe esperar a que el agua pase por los orificios de las micas de vidrio.
Mangueras	Costo elevado, no aptas para el estudio y por lo tanto desperdicio de material
Limpieza del recipiente	Lenta por la misma acción del punto 4, no se pueden desprender las láminas por el hecho que están fijadas completamente al contenedor
Hermeticidad	Baja debido a que no está diseñado para ello, se colocó cinta teflón para intentar sellarlo sin resultado
Eficiencia de la bomba de vacío	Regular, se necesitaron modificar las mangueras para que el agua llegará a cubrir la superficie del contenedor

*Tabla 15 Observaciones generales prototipo N. 1
Fuente: Elaboración propia*

En pocas palabras, el prototipo N. 1 queda descartado pero con la posibilidad de futuras mejorías.

5.2 Prototipo N. 2

Para la construcción de este nuevo biorreactor en esta primera etapa llamado “Prototipo n. 2” se utilizaron distintos materiales, pero cabe destacar, que en este caso, a diferencia del “Prototipo n. 1” los materiales utilizados no son tan comunes, pero son más útiles para el desarrollo del proyecto y se esperan resultados distintos.

5.2.1 Materiales

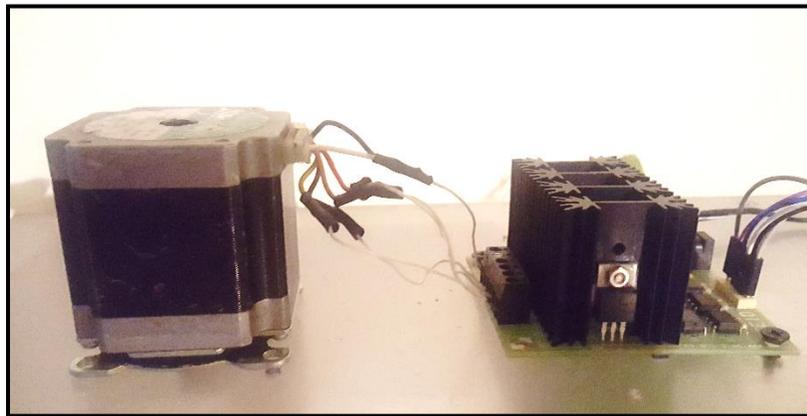
1. Recipiente de plástico hermético de 2.5 lts. Con tapa roscada de 5 1/2 pulgadas. Súper sello taparroca 2600.



*Ilustración 27 Recipiente de plástico hermético
Fuente: (Cubasa, 2019)*

La imagen anterior muestra el recipiente o contenedor de plástico transparente con prueba de autoclave realizada el cual es óptimo para el desarrollo del segundo prototipo.

2. Motor a pasos de 12v y 6 hilos con driver



*Ilustración 28 Motor a pasos
Fuente: Elaboración propia*

Se muestra la figura anterior el motor a pasos conectado a su respectivo driver por medio de 6 cables también llamado 6 hilos.

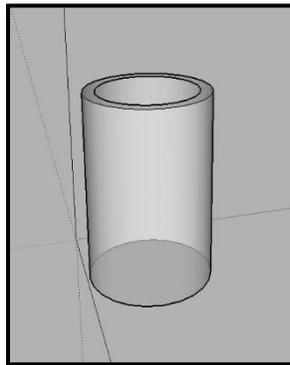
3. Tornillo 8 mm con tuerca para impresora 3d CNC, de 30 mm



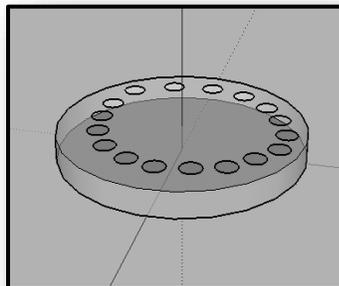
Ilustración 29 Tornillo CNC
Fuente: Elaboración propia

5.2.2 Procedimiento

Antes realizar las compras para la construcción de este nuevo prototipo, se hizo un modelo 3D para tener una mejor idea de lo que desea realizar.



A



B

Ilustración 30 Diseños propuestos
Fuente: Elaboración propia

La imagen anterior muestra la elaboración de unos bosquejos simples, sin embargo, sirven de ayuda para poder darse una idea del diseño de este segundo prototipo.

5.2.2.1 Primera etapa

Una vez realizados los diseños en 3D, se procedió a adquirir los materiales que más se acoplaran a las necesidades del proyecto, en este caso, el recipiente “Súper sello taparroasca 2600” que ya se mencionó anteriormente, es lo que más se acercó a las expectativas, además, de ser muy accesible al bolsillo, ya que su costo no pasa de los \$60.00 pesos. Antes proceder la fabricación de las demás piezas se verificó que el contenedor resistiera las altas temperaturas de 121°C del autoclave, como ya se mencionó en líneas anteriores. Se utilizaron dos recipientes. Un primer recipiente se introdujo al autoclave con una mínima cantidad de agua (200 ml).



*Ilustración 31 Recipiente N. 1 deformado
Fuente: Elaboración propia*

Pasadas las dos horas del procedimiento normal para la esterilización de cualquier tipo de material, se percató que el recipiente se deformó de un extremo, como en la anterior Imagen, la cual se deformó del lado derecho por acción del calor.

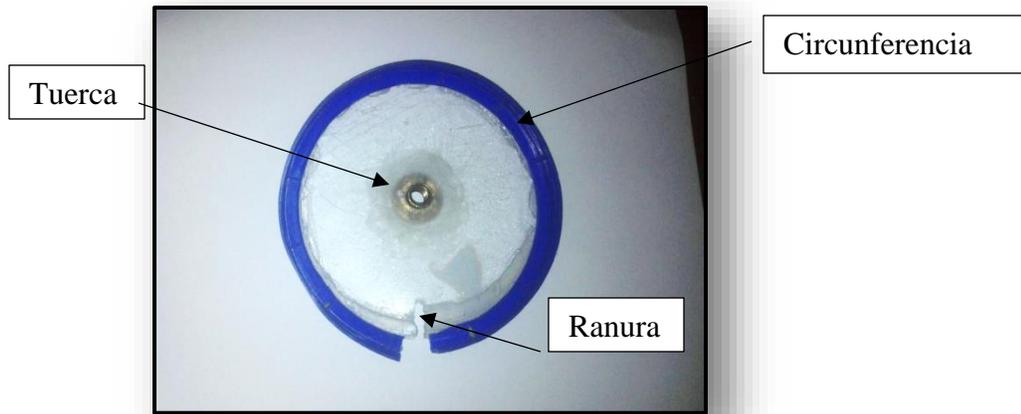
Para el segundo contenedor, se optó por llenarlo a $\frac{3}{4}$ de agua y las pruebas salieron positivas, no hubo deformación ni algún otro aspecto que pudiera ser inconveniente para la continuación de la construcción del prototipo.

Una vez que hizo la aprobación del contenedor, se prosigue a la realización del “embolo” o “plataforma” que contendría los explantes o brotes a cultivar.

El primer modelo para la realización de la plataforma fue hecha con material acrílico con un diámetro de 4 $\frac{1}{2}$ pulgadas y 1 pulgada de ancho. Se le realizó un corte pequeño en un extremo del mismo de $\frac{1}{4}$ de pulgada con un disco de corte de 4 $\frac{1}{2}$ pulgadas, esto se hizo para colocar una

guía y lograr que la plataforma siga un camino fijo a lo largo al momento de subir y bajar del contenedor principal.

La siguiente imagen muestra el resultado de la fabricación del émbolo con acrílico



*Ilustración 32 Plataforma fabricada con acrílico
Fuente: Elaboración propia*

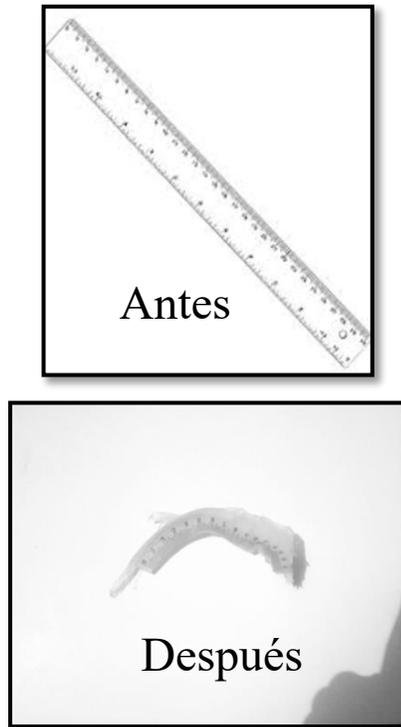
La circunferencia azul que se puede observar en la imagen se fabricó con el propósito de evitar en el futuro que el material vegetal se llegue a caer hacia el fondo por los bordes el embolo o plataforma, entonces la idea de esta ceja es que los explantes los mantendría en su sitio. La tuerca que se puede observar en el centro forma parte del Tornillo CNC fijado con pegamento ultrarresistente que es donde va a estar colocado el tornillo para lograr el giro de la plataforma.



*Ilustración 33 Deformación del émbolo con acrílico
Fuente: Elaboración propia*

Al terminar la fabricación de este embolo o plataforma, se procedió a realizar la prueba con el autoclave para verificar su resistencia a las altas temperaturas. Los resultados se pueden observar en la imagen anterior donde el desgaste se encuentra del lado derecho.

Como se mencionó anteriormente, también se fabricó una guía para evitar el tambaleo del embolo, esto se realizó con una regla de plástico de 15 cm y posteriormente probar en el autoclave.



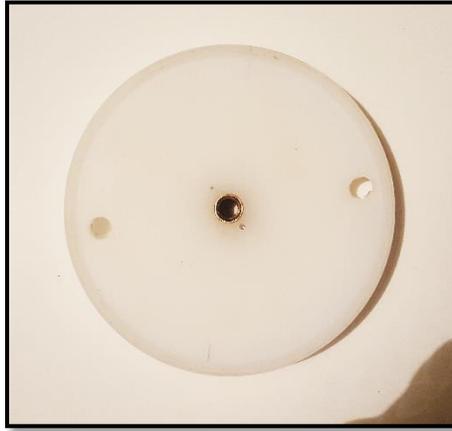
*Ilustración 34 Resultados de la introducción al autoclave
Fuente: Elaboración propia*

Se puede observar en la imagen anterior cómo se deformó la regla de plástico que sería utilizada como guía para el émbolo, sin embargo, gracias a las altas temperaturas se descarta como opción para el proyecto que se lleva a cabo.

5.2.2.2 Segunda etapa

Para la segunda etapa del prototipo, el nuevo material para la fabricación del embolo llamado nylamid que pertenece a la familia de las Poliamidas (PA) Nylon. Su combinación de propiedades mecánicas y eléctricas además de su amplia gama de presentaciones y medidas, lo han hecho el material ideal para la fabricación de diversas piezas en el ramo industrial. La versatilidad de los productos Nylamid ha ayudado a resolver problemas de diseño de partes para equipo original o de sustitución de refacciones fabricadas con otros materiales como: acero, bronce, aluminio, madera, cerámica y otros plásticos.

Se fabricó un disco de 4 ½ pulgadas con una circunferencia hacia afuera para contener los brotes de ½ pulgada. En los ambos extremos de embolo se realizaron dos barrenos de ¼ de pulgada con un taladro para colocar en lugar de una, dos guías para evitar el tambaleo del émbolo o plataforma y siga el camino fijo a lo largo del contenedor.



*Ilustración 35 Embolo fabricado con nylamind
Fuente: Elaboración propia*

La imagen anterior muestra el embolo fabricado mediante un torno con las medidas descritas anteriormente. Para la prueba del autoclave se observó que el disco de nylamind no tuvo ningún daño, así que se prosiguió con la fabricación del prototipo.

Se continúa con la fabricación de las guías del embolo que de igual manera, al observarse que no hubo ningún daño al mismo, el material escogido fue de igual manera nylamind.

Para la fabricación de las guías, se utilizaron dos barras circulares de este material, adquiridas en un establecimiento dónde se distribuye plástico industrial (es ese mismo establecimiento se adquirió el material para el embolo). Las guías fueron adaptadas para colocarlas dentro del recipiente de plástico original con las siguientes medidas: 9 pulgadas de largo por ¼ de pulgada de grosor.

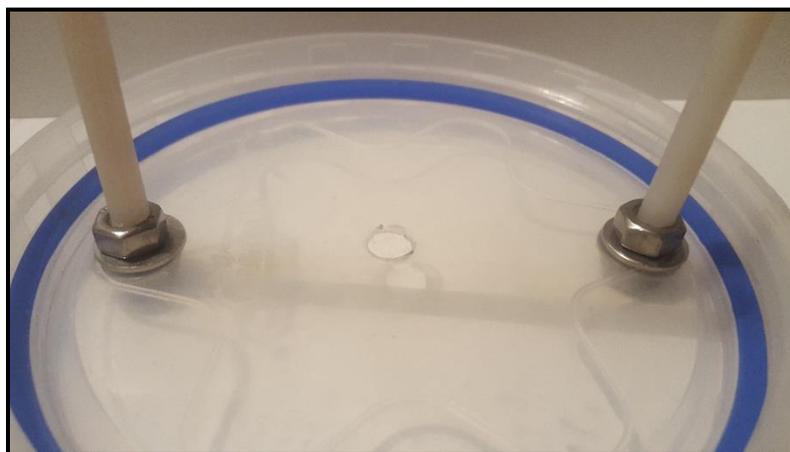
Al igual que embolo, a la tapa del recipiente se le hicieron dos barrenos de ¼ de pulgada (medida de las barras de nylamind) y se aprovecha para hacer del barreno de ¾ de pulgada al centro para colocar el tornillo CNC y poder pasar a través de ella.



*Ilustración 36 Tapa del contenedor
Fuente: Elaboración propia*

La imagen anterior ya está lista para colocar las guías de nylamind que se fabricaron. De los extremos se realizaron barrenos de $\frac{1}{4}$ de pulgada y en el centro de $\frac{3}{4}$ de pulgada que son las medidas correctas para su ajuste.

Para que se sostuvieran las guías en la tapa del recipiente, se adquirieron dos tuercas y dos rondanas de acero inoxidable de $\frac{1}{4}$ de pulgada.

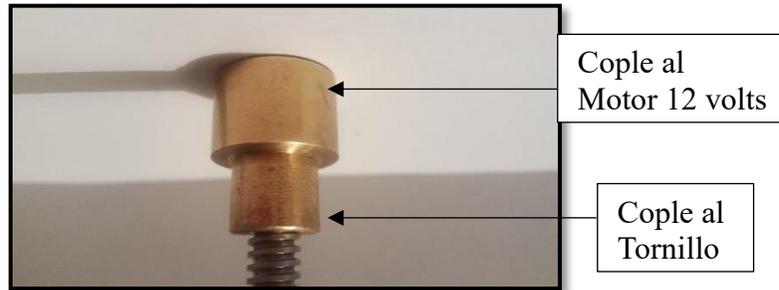


*Ilustración 37 Colocación de guías de nylamind
Fuente: Elaboración propia*

La figura muestra cómo quedan colocadas las guía de nylamind en la tapa del recipiente, como se puede observar, ajustan correctamente a los barrenos.

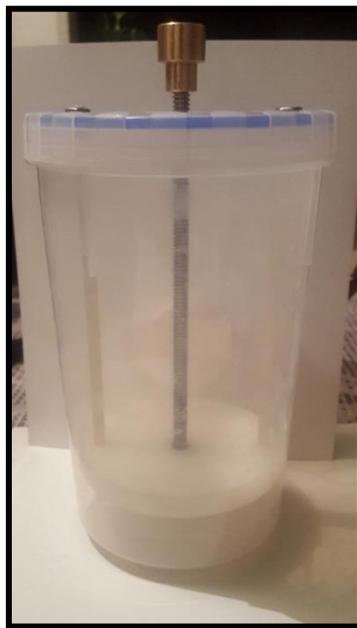
Lo que va a lograr el movimiento ascendente y descendente del embolo es un motor a pasos de 12 volts, que se debe ajustar en la parte superior del tornillo, por esta razón, se fabricó un cople de bronce que se ajuste de un lado al tornillo y del otro lado a la punta del motor, es decir, $\frac{1}{4}$ y $\frac{3}{4}$

de pulgada respectivamente. En la imagen siguiente se observa como en la parte superior se encuentra el lado más grande del cople que es donde se ajusta el motor y en la parte inferior es donde se ajusta el tornillo.



*Ilustración 38 Cople para el motor a pasos
Fuente-. Elaboración propia*

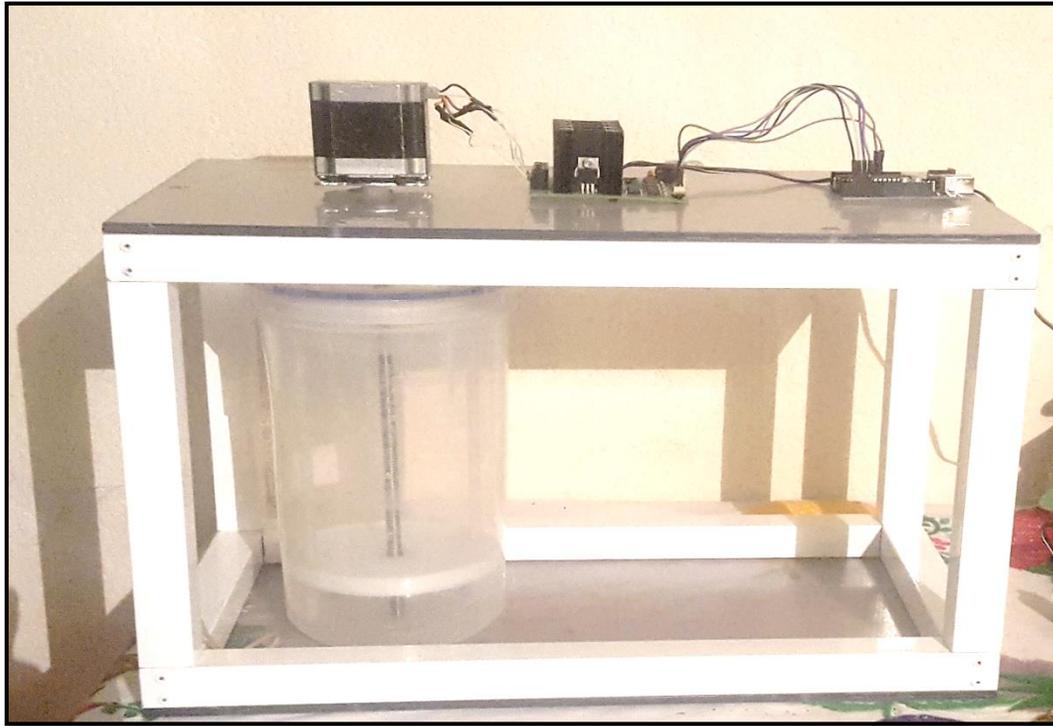
La imagen anterior muestra como el cople sirve como conexión entre el tornillo y el motor, en la parte superior se observa que va el motor y en la parte inferior el tornillo.



*Ilustración 39 Contenedor armado
Fuente: Elaboración propia*

Para finalizar esta etapa, se colocan todas las partes en su respectivo sitio y se procede a realizar el acoplamiento del recipiente con el motor. El recipiente principal que contendrá el medio de cultivo y los brotes como se observa en la imagen arriba.

Una vez ya colocado cada material en su sitio y revisando que se puede manejar fácilmente. El segundo prototipo queda de la siguiente manera:



*Ilustración 40 Prototipo N. 2
Fuente: Elaboración propia*

Se observa en la imagen anterior en ensamble de todas las piezas. En la parte superior están los controles los cuales van a manejar el funcionamiento del biorreactor, estos controles son: Motor a pasos, driver y placa arduino. En la parte inferior de la estructura se muestra el biorreactor con los elementos ya descritos integrados como son: tornillo CNC y plataforma de nylamind. Todo en una estructura de aluminio.

5.2.3 Resultados Prototipo N. 2

Este segundo es el que ha dado los mejores resultados, tanto en funcionalidad como en desempeño. Su diseño está desarrollado de forma que permita que su operatividad sea más sencilla y fácil de manejar que el anterior, ahora en cuestión de capacidad de almacenamiento de medio de cultivo, se es consciente que es menor al anterior, sin embargo, cabe destacar que tomando como referencia el biorreactor de uso continuo que es el RITA, su capacidad es mayor, además de ser de menor capacidad que el anterior, hay menos desperdicio de medio de cultivo.

Al momento de probar este nuevo diseño y sustituir elementos importantes como por ejemplo, la bomba de vacío por un tornillo, se podría llegar a la conclusión que al no haber un medio por el cual verter aire dentro del biorreactor, no hay manera de cómo realizar la inmersión, pero es lo importante de este nuevo prototipo, ya que se ha comprobado que se puede prescindir de dichos elementos que se pensaban que eran indispensables para hacer posibles las inmersiones, pero gracias a la implementación de la tecnología, se puedo comprobar lo contrario.

5.3 Resultados

5.3.1 Integración de hardware y automatización

En las primeras líneas del proyecto se ha descrito que en el Colegio de Posgraduados se tiene un software que ha permitido el control del SIT de manera más fácil de lo que se ha estado trabajando en otras instituciones, se ha de recordar que en otras instituciones para ello se utiliza un timer programable que es el que lleva a cabo las inmersiones en tiempo y forma. Es por ello que una vez más se muestra que gracias a la implementación de la tecnología ahora es mucho más sencillo poder controlar el SIT. Siguiendo los principios de colocar la tecnología a favor De un proyecto de esta índole, a continuación se indica la forma en que va a operar el nuevo biorreactor.

5.3.2 Hardware

Cómo ya se indicó anteriormente, el Prototipo N. 2 es el más idóneo para llevar a cabo su automatización por las características que posee tanto en su estructura como en su operatividad. Resumidamente estos son los materiales a utilizar para conformar todo el prototipo e integrarlos al proyecto.

Recipiente de plástico Hermético: Con base en los resultados de los dos prototipos evaluados, se determinó usar el recipiente plástico del prototipo N2, el cual mostró mejores resultados en la hermeticidad, soporte a altas temperaturas y funcionalidad.

Tornillo CNC:

Antes que nada se debe revisar que es una máquina CNC. CNC es el control numérico computarizado, es decir; es el uso de una computadora para controlar y monitorear los movimientos de una máquina herramienta. Entre esas máquinas herramienta, están tanto estáticas como portátiles. (De máquinas y herramientas, 2018). Una de esas máquinas es el tornillo CNC que gracias a sus movimientos rotatorios va a lograr realizar un movimiento ascendente y descendente del émbolo cuyo trabajo es sostener los explantes para poder sumergirlos en el medio de cultivo. Y esto con los movimientos rotatorios dentro del biorreactor.

Motor a pasos:

En el caso del tornillo CNC que es una máquina más sencilla, admite el uso de una computadora personal externa. El controlador CNC trabaja en conjunto con una serie de motores (servomotores y/o motores paso a paso), así como componentes de accionamiento para desplazar los ejes de la máquina de manera controlada y ejecutar los movimientos programados.

El tornillo CNC para el uso en el biorreactor está conectado a un motor a pasos por medio de un cople de bronce, el motor es el que va a dar la orden de giro. Este es un motor unipolar de 12 volts lo suficientemente potente para poder realizar los movimientos rotatorios del tornillo. Una de las características importantes de un motor a pasos unipolar como este es que consta de 6 hilos que son los cables que tiene para poder controlar el movimiento; normalmente suelen ser 4 cables por los cuales se recibe los pulsos que indican la secuencia y duración de los pasos y los restantes sirven como alimentación de este y por último lleva consigo un driver controlador. (Ingeniería Mecafenix, 2018). Va convertir una serie de pulsos eléctricos en desplazamientos angulares, lo que significa que es capaz de girar una cantidad de grados (paso o medio paso) dependiendo de sus entradas de control.

- Como se requieren movimientos muy precisos, su característica principal es el hecho de poder moverlos un paso a la vez por cada pulso que se le aplique. Este paso puede variar desde 90° hasta pequeños movimientos de 1.8°, Es por eso que ese tipo de motores son muy utilizados, ya que pueden moverse a deseo del usuario según la secuencia que se les indique a través de un microcontrolador, este microcontrolador es su driver. (Ingeniería Mecafenix, 2018)



Para que el motor pueda funcionar correctamente, es indispensable que tenga una fuente de energía, ya que debido al trabajo que está programado a realizar, una fuente externa provee toda la energía necesaria para realizar las funciones adecuadamente. Se toma en cuenta que el driver necesita una fuente externa de 12 V y para el movimiento del tornillo se requiere una fuente de 5 V.

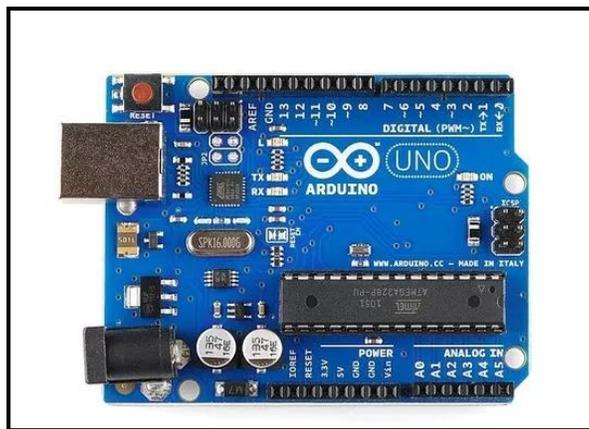
Arduino:

Arduino es una plataforma de hardware libre basada en un simple tablero de entradas y salidas (I/O) y un ambiente de desarrollo que implementa el lenguaje Processing, el cual es un flexible software y lenguaje de aprendizaje para codificación dentro del contexto de las artes visuales. Desde 2001 Processing ha promovido la incorporación del software dentro de las artes visuales como parte de la tecnología por lo cual lo hace ideal para estudiantes, artistas, diseñadores, investigadores y aficionados en el aprendizaje y desarrollo de software (Fry & Reas, 2017).

Es importante saber que el driver por sí solo no actúa para mandar los pulsos al motor, para ello se requiere un elemento extra que es que va a tener el código para poder enviar las instrucciones al driver y enviar los pulsos al motor. Actualmente existen muchas alternativas de hardware que ofrecen la funcionalidad que se requiere para controlar el SIT para este caso, la placa arduino ha ofrecido tener muchas ventajas las cuales se pueden sacar provecho. Como son:

- Precio accesible
- Hardware libre
- Existe una comunidad de usuarios a nivel mundial que comparten sus conocimientos. Es un foro en el que muchos usuarios pueden consultar sus dudas y apoyarse unos a otros
- Es multiplataforma, ya que puede ser ejecutado en diferentes sistemas operativos
- Cuenta con IDE muy amigable que lo hace muy sencillo para trabajar con él
- Arduino está publicado bajo la licencia de código abierto y puede ser programado bajo las funciones en C/C++

Con todas estas características se ha llegado a la conclusión que arduino es la mejor opción para controlar en este caso, el motor a pasos, sin tanto código ni desgaste por lo mismo de sus funciones que ya se han visto.



*Ilustración 42 Placa Arduino
Fuente: (Arduino, s.f.)*

Raspberry pi:

Con base al requerimiento no funcional R5, el cual nos indica que el sistema no debe depender de un equipo de cómputo para su correcto funcionamiento, se ha implementado la utilización de la placa Raspberry pi, la cual, gracias a sus características hace posible prescindir de una pc para poder cargar una aplicación que se ha desarrollado para el biorreactor y así cumplir el objetivo principal que es la disminución de costos.

Raspberry pi es un ordenador de placa reducida, de bajo costo desarrollado en el Reino Unido por la fundación Raspberry pi. Es una placa que soporta varios componentes necesarios en un ordenador común. Es como un ordenador pequeño capaz de ser utilizado por muchas de las cosas que una PC lo hace. (ABC Tecnología, 2018)

Proyecto ideado en 2006 y lanzado al mercado hasta 2012, tiene varios puertos y entradas, dos USB, uno de Ethernet y una salida HDMI. Estos puertos permiten conectar el miniordenador a otros dispositivos, teclados, ratones y pantallas.

Posee de igual manera un chip que contiene un procesador ARM que corre a 700 Mhz, un procesador gráfico VideoCore IV y hasta 512 Mg de memoria RAM. Además es posible instalar sistemas operativos libres a través de una tarjeta SD. En pocas palabras, es un miniordenador. (ABC Tecnología, 2018)



*Ilustración 43 Elementos de Raspberry pi
Fuente: Elaboración propia*

La imagen anterior muestra los elementos físicos básicos de una Raspberry pi como son:

- Placa Raspberry
- Eliminador
- Disipadores de calor
- Carcasa

Se tiene el siguiente diagrama donde se explica las partes más relevantes de Raspberry pi:

- Controlador LAN
- Jack MicroSD
- Conector USB
- Slot para memoria SD
- Conector de audio
- Entradas/salidas para periféricos
- Chip broadcom: Procesador principal
- GPIO: Pines de entrada y salida que permiten conectar entre sensores, actuadores, circuitos externos. Aquí es importante porque es donde conectaremos el monitor para poder visualizar la aplicación.

Para poder manejar la tarjeta y para poder desarrollar los programas se ocupan de otros elementos externos:

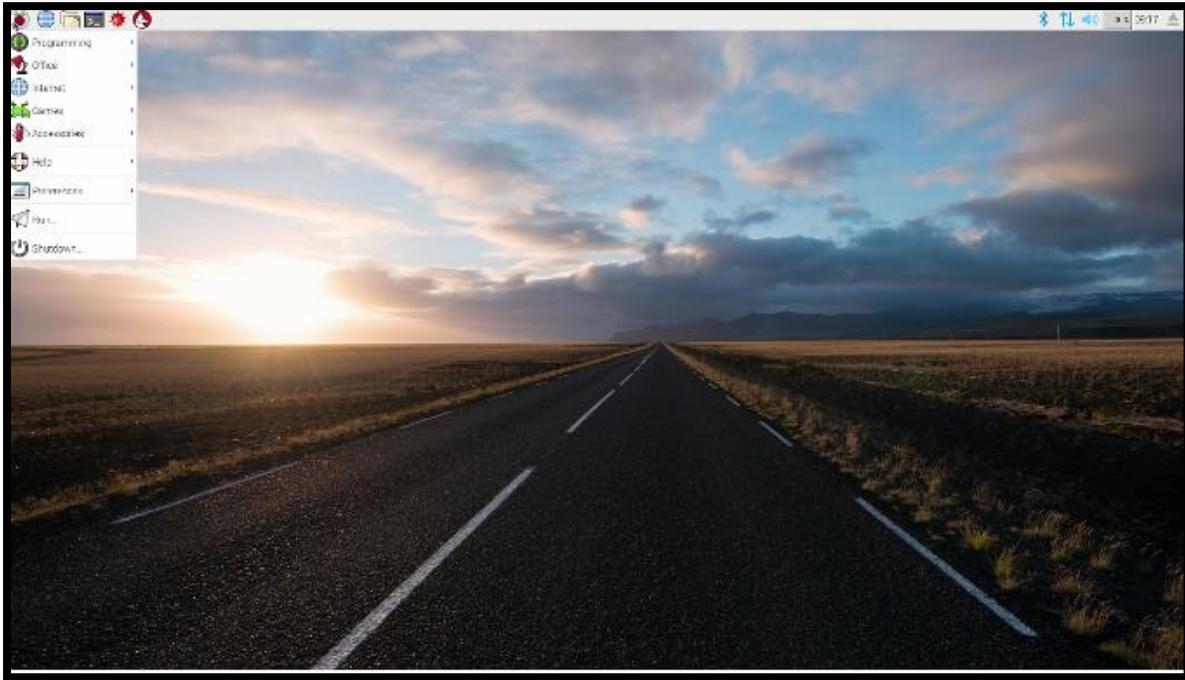
- Monitor de conexión HDMI
- Teclado, mouse
- Memoria micro SD para cargar el sistema
- Adaptador de 5V para encendido de la tarjeta

La Micro SD debe tener el software que es el sistema operativo. Para este caso, se hace uso del sistema Raspbian el cual se carga en la micro SD.

Noobs es el instalador de sistemas operativos para Raspberry Pi. Los pasos a seguir son:

- Descargar NOOBS en la PC
- Insertar o conectar la tarjeta SD en ese mismo PC
- Formatear la tarjeta SD
- Descomprimir NOOBS
- Una vez termina de copiarse, se inserta en la Raspberry Pi
- Se conecta el cable HDMI, teclado, ratón y cable de red
- Se conecta el cable de alimentación eléctrica y empezará a arrancar la Raspberry Pi

Realizados los pasos anteriores el usuario cuenta con lo básico para empezar a trabajar con Raspberry y crear diferentes proyectos. En este caso, se monta el proyecto del Nuevo biorreactor.



*Ilustración 44 Interfaz Raspbian
Fuente: Elaboración propia*

Cabe mencionar que Raspberry no es el único producto de esta naturaleza, hay más productos en el mercado que cumplen con ciertas características que tiene Raspberry, es decir, hay varias alternativas, de las cuales se analizaron detenidamente tanto en su eficiencia, calidad, economía y documentación disponible para su manejo. Algunas de ellas son:

Jaguar One

Su mayor atractivo es la compatibilidad con X86 y la posibilidad de **instalar Windows 8 o 10** en su versión completa. (Ticbeat, 2018)

- Procesador Intel Atom
- RAM 1GB
- Memoria interna 16 GB
- Conectividad 3 USB 1.4 y Ethernet
- Precio: 79 dólares al 2018

Orange Pi

Una de los clones más fieles a la Rpi es la **Orange Pi**, con bastantes variantes donde elegir, y con precio desde los 10 dólares, incluyendo **soporte 4K** desde la más básica. Admite Linux y Android, así como versiones listas para usar de distribuciones como Ubuntu, Raspbian o Android. (Ticbeat, 2018)

- Procesador ARM A7
- Memoria interna tarjeta de memoria
- Precio desde 10 dólares al 2018
- RAM 512 MB
- Conectividad 1 USB, HDMI y Ethernet

ODroid-C2

La gran competidora de la Raspberri Pi 3 lo es por precio pero sobre todo por prestaciones. Sólo no cuenta con conectividad Wifi de serie (algo que se soluciona con un adaptador), **esta ODroid C2 es más potente**, tiene más memoria RAM, puerto de infrarrojos y su salida HDMI permite sacar vídeo 4K a 60 Hz con soporte H.265. (Ticbeat, 2018)

- Procesador ARM 53 4X2Ghz
- Memoria interna Tarjeta de memoria o interna
- RAM 2GB
- Conectividad 4 USB 2.0, HDMI 2.0 y Ethernet
- Precio 40 dólares al 2018

Se tienen hasta ahora esas opciones. Sin embargo, se optó por utilizar Raspberry por el hecho que es la más conocida en el mercado, ya que existe mucha más documentación para comenzarla a usar por personas principiantes. Se tiene fácil acceso a foros donde se pueden despejar la mayoría de las dudas. En realidad, hay buena cantidad de información disponible que hace que aprender a usarla sea muy dinámico.

Pantalla LCD

Para poder visualizar la aplicación y su correcta manipulación, es necesario tener disponible una pantalla para poder conectarse conectarse a Raspberry pi con entrada VGA y HDMI. En este caso, no es necesario que se tenga una pantalla muy grande, así que con una de 15 in es suficiente.

5.3.3 Software

Para llevar a cabo el proceso de automatización fue necesario la implementación del motor a pasos que ya mencionó hace un momento. Se colocó sobre la plataforma de aluminio fabricada para el nuevo prototipo. El motor se encarga de girar el objeto en un total de 40 pasos al momento de bajar y 40 pasos al momento de subir la plataforma que contendrá los explantes.

Cabe mencionar que no es necesario que la plataforma de nylamind esté completamente arriba en el biorreactor, ya que aquí en este caso, lo único que nos interesa es que los explantes lleguen a sumergirse dentro del medio de cultivo, aunque el émbolo de nylamind no esté totalmente en la superficie del contenedor.

El driver del motor fue conectado a la placa arduino UNO, mandará la señal al microcontrolador para el correcto movimiento del motor y el giro del tornillo. Para ello se utilizaron los pines 2-9 para la conexión y control del motor la salida de 5V y GND de Arduino para la alimentación de su driver.

En realidad, el giro del motor es relativamente sencillo siguiendo la teoría que se presenta, lo importante es tener en cuenta los elementos necesarios para poder controlarlo. La placa arduino está conectada a la placa raspberry pi permanentemente, el código de movimiento se encuentra en el IDE de arduino, se graba en la memoria de la placa y todo se puede modificar desde el computador.

Se han trabajado varios elementos que en conjunto realizan todas las tareas necesarias para el control del SIT. Ya se mencionó que una parte de todo el trabajo se desarrolló en el IDE de Arduino, sin embargo, no es suficiente para las tareas que implícitamente se requieren para el control del SIT. La mayor parte del código se desarrolló en java en el IDE de Netbeans que permite llevar a cabo el manejo de los tiempos. Todo se realiza en tiempo real, lo cual es indispensable, ya que hay que recordar que las inmersiones dependen de un manejo de ello y por supuesto, el éxito de la micropropagación.

El flujo de procesos para llevar a cabo el control del SIT se presenta a continuación:

1. Inicia software
2. Inicia el ingreso de datos para la inmersión
 - a. Selecciona la fecha de inicio de inmersión
 - b. Ingresa la hora de inmersión
 - c. Ingresa el tiempo de inmersión
 - d. Ingresa el intervalo de inmersiones
3. Validar datos
4. Si los datos para la inmersión son erróneos se procede a la ejecución, sino, envía mensaje de error y se vuelven a ingresar los datos
5. Inicia ejecución de tareas programadas
 - a. Verifica fecha
 - b. Verifica hora
6. Baja plataforma en segundo 10
7. Verifica tiempo de inmersión
 - a. Inicia conteo de inmersión
8. Sube plataforma
9. Verifica total de inmersiones durante el día
10. Verifica total de inmersiones durante el mes

11. Realiza inmersiones calculadas
12. Termina proceso

Una vez terminado el proceso, termina el sistema y está listo para otra inmersión. A continuación se muestran los pasos a seguir mediante el siguiente diagrama de flujo.

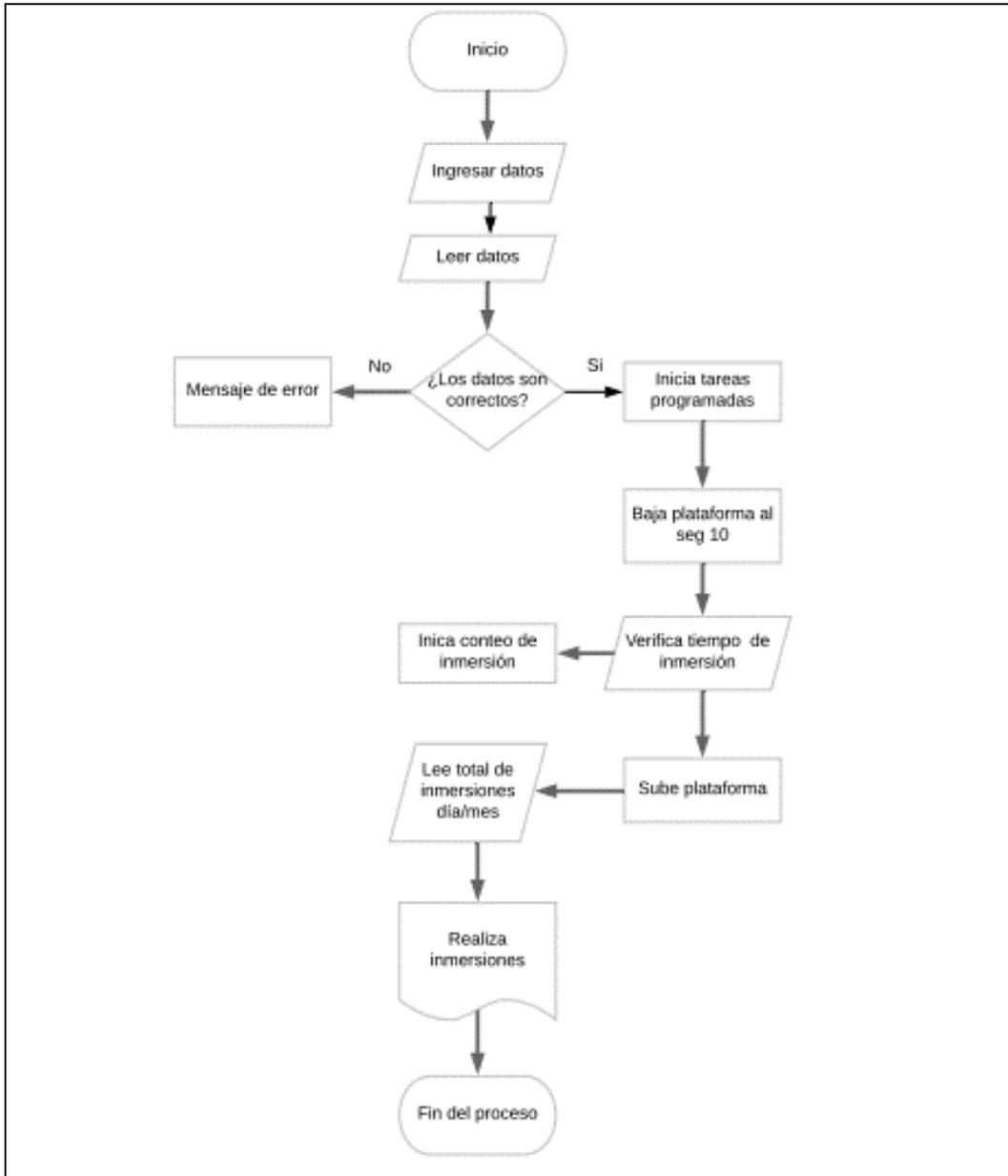
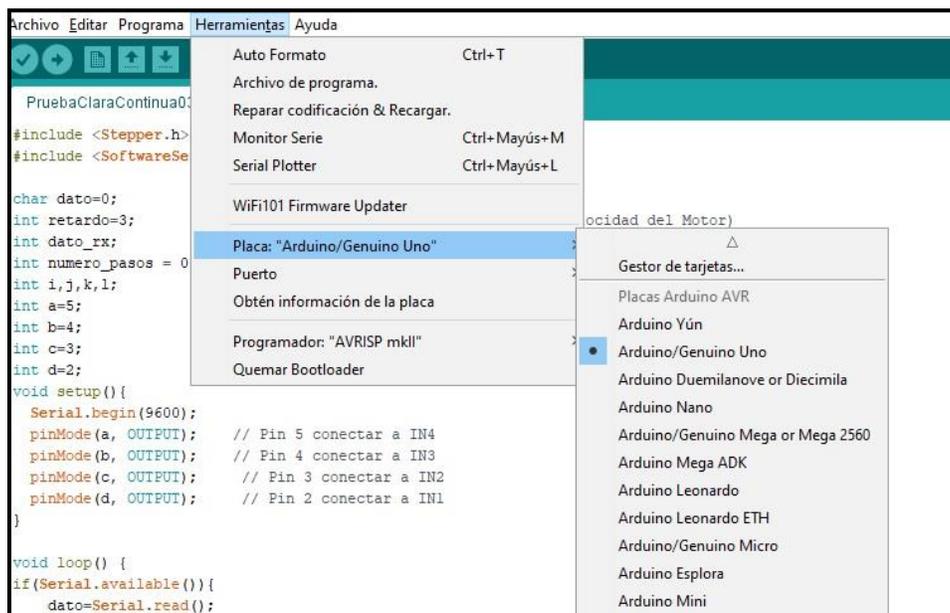


Diagrama 8 Diagrama de flujo
Fuente: Elaboración propia

A continuación se revisa la codificación de Arduino el cual su estructura consta de dos partes las cuales son la inclusión de las bibliotecas las cuales se usaron:

- SoftwareSerial.h: La cual permite la comunicación en serie en otros pines digitales de Arduino.
- Stepper.h: Permite controlar los motores paso a paso y la declaración de las variables y los métodos, todo ello se ejecuta con la función Setup() que es ejecutada una sola vez y se tiene la función pinMode el cual indica la entrada o salida de datos de un pin digital para iniciar la comunicación. Se tiene otra función loop() (Arduino, 2018) que indica que el código será ejecutado en un bucle hasta que se termine el programa, en este caso, el número de veces que girará el tornillo hasta que la plataforma llegue hasta el final del contenedor y viceversa hasta llegar a una cierta altura del nuevo biorreactor.

La interfaz principal de Arduino nos va a permitir cargar el código correctamente en la placa, para ello se debe configurar de acuerdo al tipo o modelo que estamos utilizando, ya que hay varios modelos que en realidad funcionan de la misma manera pero con diferentes capacidades. La forma de configurar la placa de muestra como se ve a continuación.



*Ilustración 45 Configuración de la placa Arduino
Fuente: Elaboración propia*

Se da clic en el menú herramientas y se selecciona la opción Placa la cual nos va a desplegar un menú donde vienen diferentes opciones y se selecciona la opción de la placa que se está utilizando, en este caso: Arduino/Genuino Uno.

También el puerto debe ser comprobado para una correcta conexión, normalmente el puerto de conexión más usado es el 4.

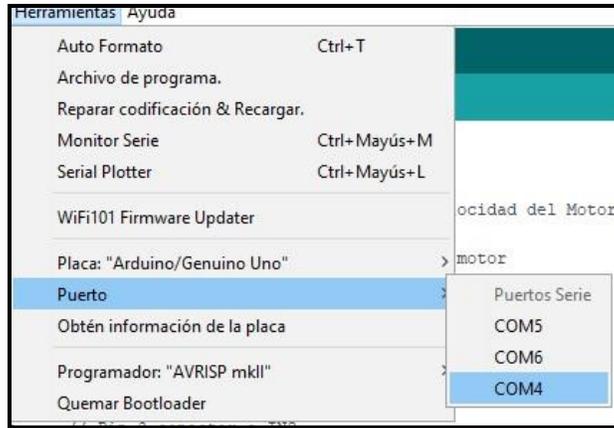


Ilustración 46 Configuración del puerto de Arduino
Fuente: Elaboración propia

Se selecciona el menú herramientas, inmediatamente después la opción Puerto, el cual despliega el menú Puerto serie y seleccionamos la opción COM 4, que es el número de puerto que le corresponde. Normalmente para saber qué puerto es el indicado, es el único que está en negritas como se pudo observar en la imagen anterior.

A continuación se presentan las variables que se utilizaron dando una breve descripción de cada una de ellas y verificar la función que tienen sobre el código.

```
char dato;
int retardo=3;           // Tiempo de retardo en milisegundos (Velocidad del Motor)
int dato_rx;            // valor recibido en grados
int numero_pasos = 0;   // Valor en grados donde se encuentra el motor
int i, j, a, b, c, d, k, l;
```

Ilustración 47 Variables principales a utilizar en Arduino
Fuente: Elaboración propia

Los datos mostrados en la imagen muestran:

- Se utilizó una variable tipo char que recibe el dato desde la computadora
- Una variable int para dar un retardo en milisegundos, en este caso son 3
- Una variable tipo int para recibir el valor en grados
- Una variable tipo int para verificar donde se encuentra el motor, igualmente en grados
- Las últimas variables de tipo int que representan cada uno de los polos, sobre los cuales debe llevarse a cabo la tarea para que se dé un paso a la izquierda o la derecha

```
pinMode(a, OUTPUT);    // Pin 5 conectar a IN4
pinMode(b, OUTPUT);    // Pin 4 conectar a IN3
pinMode(c, OUTPUT);    // Pin 3 conectar a IN2
pinMode(d, OUTPUT);    // Pin 2 conectar a IN1
```

Ilustración 48 Configuración de pines
Fuente: Elaboración propia

La imagen anterior muestra la configuración de los pines se muestra como sigue: Los pines 2 al 5 son los que serán conectados físicamente a la placa Arduino.

La función `loop()` es encargada de verificar que haya datos en espera de ser leídos desde la computadora, de ser así el dato es leído y almacenado en la variable "dato" y posteriormente los movimientos son llevados a cabo mediante por el método **void** el cual nos va a indicar el movimiento del tornillo, para cada caso es el encargado de repetir los métodos de los pasos a la izquierda, pasos a la derecha o apagado del motor y continua con una breve pausa de tres segundos que es usada para asegurarnos que la tensión es estable.

A continuación se presenta la imagen del código de Arduino ya completo, en donde las partes que lo componen ya se explicaron brevemente en las líneas anteriores y en la imagen se presenta la unión de todas las funciones, las cuales en conjunto logran la rotación del motor a pasos, tanto a la izquierda como a la derecha con sus respectivos tiempos de espera.

```

void paso_der(int a,int b,int c,int d){          // Pasos a la derecha
digitalWrite(d, LOW);
digitalWrite(c, LOW);
digitalWrite(b, HIGH);
digitalWrite(a, HIGH);
    delay(retardo);
digitalWrite(d, LOW);
digitalWrite(c, HIGH);
digitalWrite(b, HIGH);
digitalWrite(a, LOW);
    delay(retardo);
digitalWrite(d, HIGH);
digitalWrite(c, HIGH);
digitalWrite(b, LOW);
digitalWrite(a, LOW);
    delay(retardo);
digitalWrite(d, HIGH);
digitalWrite(c, LOW);
digitalWrite(b, LOW);
digitalWrite(a, HIGH);
    delay(retardo);
}

void paso_izq(int a,int b,int c,int d) {        // Pasos a la izquierda
digitalWrite(d, HIGH);
digitalWrite(c, HIGH);
digitalWrite(b, LOW);
digitalWrite(a, LOW);
    delay(retardo);

digitalWrite(d, LOW);
digitalWrite(c, HIGH);
digitalWrite(b, HIGH);
digitalWrite(a, LOW);
    delay(retardo);
digitalWrite(d, LOW);
digitalWrite(c, LOW);
digitalWrite(b, HIGH);
digitalWrite(a, HIGH);
    delay(retardo);
digitalWrite(d, HIGH);
digitalWrite(c, LOW);
digitalWrite(b, LOW);
digitalWrite(a, HIGH);
    delay(retardo);
}

void apagado(int a,int b,int c,int d) {        // Apagado del Motor
digitalWrite(d, LOW);
digitalWrite(c, LOW);
digitalWrite(b, LOW);
digitalWrite(a, LOW);
}

```

*Ilustración 49 Código Arduino
Fuente: Elaboración propia*

5.3.3.1 Arduino

Arduino es una plataforma electrónica de código abierto basada en hardware y software fáciles de usar. Las placas Arduino pueden leer entradas (luz en un sensor, un dedo en un botón o un mensaje de Twitter) y convertirla en una salida: activar un motor, encender un LED y publicar algo en línea. Puede decirle a su tarjeta qué debe hacer enviando un conjunto de instrucciones al microcontrolador en la tarjeta. Para hacerlo, utiliza el lenguaje de programación Arduino(basado en Wiring) y el software Arduino (IDE) , basado en el procesamiento.

A lo largo de los años, Arduino ha sido el cerebro de miles de proyectos, desde objetos cotidianos hasta instrumentos científicos complejos. Una comunidad mundial de creadores (estudiantes, aficionados, artistas, programadores y profesionales) se ha reunido en torno a esta plataforma de código abierto, sus contribuciones han sumado una cantidad increíble de conocimientos accesibles que pueden ser de gran ayuda para los principiantes y expertos por igual.

Arduino nació en el Instituto de Diseño de Interacción Ivrea como una herramienta fácil para la creación rápida de prototipos, dirigida a estudiantes sin experiencia en electrónica y programación. Todas las placas Arduino son completamente de código abierto, lo que permite a los usuarios construirlas de forma independiente y, eventualmente, adaptarlas a sus necesidades particulares. (Arduino, s.f.)

5.3.3.2 Java

Java es un lenguaje de programación de alto nivel orientado a objetos. Fue desarrollado por la empresa Sun Microsystems a principios de los 90's, y presentado oficialmente en Mayo de 1995 en la conferencia Sun World. Recientemente en 2010, Sun Microsystems fue adquirida por Oracle Corporation.

Java se pensó como una tecnología que permitiese el desarrollo de programas capaces de ejecutarse en entornos distribuidos y heterogéneos, es decir, programas ejecutables en un amplio abanico de plataformas de hardware y software, principalmente dispositivos electrónicos embebidos. La idea principal fue el desarrollo de un sistema operativo portable de pocos recursos, en tiempo real y distribuido, pero finalmente se obtuvo un lenguaje de programación. (Garrido Abenza, 2015)

Entre las características que tiene son:

- Familiar: Es muy similar al lenguaje C o C++, por lo que se facilita la migración de aquellos desarrolladores ya familiarizados con dichos lenguajes.
- Multiplataforma: La portabilidad de los programas Java se consigue dado que este es un lenguaje interpretado, aunque también compilado para mejorar el rendimiento de la interpretación.

- Alto Rendimiento: Los programas Java no son tan rápidos como los desarrollados con lenguajes que se compilan de forma nativa para una plataforma concreta ya que son interpretados durante su ejecución.
- Robusto: Durante la compilación de un programa java se comprueba la sintaxis y ciertas situaciones que con otros lenguajes compilados no se comprobarían, pudiendo dar lugar a resultados inesperados.
- Distribuido: Java dispone de una librería de clases que permiten la comunicación entre programas ejecutados en ordenadores remotos conectados en red (distribuidos), en un entorno heterogéneo y de forma segura, esto es, evitando la intrusión de otros programas.
- Concurrente: Java permite el desarrollo de programas concurrentes o multi-hilo para conseguir un mejor rendimiento y aprovechar el procesador cuando sea necesario realizar varias tareas al mismo tiempo.

5.3.3.3 Control de tiempos

El proceso de control de tiempos y fechas se da gracias a las librerías de NetBeans que nos permiten lanzar tareas programadas sin necesidad de realizar cálculos que llevarían más líneas de código, además de ser precisas al momento de ejecutar las tareas programadas.

Esto se llevó a cabo gracias a la librería Quartz, que es un framework open source, con licencia Apache 2.0 para la planificación y gestión de tareas, la cual tiene funciones variadas, y sólo se ocuparon unas cuantas, de mucha utilidad para las tareas que se contemplan a lanzar. (Adictos al trabajo, 2018)

Sus características principales son:

- Válido para aplicaciones tanto J2EE como J2SE.
- Planificación flexible de tareas
- Mantenimiento del estado de las tareas incluso en caso de fallos y reinicios de máquinas.
- Posibilidad de participar en transacciones JTA.
- Posibilidad de trabajar en modo Clúster.
- Proporciona un completo API, con muchas clases de utilidad y muchos tipos Listener (JobListener, TriggerListener y SchedulerListener).

Quartz se basa en tres conceptos:

- Job : Tarea que se desea ejecutar
- Trigger : Disparador que le indica la forma en la que se ejecutará el job
- Scheduler : Responsable de ejecutar las tareas mediante su configuración en los trigger.

Diferencias los tipos de trigger que hay:

- SimpleTrigger : Disparador que se utiliza para ejecutar tareas en una fecha determinada, una hora, un nº de repeticiones o bien un intervalor entre repeticiones. (Quartz.sheduler, 2018)
- CronTrigger : Disparador más utilizado ya que permite realizar expresiones para referirnos a instantes o periodos de tiempo más complejos (Quartz.sheduler, 2018)

Sus principales interfaces y funciones que se ocuparon durante el proyecto son:

org.quartz.Job. En caso de error, Quartz reintenta la ejecución de una tarea al implementar un método y lanzar una excepción.

org.quartz.JobDetail. Es una clase que almacena propiedades de una determinada tarea.

Gracias a esta clasificación podemos pausar, iniciar, detener, etc. tareas o grupos de tareas de manera independiente al resto.

org.quartz.Trigger. Es una clase abstracta que define los instantes en que la tarea debe ser ejecutada.

org.quartz.SimpleTrigger. Permite especificar ejecuciones de tareas teniendo en cuenta los siguientes parámetros: fecha, hora, nº de repeticiones e intervalo entre repeticiones

org.quartz.CronTrigger. Es el más utilizado, pues permite especificar mediante expresiones más complejas los instantes en los que deben ejecutarse las tareas.

org.quartz.Scheduler. Su funcionalidad es almacenar y planificar las tareas (Job) en base a los Triggers, recuperar tareas fallidas, realizar reintentos y gestionar el estado del sistema de planificación.

Para poder utilizar las funciones correctamente tenemos las expresiones Cron. Las expresiones CRON son una cadena de texto compuesta por 6 o 7 campos separados por espacios en blanco. Los campos tienen un orden concreto a la hora de indicar a que nos estamos refiriendo:

“Segundos” “Minutos” “Horas” “Día del mes” “Mes” “Día de la semana” “Año”

Los campos pueden contener valores permitidos sobre los que se aplican diferentes combinaciones de caracteres especiales con el objetivo de dotarles de nuevas características. Los campos pueden contener alguno de los valores permitidos que e indicarán en la siguiente tabla:

Campo	Obligatorio	Valores permitidos	Caracteres especiales
Segundos	Si	0-59	, - * /
Minutos	Si	0-59	, - * /
Horas	Si	0-23	, - * /
Días mes	Si	1-31	, - * ? / L W
Mes	Si	1-12 o JAN-DEC	, - * /
Día de la semana	Si	1-7 o SUN-SAT	, - * ? / L #
Año	No	Vacío-1970-2099	, - * /

*Ilustración 50 Descripción de expresiones CRON
Fuente: (Adictos al trabajo, 2018)*

En la tabla anterior se describen las expresiones CRON. Contiene los campos de tiempo que van desde segundos hasta años, nos indica si es obligatorio colocarlo en la expresión que se quiere insertar y los caracteres con que se va a expresar, los cuales se describen a continuación.

Los caracteres que se mostraron el cuadro anterior tienen una función específica que sirve para poder dar el formato correcto a las expresiones CRON.

*****: Selecciona todos los valores de un campo (por ejemplo cada hora, cada minuto)

?: Selecciona sin un valor específico cuando se puede utilizar (es similar a decir cualquiera)

–: Selecciona rango de valores (por ejemplo 4-6 que es de 4 a 6)

,: Selecciona valores específicos (por ejemplo MON, WED, FRI es decir los lunes, miércoles y viernes)

/: Selecciona incrementos a partir del primer valor (por ejemplo 0/15 que es cada 15 minutos comenzando desde el minuto 0 -> 15, 30, 45)

L (Día del mes): Selecciona el último día del mes

L (Día de la semana): Selecciona el último día de la semana (7 / sábado / SAT)

XL (Día de la semana): Selecciona el último día de ese tipo del mes (por ejemplo 6L -> el último viernes del mes)

W: Selecciona el día de la semana (de lunes a viernes) más cercano al día (día laborable)

LW: Selecciona el último día laborable del mes

#: Selecciona la posición de un día del mes (por ejemplo 6#3 -> el tercer viernes del mes)

El proceso de control de tiempos inicia por medio de las siguientes líneas de código, el cual se muestra sencillo pero realiza las acciones que se requieren.

Los campos principales son los datos a ingresar como fecha de inicio y hora de inicio, cuando el investigador biológico programa una nueva inmersión, se le llamara tarea programada, el sistema verificará que los datos sean lógicos, es decir, que no se ingresen datos que no correspondan a la hora que se tiene en el sistema de la computadora. Por ejemplo:

- No se puede ingresar una fecha anterior a la que se está presentando
- Para el inicio de la inmersión no se puede ingresar una hora anterior

Si el usuario o investigador ingresara datos erróneos, el sistema marcará error en automático. Para poder manejarlos, se comienza a trabajar en el IDE de Netbeans que es donde se realizarán todas las funciones de control de tiempos para el correcto movimiento del motor.

Como se muestra en la siguiente imagen primero:

1. Se mandan a llamar los valores para mostrar en el formato que se dese y reconstruirlos en una cadena de texto

```
String js1 = jSpinner1.getValue().toString();
Date dl = new Date();
DateFormat hourFormat = new SimpleDateFormat("HH:mm:ss");
SimpleDateFormat sdf = new SimpleDateFormat("yyyy-MM-dd");

Date hh1, hh2;
String hT, spT, ddl, jC;
int bandera = 1;
hT = hourFormat.format(dl).toString();
spT = hourFormat.format(jSpinner1.getValue()).toString();
```

*Ilustración 51 Construcción de valores
Fuente: Elaboración propia*

2. El siguiente código nos ayuda a la obtención de datos del jcalendar

```
String año = Integer.toString(btnFecha.getCalendar().get(java.util.Calendar.YEAR));
String mes = Integer.toString(btnFecha.getCalendar().get(java.util.Calendar.MONTH) + 1);
String dia = Integer.toString(btnFecha.getCalendar().get(java.util.Calendar.DATE));

if (Integer.parseInt(mes) > 9) {
    jC = año + "-" + mes + "-" + dia;
} else {
    jC = año + "-0" + mes + "-" + dia;
}
```

*Ilustración 52 Obtención de datos
Fuente: Elaboración propia*

3. Con el siguiente código se revisa que no haya errores de los datos ingresados

```
if (date4.compareTo(date3) == -1) {
    JOptionPane.showMessageDialog(null, "Fecha incorrecta");
    bandera = -1;
}

if (date4.compareTo(date3) == 0 && spT.compareTo(hT) == -1) {
    JOptionPane.showMessageDialog(null, "hora incorrecta");
    bandera = -1;
}
```

*Ilustración 53 Revisión de errores
Fuente: Elaboración propia*

4. El siguiente código ayudará a que se agreguen los datos de Hora de inmersión, tiempo de inmersión e intervalo de inmersiones a la tabla para poder visualizarlos.

```
DefaultTableModel modelo = (DefaultTableModel) Tabla1.getModel();
if (bandera == 1) {
    modelo.addRow(new Object[]{jC, spT, jSpinner2.getValue(), jSpinner3.getValue()});
    btnAgregar.setEnabled(false);
}
```

*Ilustración 54 Ingreso de datos
Fuente: Elaboración propia*

Java cuenta con las librerías necesarias que pueden ser cargadas al IDE con la finalidad de integrar nuevas funciones a los programas que se están codificando en este lenguaje, para este caso se utilizó la librería PanamaHitek_Arduino (García González, Moreno, Mendieta, & Arosemena, 2012) la cual está diseñada para simplificar la conexión de una aplicación de Java a la Plataforma de Arduino mediante los drivers para Windows rxtxSerial.dll. Estos drivers se encargan de establecer un medio de comunicación serial vía puerto USB entre la computadora y el puerto de alimentación Arduino.

La imagen siguiente muestra cómo crear la librería para poder realizar la conexión. Se da clic derecho sobre el folder de Bibliotecas que se encuentra en el panel lateral izquierdo de la interfaz dentro de la pestaña Projects seleccionamos la opción libraries y la opción Add library y create.

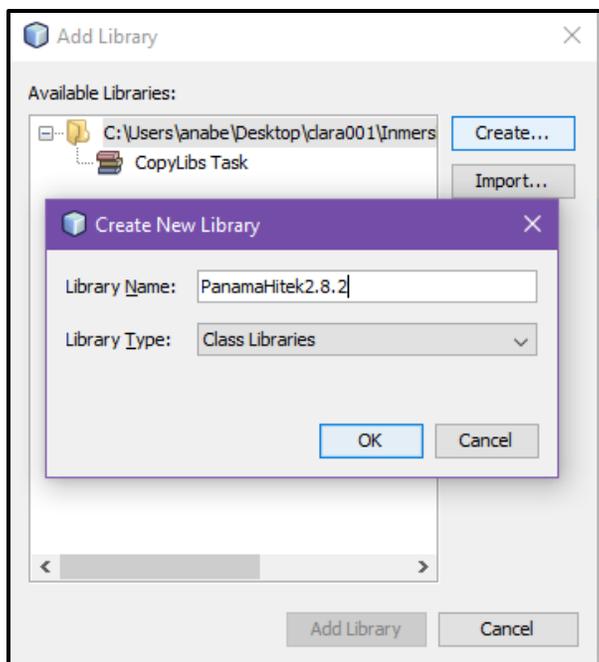


Ilustración 55 Agregando una nueva librería
Fuente: Elaboración propia

La conexión con Arduino se realiza creando un objeto dentro de la clase principal y proporcionándole los parámetros como son el identificador del puerto y el valor de baudios que es la unidad de medida de la velocidad de transmisión de señales que se expresa en símbolos por segundo y el más comúnmente utilizado es 9600. Con el método `arduinoTX()`, este método se utiliza para iniciar la conexión con Arduino en la modalidad de transmisión de datos que se puede visualizar en la siguiente imagen.

```
PanamaHitek_Arduino Arduino = new PanamaHitek_Arduino();
public Principal() throws ArduinoException, ParseException {
    Arduino.arduinoTX("COM4", 9600);
}
```

Ilustración 56 Código de conexión Arduino-java
Fuente: Elaboración propia

5.3.4 Interfaz

Para la interfaz se desarrolló algo sencillo que pueda ser muy intuitivo para el usuario o para el investigador biológico. Se cuenta con sólo una pantalla que es dónde se va a realizar todo el

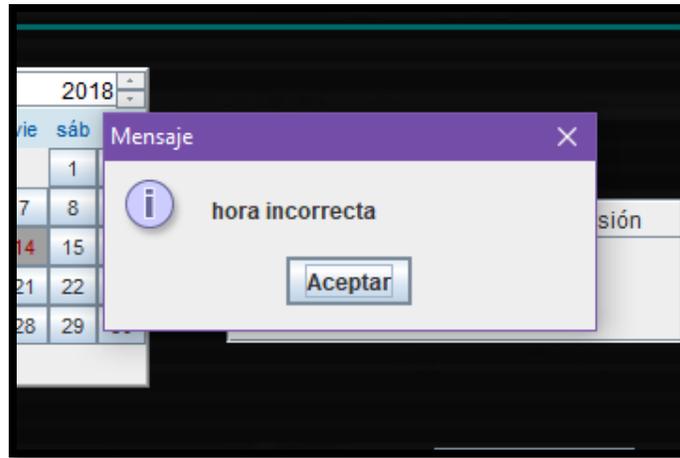
procedimiento, el único trabajo del usuario es ingresar los datos e iniciar el sistema. El sistema se ejecutará automáticamente para realizar todas las tareas programadas.



*Ilustración 57 Interfaz de usuario
Fuente: Elaboración propia*

Se puede observar que en este caso los datos han sido ingresados correctamente, al momento de presionar el botón Agregar se realiza una validación de datos y si son correctos se insertan automáticamente en la tabla que se visualiza del lado derecho, de igual manera, el sistema se ejecuta de inmediato al verificar que los campos de fecha y hora ya hayan sido cumplidos.

Si los datos ingresados por el usuario son incorrectos, manda el siguiente mensaje de error:



*Ilustración 58 Muestra de mensaje de error
Fuente: Elaboración propia*

Detener: El usuario puede detener el sistema en cualquier momento que lo prefiera
Borrar datos: Los datos acumulados pueden ser borrados igualmente por el usuario

Capítulo 6 CONCLUSIONES

6.1 Discusión general

Se probaron parcialmente los dos prototipos que se desarrollaron para el nuevo biorreactor. Con respecto al primer biorreactor, como se ha recalado en las páginas anteriores, no fue el mejor prototipo que se obtuvo, sin embargo; por su alta capacidad para almacenar medio de cultivo y el hecho de poder micropropagar mayor cantidad de material vegetal, se tiene la posibilidad de realizar las mejoras necesarias para poder colocarlo en marcha y realizar las pruebas correctas.

No se desea prescindir completamente de este prototipo ya que en las pruebas preliminares que se realizaron se pudo observar que la mayoría de los elementos utilizados en este primer diseño fueron de gran utilidad y algunos de los principios básicos de la micropagación como es el bajo coste y su capacidad fueron cumplidas, en el cual se pueden realizar mejoras para que en un futuro. Se quisieron utilizar materiales que fueran de fácil adquisición tanto en lo económico como en la forma de manipularlo, lo cual al momento de ensamblar todas las piezas ya no encajaban correctamente y eso hizo que continuar con el trabajo se tuviera mayor esfuerzo. Este prototipo en realidad nos muestra un camino amplio para seguir investigando, se han detectado las áreas de oportunidad específicas con las cuales se hace viable que pueda ser una alternativa para la micro propagación masiva de especies, con todas las pruebas de manejo, manipulación y costes, se demostró que este primer intento se necesitó una mayor visualización del trabajo terminado.

Todo ello conllevó a que el siguiente prototipo se basara en un diseño similar al del biorreactor tipo RITA pero con una capacidad mayor, diferentes compuestos y de igual manera asequible.

En cuanto al segundo prototipo se observaron cambios significativos con respecto al primero, las pruebas preliminares muestran una mejoría notable en primer lugar en cuanto al diseño, en este caso, se tuvo la oportunidad de analizar correctamente los requerimientos que se habían recabado con anticipación, ahora no sólo era el hecho de tener un diseño que fuera de fácil adquisición para el personal sino que también se verificó que realmente cumpliera con la función para lo cual estaba previsto, es por ello que antes de comenzar con el desarrollo y una vez que se tuviera el diseño de lo que realmente se deseaba construir, la obtención y selección de los materiales jugaron un papel importante en todo ello, se verificó antes que cumplieran con las

especificaciones para que al momento de la conjunción de cada una de las piezas su manipulación fuera adecuada con un poco de grado de dificultad sin obstruir su funcionalidad.

Todos los materiales fueron debidamente probados y comprobados para este desarrollo, con lo cual se ha garantizado que puedan cumplir con las especificaciones.

En cuanto al desarrollo de un nuevo software fue útil en la medida que se cumplió con otro punto: que se pueda manejar por cualquier personal, aunque eso sólo va a ser permitido por personal autorizado.

La pruebas previas demostraron en cuanto a las inmersiones, tiempos y desempeño del prototipo fueron positivas, además que este nuevo prototipo tiene la capacidad de almacenar de micropropagar más plántulas, aunque cabe recalcar que menor al prototipo anterior, sin embargo; con un mejor desempeño. Se percató de igual manera que el acople del software con el hardware se realizó eficientemente, aunque cabe recalcar que aún se tienen áreas de oportunidad a seguir si lo que se quiere es ampliar la magnitud del proyecto y por su puesto su efectividad, como el manejo del biorreactor remotamente por ejemplo.

En cuanto a los presupuestos cabe mencionar que en efecto se cumplió con el propósito de disminución de costos tanto en el primer prototipo como en el segundo, cabe mencionar que los costes de insumos de producción es distinto a los costos de su manejo, es decir; equipo de computación y equipo extra que se requiera.

		Prototipo N. 1	Prototipo N. 2	RITA
Envase		\$664	\$1,307	\$1,368.91
Capacidad		6 L	2.6 L	1 L
Capacidad de producción (números de plántulas)		N/A	208	80
Otros insumos necesarios	Equipo de cómputo	n/a	\$ 2,508	\$5,000
	Bomba de vacío	\$2,041	n/a	\$2,041
	Gastos de envío	n/a	n/a	\$1,500
Total		= \$2,705	= \$3,815	\$9,909.41

*Tabla 16 Tabla comparativa insumos de producción generales
Fuente: Elaboración propia*

En la tabla se observan las diferencias que se tienen el modelo tipo RITA con respecto al Prototipo N. 2. Como se puede observar respecto a los costos de insumos de producción el prototipo N. 2 es más económico que el tipo RITA por \$6,156.41 pesos lo que equivale a 62.12%, respecto a volumen disponible para la micropopagación, el prototipo N. 2 tiene 1.6 litros extra de capacidad, respecto al modelo tipo RITA que equivale a 160% más de su capacidad, lo que en términos biológicos representa la capacidad para aumentar la cantidad de explantes.

En el modelo tipo RITA por cada 10 explantes micropropagados se obtienen en un mes 80 plántulas, por lo que en el Prototipo N. 2 se espera que se obtenga alrededor 128 plántulas como mínimo y podría obtenerse hasta 208 en las mejores condiciones.

Entonces, como conclusión final se deduce que el Prototipo N. 2 sí cumple con los objetivos especificados.

6.2 Trabajos futuros

Aunque el segundo prototipo fue el que dio mejores resultados, no se descarta la idea como anteriormente se ha dicho, de trabajar con el primero, continuando con las investigaciones para conocer nuevos materiales que se adapten al mismo y mejores por lo tanto en su eficiencia.

En cuanto al segundo prototipo es posible mejorar en los siguientes aspectos:

Software:

- Permitir monitoreo del biorreactor de forma remota
- Diseñar base de datos para gestionar de forma eficiente consultas sobre inmersiones, producción.
- Agregar un módulo de gestión de datos estadísticas sobre el crecimiento y reproducción de material vegetal.
- Agregar un módulo de gestión de reportes

Diseño:

- Explorar opciones que mejoren el manejo de los componentes (algunos materiales son delicados)
- Introducción del control de la luminosidad para explorar los efectos que esta tiene en la micropropagación
- Introducir el control de gases como el CO_2 para mejorar el efecto fotosintético

Interfaz:

- Modificar la interfaz para gestionar la nueva funcionalidad del dispositivo
- Mejorar la usabilidad del software en ayuda del biólogo investigador

REFERENCIAS

- (s.f.). Recuperado el 2018, de CIRAD: <https://www.cirad.fr>
- ABC Tecnología.* (2018). Obtenido de <https://www.abc.es/tecnologia/>
- Ackermann, D., Bruschi, A., Sonntag, K., & Sellner, M. (2003). Using the temporary immersion technique for in vitro culturing of renewable resources plants. *Agricultural techniques and technologies on the light agenda.*
- Adictos al trabajo.* (2018). Obtenido de <https://www.adictosaltrabajo.com/2010/02/22/expresiones-cron/>
- Albarrán, J., Salazar, E., Trujillo, I., Vegas, A., González, A., Díaz, A., . . . Silva, A. (2014). Biorreactores de inmersión temporal para la propagación masiva de plantas. *INIA Divulga Revista de difusión de tecnología agrícola, pecuaria, pesquera y acuícola*, 60.
- Alica.* (2019). Obtenido de <http://www.plasticosalica.com/>
- Arduino.* (s.f.). Recuperado el 2019, de <https://www.arduino.cc/en/Guide/Introduction>
- Arduino.* (2018). Obtenido de www.arduino.cc
- Avalos, A., Haza, A., Mateo, D., & Morales, P. (2013). NANOPARTÍCULAS DE PLATA: APLICACIONES Y RIESGOS TÓXICOS PARA. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias.*
- Campos Figueroa, M., & Llanderal Cazáres, C. (2003). Producción de Grana Cochinilla *Dactylopius coccus* (Homoptera: Dactylopiidae) en invernadero. 8.
- Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. *INIA Divulga. Revista de difusión de tecnología agrícola, pecuaria, pesquera y acuícola*, 8. Recuperado el 2018
- Castro, D., & González Olmedo, J. (2002). Micropropagación de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) en el sistema de inmersión temporal. *Agricultura Técnica.*
- Castro, U., Flores, M., García, J., & Alvarez, S. (2016). Esterilización con nanotecnología en Odontología. *Odontología Vital.*
- Cubasa.* (2019). Obtenido de <https://cubasa.net>
- Damiano, C., Gentile, A., La Starza, S., Fratalleri, A., & Monticelli, S. (2003). Automation in micropropagation through temporary immersion techniques. *Acta Horticulturae.*

- De máquinas y herramientas.* (2018). Obtenido de <https://www.demaquinasyherramientas.com/mecanizado/introduccion-a-la-tecnologia-cnc>
- Dix, A., Finlay, J., Abowd, G. D., & Beale, R. (2004). *Human - Computer Interaction* (Third Edition ed.). London: Pearson Education Limited.
- Envasur.* (2019). Obtenido de <http://www.ensur.com>
- Escalona, M., González Olmedo, J., Lorenzo Feijoo, J., & Desjardins, Y. (1999). Pineapple (Ananas comosus L. Merr) microtopagation in temporary immersion systems. 7.
- Escobar, R., Muñoz, L., Montoya, J., Tohme, J., & Roca, W. (s.f.). Implementación del sistema RITA en la propagación a gran escala y en la embriogénesis somática de yuca. *Centro Internacional de Agricultura Tropical*, 1.
- Etienne, H., & Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 16.
- Etienne, H., Lartuad, M., Michaux, F., Carron, M., Berthouly, M., & Teison, C. (1997). Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.) using the temporary immersion technique. *In Vitro Cellular Developmental Biology*, 8.
- Fry, B., & Reas, C. (2017). *Processing*. Obtenido de <https://processing.org>
- Fundación para la Innovación Agraria. Ministerio de Agricultura. (2009). Resultados y lecciones en Sistema de Inmersión Temporal. Proyecto de Innovación en regiones Metropolitana, del Maule, del Biobío y de los Ríos. *Fundación para la innovación agraria*, 56.
- García González, A., Moreno, M., Mendieta, R., & Arosemena, J. (2012). *Prototipo grúa pórtico*. Universidad Tecnológica de Panamá.
- Garrido Abenza, P. (2015). *Comenzando a programar con Java*. Universitat.
- George, E. (1993). Plant propagation by tissue culture: The technology. *Somerset: Exegetics*.
- Ingeniería Mecafenix.* (2018). Obtenido de <http://www.ingmecafenix.com/electricidad-industrial/motor-paso-a-paso/>
- Jones Castro, F., & Flores Mora, D. (2007). Establecimiento in vitro y pruebas preliminares de micropropagación en medio semisólido y líquido de frambuesa (*Rubus idaeus* L.). *Tecnología en marcha*, 9.
- Lorenzo, J., González, B., Escalona, M., Teisson, C., Espinosa, P., & Borroto, C. (1998). Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant cell, Tissue and Organ culture*.
- Lores, J., Granollers, T., & Lana, S. (2002). *Introducción a la interacción persona - ordenador*. Universidad de Lleida.

- Lugo Espinosa, O., Arellano Ostoa, G., & Hernández Cote, D. (2017). Automatización de un sistema de inmersión temporal con base en plataformas abiertas de hardware y software. *Terra Latinoamericana*, 9.
- Maldonado, E., De Francisco, L., & Gómez, O. (s.f.). Diseño y construcción de un sistema de inmersión temporal. *Centro Agrícola*, 2003.
- Mallón, R., Covelo, P., & Veitez, A. (2011). Improving secondary embryogenesis in *Quercus robur*: application of temporary immersion for mass propagation. *Arboles*.
- Martínez - Freire, P. F. (2012). Cerebro Humano y Conocimiento. *Uciencia No. 09. Los secretos del cerebro*, 32 - 33. Recuperado el febrero de 2018
- MATIS R. (2019). Obtenido de <http://www.bioreactor-matis.com/es/presentacion/>
- Morales, O. A. (2003). *Fundamentos de la Investigación Documental y la Monografía*. Mérida, Venezuela: Universidad de Los Andes, Venezuela.
- Negroponte, N. (1995). *Being Digital*. Barcelona (España) : © Ediciones B, S.A.
- Oviedo Pereira, D., Sepúlveda Jiménez , G., Evangelista Lozano, S., & Rodríguez Monroy, M. (Enero de 2015). Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni, un cultivo promisorio para México. *ReseachGate*, 27.
- Pérez, A., Berreteaga, O., Ruíz de Olano, A., Urkidi, A., & Pérez, J. (2006). Una metodología para el desarrollo de hardware y software embebidos en sistemas críticos de seguridad. 6.
- Pino, A., Jova, M., Kosky, R., Torres, J., & García, Y. (2011). Multiplicación en sistema de inmersión temporal del clon de malanga “Viequera”(Xanthosoma spp.). *Revista Colombiana de Biotecnología*.
- Pisa Farmacéutica. (s.f.). Obtenido de http://www.pisa.com.mx/publicidad/portal/enfermeria/manual/4_6_5.htm
- Quartz.scheduler. (2018). Obtenido de <http://www.quartz-scheduler.org/documentation>
- Ramírez-Gama, R., Luna Millán, B., Velásquez Madrazo, O., & Vierna García, L. (2006). Manual de Prácticas de Microbiología General.
- Rodríguez , M., & Santana, L. (2015). Modelado de un sistema experto orientado al cuidado de cultivos de lechuga en un ambiente controlado tipo invernadero. . *Revista digital TIA*, 8.
- Ruíz-Leza, H., Rodríguez-Jasso, R., Rodríguez-Herrera, R., Contreras-Ezquivel, J., & Aguilar, C. (2007). Diseño de biorreactores para la fermentación en medio sólido. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* , 6, 8.
- Ticbeat. (2018). Obtenido de <https://www.ticbeat.com>
- Universidad de Granada. (2017). Obtenido de <https://www.ugr.es/>

Ziv, M. (1995). The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture.
Acta Horticulturae.

Anexo A: COMPARATIVA DE COSTES RITA, PROTOTIPO N. 1 Y PROTOTIPO N. 2

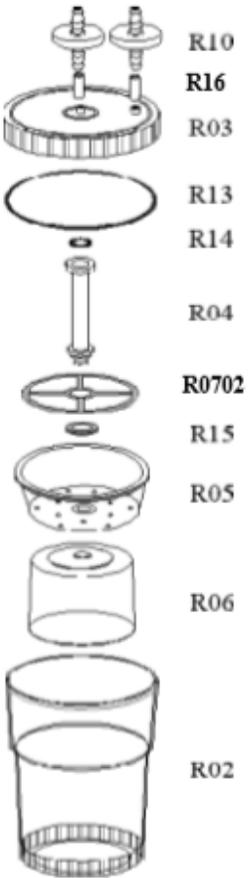
A continuación se muestra una tabla comparativa de los precios del primer y segundo prototipo con respecto al ya conocido RITA.

Concepto	Monto	Concepto	Monto
Prototipo 1		Prototipo 2	
Contenedor	\$87	Contenedor	\$45
Coladera de plástico	\$15	Arduino UNO	\$150
Silicón	\$12	Tornillo CNC	\$270
Vidrio	\$250	Fuente de poder 12V	\$220
Pegamento industrial	\$300	Cable H-M 20 cm	\$42
Materiales varios: taladro, agujas, etc, ya disponibles		Driver p/motor a pasos	\$360
Manguera color ámbar silicona (ya disponible en ColPos)	\$ 15 mt.	Motor a pasos unipolar	\$90
Manguera transparente silicona (ya disponible en ColPos)	\$ 4,000 mt.	Fuente de poder para driver	\$80
Bomba de vacío (Ya disponible en ColPos)	\$ 2,041 mt.	Tuerca de cobre	\$92
Total de inversión:	\$664	Raspberry pi (para manejo de aplicación)	\$1369
		Pantalla LCD 15 in	\$1,139
		Total de construcción:	\$ 1,307
		Total General:	\$3,815

Tabla 17 Comparativa de precios Prototipo N. 1 y Prototipo N. 2
Fuente: Elaboración propia

Como se puede observar en la tabla anterior, los precios respecto al prototipo N. 1 y N. 2 son muy variados, pero hay que recordar que muchos de los materiales que se utilizaron en el prototipo n. 1 ya se tenían disponibles en el laboratorio y si difieren mucho del prototipo N. 2, pero como se ha mencionado en puntos anteriores, los dichos materiales aunque con el precio más elevado se ha justificado debido a su eficiencia.

En la tabla siguiente se muestra un ejemplo del valor del Sistema tipo Rita, como se puede observar, el biorreactor consta de diferentes partes las cuales cada una se puede adquirir por separado o todo en un conjunto. Se identifica el nombre de cada pieza, descripción y el presupuesto de acuerdo al número de piezas que se desea adquirir.



Full apparatus			1 to 5	6 to 19	From 20
Designation	Ref.	Description	Prices FOB (euro)		
	R01B	Complete apparatus equipped with 2 air vents and 1 netting. Autoclavable (1) polysulfone. Dimensions : height 150 mm, diameter 130mm. Volume : 1 litre. Weight : 350g	63,35	60,43	57,50
<i>Discount relative to a 1 unit sale</i>				5%	10%

Spare parts			1 to 5	6 to 19	From 20
Designation	Ref.	Description	Prices FOB (euro)		
Air vent	R10	Autoclavable (1) 10 times. Height 50/Diam. 50mm	2,44	2,44	2,44
Vent tubes	R16	Autoclavable (1) 10 times. Height 4 cm	0,50	0,48	0,45
Cap	R03	Autoclavable (1) 10 times. Height 20/Diam. 130mm	11,16	10,60	10,05
Cap O Ring	R13	Autoclavable (1) 10 times. Height 3/Diam. 110mm	3,36	3,19	3,02
Central Tube O Ring	R14	Autoclavable (1) 10 times. Height 2/Diam. 17mm	0,77	0,73	0,69
Central tube	R04	Autoclavable (1) 10 times. Height 80/Diam. 22mm	2,85	2,71	2,57
Netting	R0702	Autoclavable (1) 10 times. Height 10/Diam. 90mm. Replace former R11+R7	5,42	5,14	4,87
Washer	R15	Autoclavable (1) 10 times. Height 2/Diam. 19mm	1,38	1,31	1,24
Basket	R05	Autoclavable (1) 10 times. Height 30/Diam. 105mm	6,41	6,09	5,77
Bell	R06	Autoclavable (1) 10 times. Height 60/Diam. 80mm	7,89	7,49	7,10
Vessel	R02	Autoclavable (1) 10 times. Height 150/Diam. 130mm	19,24	18,28	17,31
<i>Discount relative to a 1 unit sale (except R10)</i>				5%	10%

Tabla 18 Lista de precios biorreactor tipo RITA
Fuente: (CIRAD, s.f.)

Anexo B: ACUSE ARTÍCULO CIENTÍFICO

Revista Iberoamericana de
las Ciencias Biológicas
y Agropecuarias



ISSN: 2007 - 9990

Joel Ayala de la Vega

Presente

La Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias CIBA, a través de la presente le informa que el resultado turnado al comité editorial y que se emitió en la etapa de revisión por pares ha sido favorable y *SIN OBSERVACIONES* al trabajo titulado "PROPUESTA DE DISEÑO Y AUTOMATIZACIÓN DE BIORREACTOR PARA SISTEMAS DE INMERSION TEMPORAL" De la autoría de Clara Anabel Arredondo Ramírez, Gregorio Arellano Ostoa, Joel Ayala de la Vega e Irene Aguilar Juárez.

A partir del día 25 de Enero del 2019 por parte del autor le recordamos que se tienen 10 días hábiles a partir de esta fecha para realizar el pago y hacemos llegar la ficha escaneada vía correo electrónico, una vez recibido el pago se procede por parte del equipo editorial en un plazo de 15 días a realizar las revisiones ortográficas de estilo, diagramación y publicación.

Se extiende la presente a petición del interesado, para los efectos legales y formales que convengan.

ATENTAMENTE

Guadalajara, Jalisco a 25 de Enero del 2019

Dr. Francisco Santillán Campos
Director Editor

- Directorio
- Catálogo 2.0
- Revistas en línea

Título, ISSN o número

Búsqueda exacta

Búsqueda avanzada

Índices

Gráficas

Búsqueda básica

Resultado : 1 Revistas

1 Títulos únicos

Resultado por: 2007-9990

Directorio Catálogo 2.0 Revistas en línea



Revistas en línea Catálogo 2.0

Título	País	Editorial	Situación	ISSN	Año de inicio	Subtemas		
Revista Iberoamericana de las ciencias biológicas y agropecuarias	México	Centro de Estudios e Investigaciones para el Desarrollo Docente A.C. (CEDID)	Vigente	2007-9990	2012	Agronomía, Ganadería, Zootecnia		<input checked="" type="checkbox"/>

Mapa del sitio

Búsqueda en:

Directorio
Catálogo 2.0
Revistas en línea
Portal de Portales

Búsqueda avanzada

Índices:

Por Tema
Por Región
Por País / Territorio
Por Título
Por Editorial
Por Indización

Gráficas:

Directorio
Catálogo 2.0
Revistas en línea
Acumulado 2008 a la fecha

FAQ

Ayuda
Contacto
Legalidad