

Enfoque UTE

REVISTA



www.ute.edu.ec

e-ISSN 1390-6542
p-ISSN 1390-9363

Volumen 8 - Número 4 - Septiembre 2017



Enfoque UTE es una revista de carácter técnico-científico, que publica artículos sobre trabajos de investigación científica y tecnológica, revisión del estado del arte en un área específica del conocimiento y trabajos de vinculación con la comunidad en los cuales se realizaron actividades de investigación científica.

La revista abarca las áreas temáticas de las ingenierías Ambiental, de Alimentos, Automotriz, Industrial, Informática, Mecatrónica y de Petróleos.

Enfoque UTE está dirigida a la comunidad de docentes, investigadores, y estudiantes universitarios, de pregrado y posgrado en general.

Enfoque UTE
Volumen 8 – Número 4
Septiembre – 2017

e-ISSN: 1390-6542 (electrónico) / p-ISSN: 1390-9363 (impreso)

Facultad de Ciencias de la Ingeniería e Industrias
Universidad Tecnológica Equinoccial



Enfoque UTE está distribuida bajo una Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional.

<http://ingenieria.ute.edu.ec/enfoqueute/>

e-mail: enfoque@ute.edu.ec

Teléfono: +593-(2)-2990-800 ext.2232

Dirección: Av. Mariscal Sucre (Occidental) y Mariana de Jesús, s/n.

Quito-Ecuador

Comité Editorial

Director

Diego Ordóñez Camacho, *Universidad Tecnológica Equinoccial*, Ecuador

Comité Editorial

Martín Buffa Dunat, *Universidad Autónoma de Barcelona*, España

Analía Concellón, *Universidad Nacional de La Plata*, Argentina

Albert Ibarz, *Universidad de Lleida*, España

Sergio Luján Mora, *Universidad de Alicante*, España

Alberto Medina León, *Universidad de Matanzas*, Cuba

Carlos Monsalve Arteaga, *Escuela Politécnica del Litoral*, Ecuador

María Gabriela Pérez, *Escuela Politécnica Nacional*, Ecuador

Jordi Saldo Periago, *Universidad Autónoma de Barcelona*, España

Hugo Daniel Meyer, *University of Amsterdam*, Países Bajos

Neus Sanjuan, *Universidad Politécnica de Valencia*, España

Gabriela Vernaza Leoro, *Universidad San Francisco de Quito*, Ecuador

Fabián Villavicencio Abril, *Universidad de las Fuerzas Armadas*, Ecuador

Jorge Viteri Moya, *Universidad Central del Ecuador*, Ecuador

Índices / Catálogos / Bases de datos

Web of Science (Emerging Sources Citation Index) - Thomson Reuters

<http://ip-science.thomsonreuters.com/cgi-bin/jrnlst/jlresults.cgi?PC=MASTER&Full=Enfoque%20UTE>

DOAJ (Directory of Open Access Journals)

<https://doaj.org/toc/1390-6542>

OAJI (Open Academic Journals Index)

<http://oaji.net/journal-detail.html?number=1783>

GIF (Global Impact Factor)

<http://globalimpactfactor.com/enfoque-ute/>

REDIB (Red Iberoamericana de Innovación y Conocimiento Científico)

https://www.redib.org/recursos/Record/oai_revista1886-enfoque-ute

Catálogo Latindex

<http://www.latindex.org/latindex/ficha?folio=22038>

Universia

http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/title/enfoque-ute/id/58440243.html

Sherpa / Romeo

<http://www.sherpa.ac.uk/romeo/search.php?issn=1390-6542>

Stanford University Libraries

<https://searchworks.stanford.edu/view/10222186>

Latinoamericana

<https://revistaslatinoamericanas.org/participantes/> (# 178)

CiteFactor

<http://www.citefactor.org/journal/index/10856>

OALib

<http://mailer.oalib.net/journal/5934>

WorldCat

<http://www.worldcat.org/title/enfoque-ute-revista-cientifica/oclc/856580285>

Electronic Journals Library

https://opac.giga-hamburg.de/ezb/detail.phtml?bibid=GIGA&lang=en&jour_id=205084

Academic Journals Database

<http://journaldatabase.info/journal/issn1390-6542>

Scientific Indexing Services

<http://www.sindexs.org/JournalList.aspx?ID=1491>

ResearchBib – Academic Resource Index

<http://journalseeker.researchbib.com/view/issn/1390-6542>

DRJI (Directory of Research Journals Indexing)

<http://drji.org/JournalProfile.aspx?jid=1390-6542>

Journal TOCs

<http://www.journaltoCs.ac.uk/index.php?action=browse&subAction=pub&publisherID=2651&journalID=28767>

Google Scholar

<http://scholar.google.com/scholar?q=Enfoque+UTE>

Contenido

- Blindaje por proyección térmica en flancos de dientes de un virador de molino de caña de un ingenio azucarero** pp. 1 - 15
Segundo M. Espín Lagos, Jorge P. Guamanquispe Toasa, Diana C. Coello-Fiallos, Jorge A. Paredes Zumbana
- Impacto de la sobrecarga en redes móviles ad hoc** pp. 16 - 26
Patricia Ludeña-González, Rommel Torres, Manuel Quiñónez, Samanta Cueva
- Hacia la construcción de un dispositivo de asistencia para personas no videntes en el juego de cuarenta** pp. 27 - 40
Ortega Holger, Rodrigo Tufiño, Juan Estévez
- Modelamiento geoestadístico aplicado a la caracterización de yacimientos: modelo basado en Celdas de Alta Resolución** pp. 41 - 52
Gonzalo M. Cerón López
- Extracción purificación y caracterización de inhibidores de tripsina provenientes de semillas andinas** pp. 53 - 67
Patricio Castillo, Lorena Quinchuela, Paulina Echeverría, Gonzalo Jácome
- Evaluación de la extracción de ácidos grasos a partir de cabezas de sardina (*Opisthonema libertate*) subproducto de la industria pesquera** pp. 68 - 85
Belén Carrillo, Mauricio Mosquera

Prefacio

La edición septiembre 2017 de Enfoque UTE presenta seis artículos seleccionados por su calidad, novedad y aporte. El primer trabajo estudia las posibilidades y beneficios de aplicar blindaje por proyección térmica a los dientes del virador en molinos de caña.

El segundo artículo estudia la sobrecarga ocasionada por la información de control de los protocolos de enrutamiento en redes móviles Ad Hoc, relacionando dicha sobrecarga con la confiabilidad en la entrega de información útil.

Luego se presenta un sistema de apoyo para invidentes, que aporta al Plan Nacional del Buen Vivir, al brindarles asistencia en la atención de sus necesidades de recreación e interacción social. Este sistema permitiría una mejor inclusión de los invidentes en el popular juego del “cuarenta”, gracias al uso de técnicas de inteligencia artificial y visión computarizada.

A continuación se ofrece un estudio en los campos petroleros de la Cuenca Oriente, donde mediante el uso de la Geoestadística y paquetes de software de código abierto, se caracterizan yacimientos mediante modelos basados en celdas de alta resolución, para representar el condicionamiento de la porosidad con respecto al modelo de facies.

El quinto artículo trata sobre la extracción, purificación y caracterización de inhibidores de tripsina provenientes de semillas andinas. Estos inhibidores tienen un gran potencial en campos como la agricultura, por ejemplo al aplicarlos como bioinsecticidas específicos, para reemplazar a productos sintéticos nocivos.

Para finalizar, se evalúa la extracción y recuperación de ácidos grasos a partir de cabezas de sardina; esto evita que un subproducto de la industria pesquera se subutilice en balanceados o, peor aún, sea desechado al océano. Al mismo tiempo se proporciona una fuente de ácidos grasos esenciales que puede ser usada en suplementos nutricionales para la dieta de seres humanos.

Agradecemos a los autores, revisores y colaboradores en general, por el gran apoyo brindado para presentar esta recopilación de trabajos científicos, de gran interés tanto a nivel nacional como internacional.

Comité Editorial

Quito, septiembre 2017

Blindaje por proyección térmica en flancos de dientes de un virador de molino de caña de un ingenio azucarero

(Thermal projection shielding in teeth flanks of a sugar cane mill drainer of a sugar factory)

Segundo M. Espín Lagos¹, Jorge P. Guamanquispe Toasa¹, Diana C. Coello - Fiallos¹, Jorge A. Paredes Zumbana¹

Resumen:

Se realizó el blindaje a los flancos de dientes de un virador de molino de caña, por medio de la técnica de proyección térmica por llama, mediante el uso de la aleación micropulverizada Eutalloy 11496. El material del virador es de acero AISI 1045 y la superficie de blindaje fue preparada por el proceso de chorro con material abrasivo de naturaleza volcánica, con el objetivo de conseguir una superficie óptima de anclaje para la aleación. A continuación, mediante software, se realizaron iteraciones del espesor del blindaje con la finalidad de determinar su vida útil y mediante la distribución de Weibull se estimó la función de confiabilidad y la función de probabilidad de falla, considerando una zafra completa de 240 días.

Palabras clave: blindaje; proyección térmica; dureza; vida útil; probabilidad de falla.

Abstract:

Shielding was performed on the flanks of teeth of a cane mill by means of the flame thermal projection technique using the Eutalloy 11496 micropulverized alloy. The material of the toner is AISI 1045 steel and the surface of shielding was prepared by the jet process with abrasive material of volcanic nature, in order to achieve an optimum anchorage surface for the alloy. Next, in software, iterations of the thickness of the shield were realized with the purpose of determining its useful life and through the distribution of Weibull we estimated the function of reliability and the function of probability of failure, considering a complete harvest of 240 days.

Keywords: shielding; thermal projection; hardness; life span; failure probability.

1. Introducción

En la actualidad se han registrado investigaciones relacionadas con la ingeniería de superficies con el objetivo de extender la vida útil de los elementos y las piezas mecánicas, que se encuentran expuestas a medios de desgaste abrasivo y corrosivo; especialmente en la industria azucarera y en el área de molinos, se ha visto la necesidad de experimentar técnicas de blindaje o recubrimientos duros en las cuchillas centrales de molinos (viradores), pero mediante la protección por arco eléctrico y electrodo revestido; es así que Adolfo Falcón (2002), egresado de la ESPO, realizó estudios de adherencia de metal de aporte sobre las cuchillas centrales, mientras variaba los parámetros de soldadura y el tipo de electrodo; llegó a la conclusión que el recubrimiento con electrodos compuestos de fundición de cromo mejoran la resistencia al desgaste de las cuchillas.

¹ Universidad Técnica de Ambato, Ambato – Ecuador, ({sespin, jp.guamanquispe, dc.coello}@uta.edu.ec, j.paredes@eneragro.com.ec)

En otro caso, Ronny Aroca (2010), egresado de la ESPOL, realizó un análisis de recubrimientos duros, pero en este caso como elemento de protección contra el desgaste de las masas de los molinos de caña, mediante el uso de soldadura por arco; evidenció mejora en las propiedades de resistencia al desgaste de las masas. El desgaste de las masas puede darse por el contacto con materia extraña a la caña y proveniente de los cañaverales al momento de la cosecha, sean estos: piedras, piezas de metal, maderas, arena de sílice, raíces y cogollos.

En esta investigación se ha caracterizado el blindaje por proyección térmica de aleación micropulverizada Eutalloy 11496 sobre muestras de acero AISI 1045 pertenecientes a un virador desechado del molino de caña 1 del Ingenio Azucarero San Juan (Figura 1) ubicado en Playas Villamil, provincia del Guayas; se encontraron los mejores resultados de resistencia al desgaste abrasivo y de resistencia a la corrosión, en las muestras que llevan blindaje sin la presencia de defectos y que tuvieron una preparación superficial por chorro con el uso de material abrasivo mineral de naturaleza volcánica.

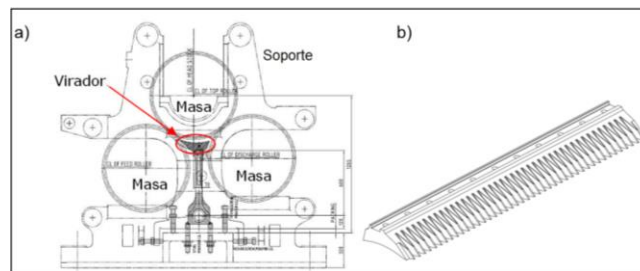


Figura 1. a) Ubicación del virador en el molino de caña, b) Virador

Los resultados del ensayo de desgaste abrasivo (Tabla 1) y los resultados del ensayo de corrosión acelerada en cámara de niebla salina (Tabla 2), se basaron en las normas ASTM G-65 (2000) y ASTM B-117 (2003), respectivamente y de acuerdo con estos indicadores se procede a realizar el blindaje de los flancos de los dientes de un nuevo virador, con la finalidad que la vida útil del blindaje sea favorable a una zafra de duración 240 días. Se pretende que el blindaje sea quien se exponga al medio abrasivo y corrosivo, en lugar del material base de los dientes del virador como sucede típicamente.

Para la Tabla 1, las muestras de acero AISI 1045 previo al proceso de blindaje fueron preparadas superficialmente por: pulido mecánico (P), chorro con abrasivo mineral (S) y granallado metálico (G); en cambio, las muestras tipo (E) son los sustratos sin blindaje. De todas las muestras se puede observar que el menor desgaste abrasivo expresado en mm^3 se presentó en las muestras con blindaje y una preparación superficial tipo chorro con abrasivo mineral (S). Debido a esto se ha seleccionado como proceso de preparación superficial en los dientes del nuevo virador, el de tipo chorro con material abrasivo de naturaleza volcánica.

Tabla 1. Resultados de ensayos de desgaste abrasivo en muestras de acero AISI 1045, norma ASTM G-65

Probeta	Peso inicial (gramos)	Peso final (gramos)	Peso perdido (gramos)	Desgaste abrasivo volumen (mm ³)	Media (mm ³)	Desviación estándar (σ)	Coefficiente de variación (%)	Dureza superficial (HB)	Coefficiente desgaste (K)
P1	177,858	177,351	0,507	64,59	71,42	3,57	5,00	216,10	0,258
P2	204,745	204,192	0,553	70,45				227,50	0,296
P3	167,397	166,822	0,575	73,25				228,60	0,309
P4	201,718	201,147	0,571	72,74				219,80	0,295
P5	200,508	199,928	0,580	73,89				216,40	0,295
P6	166,135	165,557	0,578	73,63				198,70	0,270
S1	174,623	174,538	0,085	10,83	11,83	0,62	5,25	228,10	0,046
S2	172,258	172,169	0,089	11,34				267,30	0,056
S3	166,581	166,483	0,098	12,48				245,40	0,057
S4	184,432	184,337	0,095	12,10				231,00	0,052
S5	185,847	185,753	0,094	11,97				216,70	0,048
S6	178,859	178,763	0,096	12,23				215,20	0,049
G1	196,807	196,602	0,205	26,11	28,83	1,84	6,38	255,20	0,123
G2	193,876	193,643	0,233	29,68				227,90	0,125
G3	170,592	170,374	0,218	27,77				230,50	0,118
G4	194,574	194,326	0,248	31,59				227,90	0,133
G5	196,937	196,709	0,228	29,04				287,00	0,154
G6	196,854	196,628	0,226	28,79				262,60	0,140
E1	199,350	198,525	0,825	105,10	103,82	1,80	1,74	146,40	0,284
E2	200,209	199,404	0,805	102,55				147,00	0,279

En la Tabla 2 se puede observar la tasa o velocidad de corrosión expresada en mm/año, y que el mayor ataque corrosivo se presentó en las muestras sin blindaje (E) expuestas a 200 horas de corrosión acelerada en la cámara de niebla salina; no así, en las muestras que llevan blindaje y una preparación superficial tipo chorro con abrasivo mineral (C).

Tabla 2. Resultados de los ensayos de corrosión acelerada en cámara de niebla salina en muestras de acero AISI 1045 basados en la norma ASTM B-117

Probeta	Pesos			Área (cm ²)	Densidad (g/cm ³)	Tiempo (h)	K	mm/yr
	Inicial (g)	Final (g)	Pérdida masa (g)					
C1	44,519	44,457	0,062	4,83	7,60	100	87600	1,4796
C2	55,358	55,297	0,061	5,52	7,60	100	87600	1,2737
C3	50,263	50,181	0,082	4,80	7,60	200	87600	0,9845
C4	51,247	51,208	0,039	5,40	7,60	200	87600	0,4162
C5	55,718	55,651	0,067	6,30	7,60	100	87600	1,2258
C6	65,042	64,993	0,049	6,16	7,60	100	87600	0,9169
C7	55,564	55,524	0,040	5,04	7,60	200	87600	0,4574
C8	42,537	42,461	0,076	4,60	7,60	200	87600	0,9522
C9	49,727	49,654	0,073	4,83	7,60	100	87600	1,7421
C10	61,682	61,602	0,080	6,67	7,60	100	87600	1,3825
C11	66,446	66,394	0,052	6,16	7,60	200	87600	0,4865
C12	42,131	42,119	0,012	5,06	7,60	200	87600	0,1367
C13	55,408	55,382	0,026	5,50	7,60	100	87600	0,5449
C14	65,264	65,153	0,111	6,96	7,60	100	87600	1,8382
C15	53,953	53,947	0,006	5,50	7,60	200	87600	0,0629
C16	51,107	51,065	0,042	4,80	7,60	200	87600	0,5043
C17	50,856	50,836	0,020	5,28	7,60	100	87600	0,4366
C18	55,293	55,173	0,120	5,52	7,60	100	87600	2,5057
C19	59,903	59,895	0,008	7,00	7,60	200	87600	0,0659
C20	50,217	50,178	0,039	5,40	7,60	200	87600	0,4162
C21	53,381	53,360	0,021	5,28	7,60	100	87600	0,4584
C22	44,339	44,23	0,109	5,06	7,60	100	87600	2,4784
C23	42,117	42,098	0,019	4,62	7,60	200	87600	0,2370
C24	51,909	51,909	0,000	5,76	7,60	200	87600	0,0000
EC1	49,957	49,846	0,111	5,06	7,85	100	87600	2,4480
EC2	53,263	52,986	0,277	5,52	7,85	200	87600	2,7999
EC3	58,847	58,731	0,116	5,52	7,85	100	87600	2,3451
EC4	46,449	46,191	0,258	5,06	7,85	200	87600	2,8449

2. Materiales y equipos

2.1 Materiales

- Virador del molino de caña, de acero AISI 1045
- Aleación micropulverizada Eutalloy 11496, compuesta por: 15,5% de níquel y cromo, 3,2% de boro, 3,8% de hierro y 0,7% de carbono (Eutalloy 11496; 2008).
- Material abrasivo: de naturaleza volcánica, con tamaño de partículas en el orden de 1.5mm
- Gases para el proceso de proyección térmica: oxígeno y acetileno, ambos de uso industrial.

2.2 Equipos

- Equipo de proyección térmica SUPERJET-S
- Pistola de temperatura FLUKE 62 MAX+
- Medidor de rugosidad ELCOMETER 123
- Medidor de espesores DEMAQ QS5
- Medidor portátil de dureza Brinell DIGIMESS DP 300

3. Metodología

3.1 Preparación superficial y rugosidad

Se utiliza para el chorro con material abrasivo, un gránulo basáltico de origen 100% volcánico, que tiene como característica una alta pureza en sílice; el tamaño de sus partículas están en el orden de 1,5 mm, de acuerdo con ensayos de granulometría con el material pasante en malla mesh 12 (1,7 mm) y retenido en malla mesh 14 (1,4 mm). La Figura 2 muestra el material abrasivo con las partículas de formas angulares y esféricas.



Figura 2. Material abrasivo mineral para rociado a presión

El material abrasivo se coloca en la tolva de alimentación del equipo, con capacidad de 1,0 MPa y 0,2 m³; después se realiza el rociado a presión de los flancos de los dientes del virador, considerando que el chorro del material abrasivo debe distribuirse uniformemente en las superficies, para conseguir una rugosidad similar a la obtenida en los ensayos realizados en las muestras de acero AISI 1045, con un valor promedio en el orden de 4,6 mils (116.8 μm). Para las futuras conversiones de unidades se tomará en cuenta que: 1 mil = 25,4 micras. La Figura 3 muestra las

superficies de los dientes después del proceso de chorro con abrasivo mineral. La metodología de medición del perfil de la superficie se basa en la ASTM D4417-B.



Figura 3. Dientes del virador después del proceso de chorro abrasivo

3.2 Calibración de los parámetros de proyección térmica

Los parámetros a controlar previo al proceso de proyección térmica son las presiones de los gases que hacen posible la combustión de la aleación metálica micropulverizada; estos gases son el oxígeno y el acetileno; estas presiones se calibran de acuerdo con la boquilla que se utilice (Tabla 3). Los tipos de boquillas y las presiones de trabajo que recomienda el equipo SUPERJET-S se detallan a continuación (Castolin S.A. 2003):

- Boquilla A0 S: útil para recargues puntuales de precisión
- Boquillas A1 S y A2 S: útil para precisión lineal
- Boquillas B3 S y B4 S: son boquillas intermedias estándar
- Boquilla C5 S: es la boquilla de mayor potencia

Tabla 3. Presiones recomendadas para los gases de proyección térmica de acuerdo con el tipo de boquilla

Tipo de boquilla	Oxígeno		Acetileno	
	bar	psi	bar	psi
A0 S	1,5	22	0,5	7,5
A1 S	2,0	30	0,5	7,5
A2 S	2,5	37	0,5	7,5
B3 S	2,5	37	0,6	9,0
B4 S	2,5	37	0,6	9,0
C5 S	4,0	60	1,0	15,0

Para este caso se utiliza una de las boquillas intermedias estándar B3 S, debido a su tamaño que es accesible a la separación de los dientes del virador.

3.3 Pre calentamiento superficial

La temperatura de pre calentamiento de la superficie es un aspecto muy importante a controlar, debido a que experimentalmente se ha evidenciado que, si la temperatura de pre calentamiento de la superficie se encuentra por debajo de los 200°C, existe desprendimiento del material de aporte, por efecto de una mala fundición del polvo metálico sobre la superficie del acero. Los mejores resultados se obtienen cuando la temperatura de pre calentamiento de la superficie se encuentra en el rango de 320 y 420°C; de acuerdo con esto se controló que las temperaturas de pre calentamiento de los flancos de los dientes del virador se encuentren dentro de lo indicado. El calentamiento se realiza con el mismo equipo de proyección térmica, es decir mediante la combustión de ambos gases (oxígeno y acetileno) (Sager - Castolin S.A. 2003).

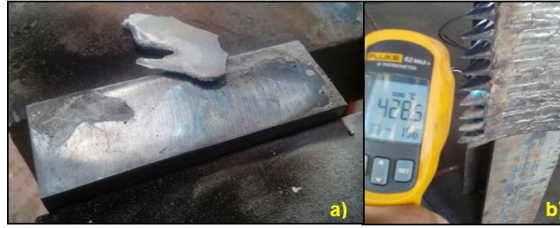


Figura 4. a) Experimentación del blindaje con temperatura de precalentamiento a 200°C, con evidencia de desprendimiento del material, b) Precalentamiento de los flancos de los dientes del virador, con un control de la temperatura entre 320 y 420°C

3.4 Proceso de blindaje por proyección térmica (AWS – Thermal Spraying)

Inmediato al precalentamiento de la superficie, se procede a depositar el polvo metálico sobre la superficie de los flancos de los dientes; esto se hace mientras se presiona el gatillo de la antorcha, y se distribuye el polvo de manera uniforme; hay que evitar formar aglomeraciones de polvo metálico y evitar también dejar zonas vacías, propensas a la aparición de poros y grietas. Una vez distribuido el polvo metálico se procede a fundirlo, visualizando que fluya y que se distribuya en toda la superficie. La experiencia adquirida en la aplicación de este proceso garantiza la calidad del blindaje, en términos de evitar la presencia de defectos superficiales como son grietas y poros. Del espesor que se necesite conseguir, dependerá la cantidad de pases a realizar; en este caso y de acuerdo con los resultados obtenidos en las experimentaciones con las muestras de acero extraídas a partir del virador, lo que se desea conseguir es un espesor que se aproxime a 1 mm, por lo que se realizó un pase de polvo metálico. La Figura 5 muestra la aplicación del blindaje en un sector de los flancos de los dientes del virador.

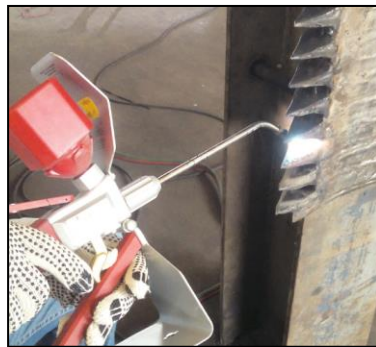


Figura 5. Aplicación del blindaje en los flancos de los dientes del virador

3.5 Medición del espesor de blindaje

La Figura 6 muestra la medición de los espesores antes y después del blindaje, tomado en uno de los dientes del virador. Inicialmente, es preciso que se calibre en cero el equipo; esto se realiza mediante el patrón que viene incorporado (Manual QS5, 2011). La metodología de medición del espesor es según la ASTM E797.

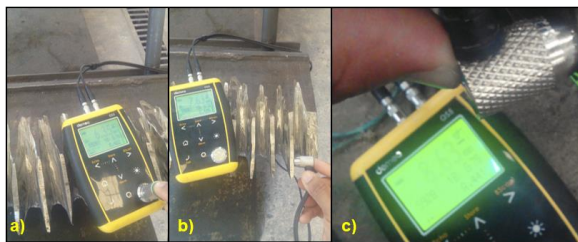


Figura 6. Medición de espesor en los flancos de los dientes del virador, a) calibración en cero del equipo, b) medición antes del blindaje, c) medición después del blindaje

3.6 Medición “in situ” de dureza del blindaje

Para verificar la dureza “in situ” del blindaje, primero es necesaria la calibración del equipo (Figura 7); esto se realiza con el patrón que viene incorporado. Después de esto se procede a medir la dureza Brinell de los flancos de los dientes, para después relacionar este valor con la dureza inicial. Dado que este ensayo es del tipo dinámico, es importante que la pieza esté perfectamente apoyada. El equipo de medición cuenta con un dispositivo de impacto D, que maneja una energía de impacto de 11 N.mm, con punta de ensayo esférica de carburo de tungsteno, de diámetro 3 mm y dureza 1600 HV (Manual DIGIMESS DP300) (Mediciones y calibración según ASTM A-965-96).



Figura 7. Medición de dureza Brinell en blindaje, a) Calibración del equipo, b) Registro de dureza Brinell

3.7 Análisis de la vida útil del blindaje

Las consideraciones que se tomaron en cuenta para desarrollar el criterio de vida útil del blindaje se tomaron del Tribology Handbook “Friction Wear Lubrication”, en donde se estudia el fenómeno del desgaste de acuerdo con el contacto entre superficies, demostrando que hay influencia de la presión de contacto sobre la intensidad del desgaste de las superficies asentadas; de acuerdo con aquello, el autor Kragelsky (1981) presenta la ecuación de vida útil (1):

$$V_u = \frac{\text{Masa del perfil de ataque} * \text{tiempo ensayo al desgaste de las probetas}}{\text{peso perdido de las probetas ensayadas}} \quad \text{Ec. 1}$$

Para la ecuación 1, el dato que se desconoce es la masa del perfil de ataque, que en este caso es la masa del espesor de blindaje de todos los flancos de los dientes del virador; es por eso que en el *software* SolidWorks, se procede a modelar el virador de caña del molino (Figura 8), para determinar la masa del perfil de ataque de todos los flancos de los dientes. Los demás factores de la ecuación 1 son conocidos y son el tiempo de duración del ensayo de desgaste por abrasión de

acuerdo con la norma ASTM G-65 y a las experimentaciones realizadas que es de 11 minutos; el peso perdido de las probetas ensayadas será el peso perdido de las probetas que presentaron mejor comportamiento al desgaste abrasivo (Tabla 1), que son las de blindaje con preparación superficial por rociado a presión de abrasivo mineral y cuyo valor promedio de pérdida de peso es 0,0928 gramos.

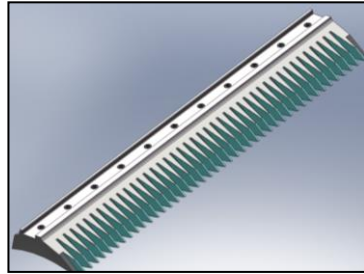


Figura 8. Modelado en el *software* SolidWorks de los flancos de los dientes del virador del molino de caña

En el *software* SolidWorks se modelaron los flancos de los dientes como un elemento independiente del virador, con la finalidad de poder seleccionarlos y calcular su masa; de acuerdo con esto, se tomó el criterio de iterar el espesor de blindaje entre 0,5 a 1,3 mm, para obtener la masa de los flancos de los dientes según el espesor de blindaje. Estos espesores se referencian del catálogo Eutalloy 11946 que indica un límite de espesor de hasta 1/16", con un rendimiento de la aleación metálica de 50 in² por cada libra.

3.8 Análisis de la confiabilidad del blindaje por la distribución de Weibull

Para el análisis de Weibull es necesario conocer el significado del término “falla” y de acuerdo con el Weibull Handbook (1933), la falla se refiere a cualquier incidente o condición que cause la degradación de un producto, proceso o material de tal forma que ya no pueda realizar las funciones de una manera segura, confiable y a un costo razonable para el que fue concebido; estas fallas ocurren de manera incierta y son influenciadas por el diseño, manufactura o construcción, mantenimiento y operación, así como también factores humanos.

Existe una curva típica de fallos (curva de la bañera) que representa los diferentes tipos de falla que un equipo o componente sufre durante el período desde su puesta en operación hasta que termina su ciclo de vida útil. La Figura 9 muestra la curva representativa de los tres componentes que forman la curva típica de flujo de fallas.

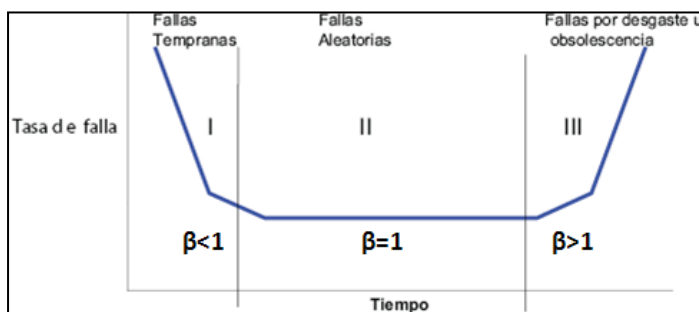


Figura 9. Curva de flujo de fallas o curva de la bañera (Salazar, 2004)

En la Figura 9, las fallas tempranas están asociadas con equipos nuevos y pueden ser causadas por partes faltantes, falta de capacitación de las personas que instalan el equipo, daño causado a los aparatos o dispositivos, o fallas por defectos de fabricación de las máquinas. La zona II de fallas aleatorias, son inesperadas y pueden surgir por sobrecargas y averías, causadas por factores externos que generan las fallas aun de las piezas mejor construidas; en la curva está representada por una línea horizontal. La zona III, de fallas por desgaste u obsolescencia, son fallas debido a edad, fatiga, corrosión, deterioro mecánico, eléctrico, hidráulico, o por el bajo nivel de mantenimiento y reparación (Salazar, Rojano, Figueroa & Pérez et al., 2004).

Las funciones Weibull de confiabilidad y de tasa de falla propuestas por Waloddi Weibull, están dadas por las ecuaciones 2 y 3.

$$R(t) = \exp \left[- \left(\frac{t - \gamma}{\alpha} \right)^{\frac{1}{\beta}} \right] \quad \text{Ec. 2}$$

$$F(t) = 1 - R(t) \quad \text{Ec. 3}$$

Donde:

$R(t)$ – Función de confiabilidad de probabilidad

β – es el parámetro de forma y es el indicador del mecanismo de falla

α – es el parámetro de escala – vida característica

γ – es el parámetro de localización- la vida mínima. Cuando $\gamma = 0$ la ecuación 2 queda en función de 2 parámetros.

$F(t)$ – Función de densidad de probabilidad de tasa de falla

Shigley (Budinas, 2008) menciona que el parámetro β (b) controla el sesgo de la distribución. Para poder graficar la relación confiabilidad – edad, solo se necesita determinar (cálculo a partir de datos históricos) los valores de los parámetros β y (α). Estos gráficos ayudan a comprender el comportamiento histórico de falla de los componentes y de los modos de falla de interés. La distribución de Weibull no sirve cuando no han ocurrido fallas; es decir, sirve para caracterizar el histórico de averías o fallas en componentes y permite la determinación de las probabilidades de fallo y duración media de cada componente.

Al conocer los valores de la media aritmética (\bar{x}), la varianza (S^2), la desviación estándar (S), el tiempo de falla de cada evento (t_i) y el número de datos o eventos (n), se pueden determinar los parámetros β y α ; con las ecuaciones 4, 5, 6, 7 y 8 respectivamente.

- Media aritmética

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n \ln(t_i)}{n} \quad \text{Ec. 4}$$

- Varianza

$$S^2 = \frac{(\sum \ln(t_i) - \bar{x})^2}{(n - 1)} \quad \text{Ec. 5}$$

- Desviación estándar

$$S = \sqrt{S^2} \tag{Ec. 6}$$

- Parámetro β

$$\beta = \frac{\pi}{S\sqrt{6}} \tag{Ec. 7}$$

- Parámetro α

$$\alpha = \exp\left(x + \left(\frac{0.5772}{\beta}\right)\right) \tag{Ec. 8}$$

- $\gamma = 0$ cuando no existen datos de falla anterior del elemento

4. Resultados

4.1 Rugosidad

Con la ayuda del medidor de rugosidad ELCOMETER 123, la Tabla 4, muestra los valores de rugosidad obtenidos en los flancos de los dientes del virador, que se encuentran en el orden de 4.6 mils (116.8 μm).

Tabla 4. Valores de rugosidad en los flancos de los dientes del virador.

Diente	Rugosidad (mils)			Diente	Rugosidad (mils)			Diente	Rugosidad (mils)			Diente	Rugosidad (mils)		
	Flanco		\bar{x}		Flanco		\bar{x}		Flanco		\bar{x}		Flanco		\bar{x}
	1	2		1	2		1	2		1	2		1	2	
1	4.60	4.30	4.45	12	4.50	4.70	4.60	23	4.30	4.50	4.40	34	4.80	5.20	5.00
2	4.70	4.60	4.65	13	4.90	5.00	4.95	24	4.50	4.50	4.50	35	4.50	4.60	4.55
3	4.30	4.90	4.60	14	4.20	4.50	4.35	25	4.70	4.10	4.40	36	4.60	4.90	4.75
4	4.30	4.20	4.25	15	4.50	4.30	4.40	26	4.10	4.50	4.30	37	4.50	4.20	4.35
5	4.60	4.50	4.55	16	4.60	4.40	4.50	27	4.80	4.70	4.75	38	4.70	4.40	4.55
6	4.70	4.20	4.45	17	4.70	4.40	4.55	28	4.50	4.30	4.40	39	4.60	4.70	4.65
7	4.30	3.80	4.05	18	4.30	4.50	4.40	29	4.70	4.70	4.70	40	4.30	4.50	4.40
8	4.60	4.70	4.65	19	4.60	4.20	4.40	30	4.70	4.50	4.60	41	4.20	4.50	4.35
9	4.90	4.50	4.70	20	4.10	4.20	4.15	31	4.50	4.80	4.65	42	4.90	4.70	4.80
10	4.70	4.60	4.65	21	4.40	4.20	4.30	32	4.70	4.20	4.45	43	4.70	4.50	4.60
11	4.10	4.50	4.30	22	4.70	4.60	4.65	33	4.20	4.00	4.10				

4.2 Espesor

De igual manera se tiene la Tabla 5, que muestra los valores de los espesores con y sin blindaje obtenidos en cada uno de los dientes del virador, resultados medidos con el equipo DEMEQ QS5, en donde “Y” es la diferencia entre los espesores final e inicial.

Tabla 5. Valores de espesor en los flancos de los dientes del virador

Diente	Espesor (mm)			Diente	Espesor (mm)			Diente	Espesor (mm)			Diente	Espesor (mm)		
	Flanco		γ		Flanco		γ		Flanco		γ		Flanco		γ
	Inicial	Final		Inicial	Final		Inicial	Final		Inicial	Final		Inicial	Final	
1	7.77	8.77	1.00	12	7.80	8.76	0.96	23	7.69	8.71	1.02	34	7.54	8.60	1.06
2	7.69	8.70	1.01	13	7.62	8.67	1.05	24	7.67	8.67	1.00	35	7.65	8.67	1.02
3	7.75	8.76	1.01	14	7.88	8.85	0.97	25	7.63	8.65	1.02	36	7.68	8.68	1.00
4	7.70	8.73	1.03	15	7.50	8.50	1.00	26	7.68	8.68	1.00	37	7.59	8.64	1.05
5	7.68	8.72	1.04	16	7.64	8.65	1.01	27	7.60	8.64	1.04	38	7.58	8.57	0.99
6	7.65	8.65	1.00	17	7.58	8.59	1.01	28	7.65	8.67	1.02	39	7.61	8.62	1.01
7	7.71	8.75	1.04	18	7.67	8.72	1.05	29	7.59	8.62	1.03	40	7.70	8.70	1.00
8	7.70	8.70	1.00	19	7.77	8.79	1.02	30	7.58	8.63	1.05	41	7.68	8.67	0.99
9	7.72	8.73	1.01	20	7.58	8.64	1.06	31	7.63	8.67	1.04	42	7.56	8.57	1.01
10	7.70	8.73	1.03	21	7.62	8.62	1.00	32	7.63	8.63	1.00	43	7.57	8.57	1.00
11	7.67	8.68	1.01	22	7.74	8.77	1.03	33	7.68	8.68	1.00				

4.3 Dureza Brinell

Para la medición de la dureza antes y después del blindaje, para cada uno de los dientes, fue necesario el uso del equipo DIGIMESS DP-300. Los valores de dureza Brinell se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Valores de dureza Brinell en los flancos de los dientes del virador

Diente	Dureza Brinell (HB)			Diente	Dureza Brinell (HB)			Diente	Dureza Brinell (HB)			Diente	Dureza Brinell (HB)		
	Flanco		%		Flanco		%		Flanco		%		Flanco		%
	Inicial	Final			Inicial	Final			Inicial	Final			Inicial	Final	
1	152.1	243.2	59.8	12	145.2	243.8	67.9	23	145.2	248	70.7	34	154.1	246.4	59.8
2	145.1	254.5	75.3	13	148.6	246.7	66.0	24	149.3	247	65.6	35	145.5	251.4	72.7
3	147.3	247.8	68.2	14	148.3	253.3	70.8	25	150.1	248	65.4	36	146.3	254.6	74.0
4	145.5	251.9	73.1	15	147.0	250.7	70.5	26	147.8	247	66.9	37	149.4	251.2	68.1
5	142.7	242.3	69.7	16	145.6	249.8	71.5	27	152.6	249	63.2	38	147.5	247.6	67.8
6	149.5	248.7	66.3	17	142.7	246.6	72.8	28	147.2	254	72.6	39	148.5	245.5	65.3
7	148.4	253.4	70.7	18	148.4	252.1	69.8	29	151.1	248	64.1	40	146.7	247.1	68.4
8	146.2	250.4	71.2	19	146.7	247.5	68.7	30	152.6	246	60.8	41	146.7	252.4	72.0
9	147.2	254.6	72.9	20	146.2	250.2	71.1	31	149.5	247	65.4	42	143.8	253.1	76.0
10	149.1	245.4	64.5	21	142.7	248.5	74.1	32	146.7	244	66.0	43	149.7	245.4	63.9
11	147.4	248.1	68.3	22	147.1	245.5	66.8	33	152.7	248	62.2				

4.4 Caracterización del blindaje

El blindaje o recubrimiento de aleación micropulverizada Eutalloy 11496, se analiza con técnicas microscópicas; debe caracterizarse por los aspectos siguientes:

- Debe presentar una distribución uniforme sobre la superficie del sustrato. En la Figura 10 se pueden observar los depósitos de aleación metálica aplicados a una sola pasada de deposición de material sobre la superficie y distribuidos uniformemente sin dejar vacíos o aglomeraciones de polvo sin fundir. Uno de los aleantes del polvo metálico que se encarga de generar la fluidez en la deposición, es el boro, ya que actúa como agente fundente.



Figura 10. Material de blindaje distribuido de manera uniforme en la superficie, imagen microscópica a 200X

- Otro de los aspectos es verificar microscópicamente que no existan defectos superficiales en el blindaje. Experimentalmente, en las muestras de acero AISI 1045 con blindaje y expuestas a 100 y 200 horas de corrosión acelerada en la cámara de niebla salina, se pudo determinar que un simple poro o grieta se convierte en el “foco” de inicio de la degradación del material, por efecto de la acumulación de sustancias corrosivas. La Figura 11 muestra un ejemplo de porosidad que se presenta en el blindaje y cómo incide ante un entorno corrosivo.

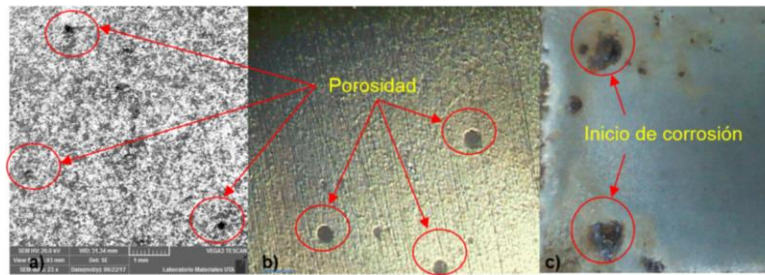


Figura 11. a) Defectos en el blindaje, imagen tomada en SEM marca TESCAN VEGA3 a 23X, b) Porosidad en el blindaje, imagen tomada en microscopio óptico a 100X, c) Inicio de corrosión en la porosidad del blindaje después de la corrosión acelerada en la cámara de niebla salina a 200 horas

En este aspecto, aunque el cromo y el níquel presentes en la aleación metálica trabajan en pro de la resistencia a la corrosión del material, bastará con un defecto superficial para que se inicie el proceso de degradación puntual, hasta que se contamine toda la superficie.

4.5 Vida útil del blindaje

A partir de la ecuación 1, y con los datos de masa de ataque (capa de material de blindaje que se expone a los fenómenos de abrasión y corrosión), el tiempo de duración del ensayo de desgaste abrasivo y el peso perdido de las probetas ensayadas, se tiene la Tabla 7, que muestra la vida útil del espesor de blindaje en cada uno de los escenarios.

Tabla 7. Valores de vida útil del blindaje según el espesor

Espesor de blindaje (mm)	Tiempo ensayo (min)	Masa ataque (g)	Peso perdido (g)	Vida útil blindaje (días)
0.50	11.0	1191.19	0.0928	98.05
0.60	11.0	1415.27	0.0928	116.50
0.70	11.0	1639.89	0.0928	134.99
0.80	11.0	1865.03	0.0928	153.52
0.90	11.0	2090.69	0.0928	172.10
1.00	11.0	2316.88	0.0928	190.72
1.10	11.0	2543.60	0.0928	209.38
1.20	11.0	2770.84	0.0928	228.08
1.30	11.0	2998.60	0.0928	246.83

4.6 Confiabilidad y probabilidad de falla por Weibull

Es preciso mencionar que en los registros del Ingenio Azucarero San Juan no existen históricos de falla del virador, pero es un elemento que se cambia cada año debido a la degradación del material, en especial en la zona de los dientes; debido a esto los tiempos de falla que se utilizarán en el cálculo de la confiabilidad y probabilidad de fallo, serán los que se determinaron de acuerdo con la Tabla 4, que indica la vida útil del blindaje según el espesor aplicado.

De acuerdo con la aclaración, se procede al cálculo de la media aritmética (\bar{x}), la varianza (S^2), la desviación estándar (S), el parámetro de forma β y el parámetro de escala (α); según las respectivas ecuaciones se obtiene los resultados de la Tabla 8.

Tabla 8. Cálculo de variables para determinar la confiabilidad del blindaje

Media aritmética \bar{x} =	5.107090963
Varianza S^2 =	0.098002163
Desviación estándar S =	0.313052971
Parámetro de forma β =	4.09690994
Parámetro de escala α =	190.1812631
Parámetro de localización γ =	0

Con los datos obtenidos de las Tablas 7 y 8, y con las herramientas estadísticas de Excel, se procede a calcular la confiabilidad y probabilidad de falla del blindaje de los flancos de los dientes del virador, mediante el uso de las Ecuaciones 2 y 3. Se obtienen los resultados de la Tabla 9.

Tabla 9. Valores calculados de la confiabilidad y probabilidad del fallo del blindaje

Esesor (mm)	Tiempo (días)	Ln(ti)	(Ln(ti)-x) ²	R(t)	F(t)
0.50	98.05	4.58551361	0.27204294	0.42711683	0.57288317
0.60	116.50	4.75788112	0.121947512	0.41178566	0.58821434
0.70	134.99	4.90518996	0.040764013	0.39862470	0.60137530
0.80	153.52	5.03383794	0.005366006	0.38709934	0.61290066
0.90	172.10	5.14805495	0.001678048	0.37685105	0.62314895
1.00	190.72	5.25078225	0.020647186	0.36762760	0.63237240
1.10	209.38	5.34414120	0.056192814	0.35924529	0.64075471
1.20	228.08	5.42971132	0.104083896	0.35156619	0.64843381
1.30	246.83	5.50870631	0.161294888	0.34448352	0.65551648
$\Sigma =$		45,96381867	0,78401730		

Los resultados de la Tabla 9 han permitido generar las gráficas de distribución de Weibull para la confiabilidad y probabilidad de falla del blindaje de los flancos de los dientes del virador de caña.

5. Discusión

De la rugosidad obtenida, con un valor promedio de 4,6 mils (116,8 μm), se puede relacionar de acuerdo con la norma NACE Standard RP0287 (2002), como una preparación de superficie tipo NACE No. 1/SSPC-SP 5, ya que sus límites de perfil de superficie están en el rango de 3,47 – 4,63 mils.

En términos de la dureza Brinell, se ha obtenido en promedio un incremento de la dureza del blindaje hasta el 68% con respecto a la dureza del material. Los elementos aleantes del polvo metálico que aportan a la dureza superficial, son el silicio y el boro, ya que, al combinarse con el carbono, permitirán la formación de carburos de silicio y carburos de boro; con ello favorecerán a la resistencia al desgaste por abrasión.

Para la vida útil del espesor de blindaje, se puede afirmar que para que este resista los 8 meses de duración de la zafra (240 días) ante un medio de desgaste abrasivo y corrosivo, deberá tener un espesor de 1,3 mm. En cambio, si se toma en cuenta el espesor promedio de 1 mm obtenido en las mediciones que muestra la Tabla 5, daría una vida útil del blindaje hasta aproximadamente 190 días, según la Tabla 7; esto indica que el blindaje actual que se aplicó a los dientes del virador no llegaría a cumplir su tiempo de operación, por lo tanto, sería necesario realizar un segundo pase de metal de aporte hasta alcanzar aproximadamente el espesor de blindaje de 1,3 mm.

En la Figura 12 se puede establecer que para una zafra completa de duración de 8 meses (240 días), la confiabilidad del blindaje en los flancos de los dientes del virador estará en aproximadamente 35%.

En la Figura 13 se puede revisar que la probabilidad de falla del blindaje en los flancos de los dientes del virador de caña al cumplirse los 8 meses de zafra (240 días) será aproximadamente del 65%.

En este sentido el espesor de blindaje de 1,3 mm sufrió el desgaste y evitó que el material base se degrade.

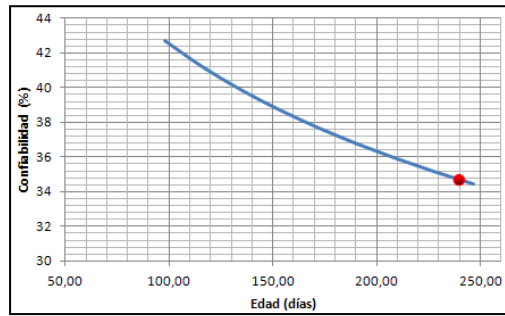


Figura 12. Función de confiabilidad de Weibull para el blindaje

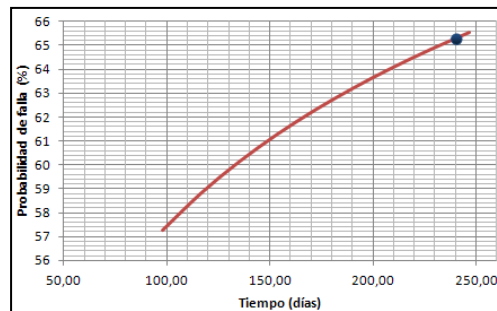


Figura 13. Función de densidad de probabilidad de tasa de falla para el blindaje

6. Conclusiones y Recomendaciones

El objetivo de alcanzar la vida útil de los flancos de los dientes del virador, para un tiempo de 240 días, es tomando en cuenta el espacio inaccesible que se tiene en la zona de molinos, para realizar un mantenimiento rutinario al virador; debido a esto, se proyecta un blindaje en los flancos de los dientes, que resista al desgaste abrasivo y corrosivo en toda la zafra.

La confiabilidad del blindaje de los flancos de dientes del virador para un tiempo de 240 días ha resultado ser del 35%; esto le corresponde dado que estará expuesto a un medio agresivo por desgaste por abrasión, como es la materia extraña que trae la caña desde los cañaverales hacia la zona de molienda; estas materias extrañas pueden ser: hojas, raíces, cogollos, piezas de metal que pudieron desprenderse de las herramientas de corte de caña, piedras o arena. Las hojas de la caña tienen gran contenido de sílice y estas a su vez traen al molino gran cantidad de arena, factores que aumentan el desgaste por abrasión de las piezas.

Al finalizar la operación del ingenio (zafra), transcurridos los 240 días será necesario realizar un análisis del espesor final de blindaje, mediante el uso de técnicas microscópicas, para compararlas con los resultados obtenidos en las muestras de acero AISI 1045 en los ensayos de desgaste por abrasión y desgaste por corrosión, según las normas ASTM G-65 y ASTM B-117, respectivamente.

El análisis del estado del blindaje después de la zafra permitirá también realizar un estudio económico, relacionado con el consumo y eficiencia del material de aporte (Eutalloy 11496) utilizado

en la proyección térmica y también tomando en cuenta que los dientes de este virador deberán volver a blindarse para la próxima zafra, y evitar con esto la adquisición local o importación de un nuevo virador.

Bibliografía

Abernethy, R. (1933). *Weibull Analysis Handbook*. Florida. U.S.A.

Aroca, R. (2010). *Análisis de recubrimientos duros para molinos de caña de azúcar*. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil. Ecuador.

ASTM G-65 (2000). *Standard Test Method for Measuring Abrasion Using the Dry Sand/Rubber Wheel Apparatus*. ASTM International, West Conshohocken, PA.

ASTM B-117 (2003). *Standard Practice for Operating Salt Spray (Fog) Apparatus*. ASTM International, West Conshohocken, PA.

American Welding Society (1985). *Thermal Spraying – Practice, Theory and Applications*. Miami. USA.

Budynas, R. (2008). *Diseño de Ingeniería Mecánica de Shigley*. México. 8va edición. McGraw-Hill.

Castolin S.A. (2003). *Operation Manual Superjet S*. Eutectic Corporation. Wisconsin. U.S.A. Pg.8

Falcón, A. (2002). *Aplicación de recubrimientos duros – protectores por arco eléctrico – electrodo revestido en las cuchillas centrales de molinos de caña*. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil. Ecuador.

Kragelsky, V. (1981). *Friction Wear Lubrication*. Moscow. Mir Publishers.

DEMEQ (2011). Medidor de espesores y corrosión por ultrasonido. *Manual de usuario QS5*. DEMEQ QSD 501 – ESP – REV. 02.

DIGIMESS (2011). Durómetro portátil – Lectura directa digital. *Manual del usuario*. DP 300. V.1.01.

NACE INTERNATIONAL: Standard RP0287. (2002). *Field Measurement of Surface Profile of Abrasive Blast-Cleaned Steel Surfaces Using a Replica Tape*.

Salazar, R., Rojano A., Figueroa E & Pérez F. (2004). *Aplicaciones de la distribución Weibull en ingeniería de confiabilidad*. Universidad Autónoma Chapingo. México. Texcoco.

Overhead impact on ad hoc mobile networks

(Impacto de la sobrecarga en redes móviles ad hoc)

Patricia Ludeña-González¹, Rommel Torres¹, Manuel Quiñónez¹, Samanta Cueva¹

Abstract:

Overhead quantifies how much routing and control information is necessary for the application data to reach the destination node. This is very important in Ad Hoc networks because the mobility of nodes makes routing paths change constantly, therefore, the exchange of control and routing information increases. In this work the overhead for AODV, BHP and DSDV mobile routing protocols is analyzed. Protocol reliability is used like a metric based on overhead behavior. The results show that the overhead can be between 30% to 60% with respect to the total throughput. BHP is the most effective protocol because with similar expected overhead it has a better level of application information delivered.

Keywords: mobile ad hoc network overhead; mobile routing protocols; ad hoc network reliability; AODV; overhead impact.

Resumen:

La sobrecarga es la medida de la cantidad de información de control y de enrutamiento necesaria para la entrega efectiva de la información de aplicación. Es muy importante en redes móviles Ad Hoc debido a que la movilidad de sus nodos hace que los caminos de enrutamiento cambien constantemente, por lo tanto, es más frecuente el intercambio de información de control y de enrutamiento con el objetivo de mantener los servicios de red disponibles. Este artículo mide la sobrecarga para los protocolos de enrutamiento AODV, BHP y DSDV en redes móviles. De la misma manera, se relaciona la sobrecarga con la confiabilidad del protocolo. Los resultados muestran que la sobrecarga va desde el 30% a 60% respecto al total del caudal de la red. BHP es el protocolo con un nivel de sobrecarga similar al resto de protocolos pero con mejor nivel de entrega efectiva de información.

Palabras clave: sobrecarga en redes móviles ad hoc; protocolos de enrutamiento; impacto de sobrecarga.

1. Introduction

Mobile Ad hoc NETWORKS (MANET) are auto-configurable networks, their nodes can act as source and destination simultaneously. Mobile nodes have limited resources, for instance, memory, energy and network buffers. Moreover, these resources are consumed in processes like information exchange, path selection and routing tasks. When the nodes act as routers, they must exchange information with the aim of share and update their routing data.

¹ Universidad Técnica Particular de Loja, Loja – Ecuador ({pjludena, rovitor, mfquinonez, spcueva} @utpl.edu.ec)

Control data allows the network to maintain adequate levels of performance, reliability, and convergence. Control data mainly is used by the nodes to keep the routing table updated. The control data exchanges information depending on the type of routing protocol used, by example a routing protocol could use several small packets to determine the availability of its neighboring nodes.

The routing and control data transmitted (Tran et al., 2015) into the network is called control routing, which is necessary for the network reliability. As an example, if the network path is modified by link failure or if the nodes are busy, these new issues should be immediately notified to all the nodes in the network in order to achieve a fast convergence.

The ratio between control routing and data transmitted is named overhead. A special network goal is to keep a trade-off between the throughput and the network reliability, with an acceptable level of overhead. For instance, a low level of overhead causes that the network uses the maximum effective throughput possible with the lowest reliability. On the other hand, a high level of overhead increases the reliability but the effective throughput decreases.

High level of overhead is an issue in Ad hoc networks because the nodes mobility causes an increase in control routing operation. When the nodes move, the end-to-end path changes frequently and the network must recreate the network topology again.

This proposal measures some indicators and their impact on the network for several ad hoc routing protocols. Metrics are grouped in two approaches, reliability and overhead. Throughput, dropped packets, jitter, and end-to-end delay are elements of the reliability approach. Cumulative overhead and the overhead behavior are elements of the overhead set approach.

The paper is organized as follows. In Section 2, related works are revised. Section 3 describes the impact of the overhead over AODV, BHP, and DSDV routing protocols. Experimental results are reported in Section 4 and conclusions are drawn in Section 5.

2. State of the art

Ad hoc routing protocols, generally, can be categorized into proactive, reactive, and cluster protocols. Proactive routing protocols generate the end-to-end path before the packets are transmitted. Each node maintains one or more routing tables to store path information. Topology changes are propagated from each node to all nodes in the network. Examples of these protocols are DSDV (Perkins and Bhagwat, 1994) and OLSR (Clausen, T., & Jacquet, P, 2003).

Reactive routing protocols generate on demand the path between a source and a destination for each packet to be transmitted. Routes are created only when the source node needs to send information. The path needs to be constantly updated until the destination node becomes

inaccessible or the path is not necessary anymore. Examples of these protocols are DSR (Boppana and Mathur, 2005) and AODV (Perkins and Royer, 1997).

A hybrid routing protocol shares reactive and proactive protocols characteristics. Cluster routing protocols, a kind of hybrid protocols, group the nodes geographically in a named set cluster. The cluster tries to isolate the broadcast traffic of the nodes belonging to it. Each cluster generally has a cluster head node, responsible for the intercluster communication, named gateway node. The set of head nodes comprises a backbone. Cluster routing protocols in general have the following phases: 1) cluster formation, 2) cluster head election 3) cluster maintenance. Examples of these protocols are CBRP (Jiang, 1999) and BCHP (Torres et al., 2012).

In all routing protocols, route discovery is the most critical task. If there are many path failures in route discovery, the routing overhead is increased, affecting to both, the packet delivery ratio and the delay, according to Zhang et al., (2013). Therefore, the overhead is different for proactive, reactive and cluster protocols (Singh et al., 2016). In proactive protocols, the flooding is the discovery technique and a periodically routing information exchange is mandatory (Paul, 2016). Moreover, due to the node mobility, the periodic update time must be the smallest possible. In reactive protocols, generally, the level of overhead depends on some factors like the information exchange load or the number of connections. In cluster protocols, traffic isolation allows having better overhead values (Alnabhan et al., 2017) (Narayana et al., 2016).

3. Overhead impact

There are some authors that had studied the overhead effect in MANET, for example, Timo and Hanlen (2006) develop fundamental limits on the overhead requirements of routing protocols applying principles from the Information Theory.

Research in La and Seo (2011) determines the minimum length of overhead based on the number of nodes with a flat geographical routing protocol. Besides, it determines the expected overhead and the minimum expected overhead. Tran et al., (2015) quantify overhead for reactive routing protocols with network mobility and traffic load parameters. The same authors, in Tran and Dadej (2014), quantify the overhead for proactive routing protocols with the same parameters used for reactive routing protocols. They conclude that, to reduce overhead and save bandwidth, the Time to Live of cached routes in reactive routing protocols, and, Time-slot for periodical updates in proactive routing protocols, must be the smallest possible.

In cluster protocols, the traffic isolation permits to have better overhead values (Alnabhan et al. 2017) (Narayana et al., 2016).

We have selected AODV for reactive protocols, BCHP for cluster protocols and DSDV for proactive protocols. Each protocol is analyzed based on its properties and routing strategies by determining

their overhead impact on the network. Then, specific researches related with overhead impact for each type of MANET protocols are listed.

AODV protocol uses route discovery for path creation process. AODV route discovery is used when any route to destination is found by a node. When a node needs to send information and a route is not available, AODV uses route request (RREQ), route reply (RREP), and router error (RERR) messages. AODV tries to minimize the overhead using destination sequence numbers and RREP to RREQ from intermediate nodes with updated routes to the receiver node.

BCHP protocol varies the overhead level depending on its phase or status. In the Node Initialization phase each node obtains a metric as a function of context characteristics: node speed, node location inside the cluster, and battery power status. This metric, in conjunction with the UNDECIDED state, is sent to its neighbors using HELLO broadcasting messages. In the Cluster Formation, if a node receives several HELLO messages from its neighbors, it proceeds to update its table of neighbors, including each neighboring node identification, link type, metric, and state. Each node reviews its neighbor table, and the node with the best metric becomes the cluster head, the one with the second lowest metric becomes the backup cluster head, and the remaining nodes change their status to managed node. The HELLO messages are used with the Discovery of the Adjacent Cluster phase and the Cluster Maintenance strategy.

In DSDV protocol, all nodes share their network tables periodically. The overhead in DSDV is caused for using updates. DSDV proposes two types of updates, “full dump” and “incremental updates”; the full dump updates are used especially when a high node mobility is present; in these updates, nodes share all their network table information. Incremental updates only use new records of the network table information for the control data interchange.

This research gives a new and interesting framework for the overhead analysis because it obtains the relationship between the overhead and the protocol reliability or efficiency.

4. Methodology

Network Simulation is used for the generation of a set of experiments. The parameters for the initial setup of each experiment are listed on the *Table 1*.

Table 1. Simulation parameters.

Parameter	Values
Protocols	AODV, BCHP, DSDV
Number of nodes	10, 20, 40, 60, 80
Number of connections	20
Area	1Km x 1Km
Simulation time	200 seconds
Mobility model	Two Way
Traffic transport layer	Constant bit rate (CBR)

Two important and related approaches are considered, the first one contains metrics related to the overhead and the second one contains metrics related with the protocol efficiency. On the overhead approach the cumulative overhead for each scenario and the overhead during the simulation time are obtained. Cumulative overhead and overhead in time metrics let to obtain an overall knowledge of how many packets in the routing level are necessary to deliver application packets. The reliability approach is measured across four indicators: dropped packets, jitter, end-to-end delay, and cumulative ratio applications packets. It is important to relate the overhead with the protocol reliability or protocol efficiency. It is possible that the protocol has a high overhead level but could be more efficient. In this case the overhead helps to improve the payload delivered.

5. Results

5.1 Overhead approach

Cumulative overhead: Figure 1 shows the cumulative overhead for each scenario. All the generated routing packets and received application packets for each scenario are related between them. This ratio shows how many routing packets are necessary to deliver application packets. High values imply more routing packets are used; therefore, the overhead level is bigger. AODV has the worst overhead due to its reactive nature. Consequently, each time the information is sent from a source to a destination, control information has to be generated to discover the route tables. Therefore, as long as the nodes increase in the network, a higher amount of overhead is required. In general, DSDV is better than BCHP. Since BCHP is hybrid, it generates control information for both to find the route and for clusters maintenance processes.

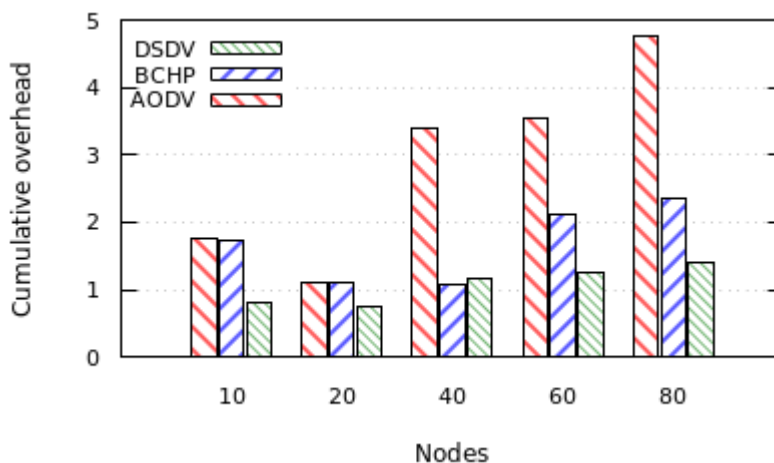


Figure 1. Cumulative overhead

Overhead behavior: Figure 2 shows the ratio between the packets sent by the routing layer and the received application packets for each scenario during the simulation time. The simulation time of the network comprises the initial flooding time of the network that is used in the discovery processes and the nodes initiation. The stabilization time increases proportionally with the increase

of nodes in the network. In all cases, the number of required routing packets is greater than the quantity of delivered application packets. In addition, if the number of nodes increases then the overhead increases in the same proportion. AODV has the worst delivered application packets rate. BCHP and DSDV have the best relationship between application data and routing data packets.

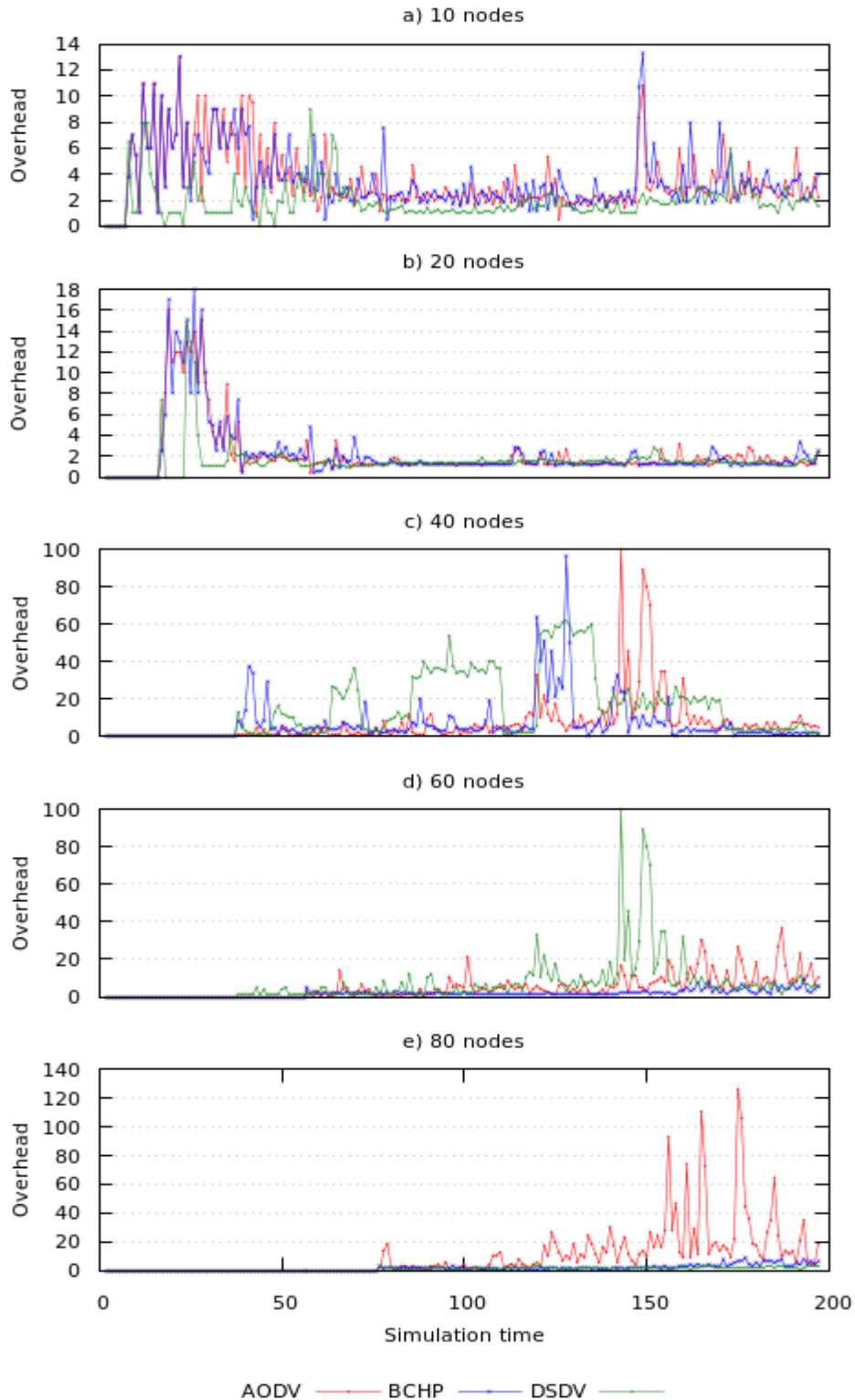


Figure 2. Overhead in time.

5.2 Reliability approach

Dropped packets: Figure 3 shows how many packets (routing or application packets) have been deleted by the routing layer during the simulation time for each scenario. Nodes drop packets due the following reasons: 1) the buffer is full (ifqueue), 2) the link goes down (link failure), 3) the time for acknowledgement packet reception has expired (timeout), 4) time to live value becomes zero (expired TTL), 5) the node has not an entry for the destination network in its routing table (No route). In DSDV protocol, link failure is the first reason to drop packets. In general, BCHP protocol has lower number of dropped packets than the other protocols. In addition, in the BCHP the timeout is the main reason to delete packets. In other hand, the sources of AODV dropped packets are the TTL expired and the link failure, due to the movement of nodes and its reactive behavior.

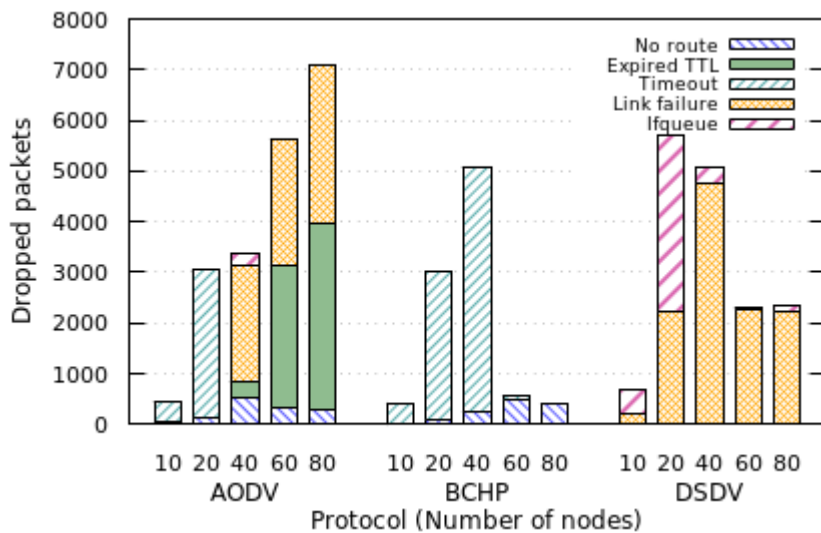


Figure 3. Dropped packets.

Jitter: It is an important indicator especially when multimedia traffic is present because of user experience requirements. Multimedia traffic needs to use the maximum bandwidth; in this case the overhead must allow using the communication channel without unnecessary control data. The Figure 4 shows that AODV has the worst jitter average. On the other hand, DSDV according to its proactive operation has the best behavior.

Delay Average: The tests use Constant bit rate traffic (CBR) for transport layer, CBR is similar to UDP. In CBR does not exist acknowledgment packets nor retransmissions packets. Delay is related with the communication delay channel. The Figure 5 shows the average end to end delay for each scenario. AODV generally has the worst delay values in all scenarios. Packets using the BCHP protocol are delivered faster in comparison with the other protocols.

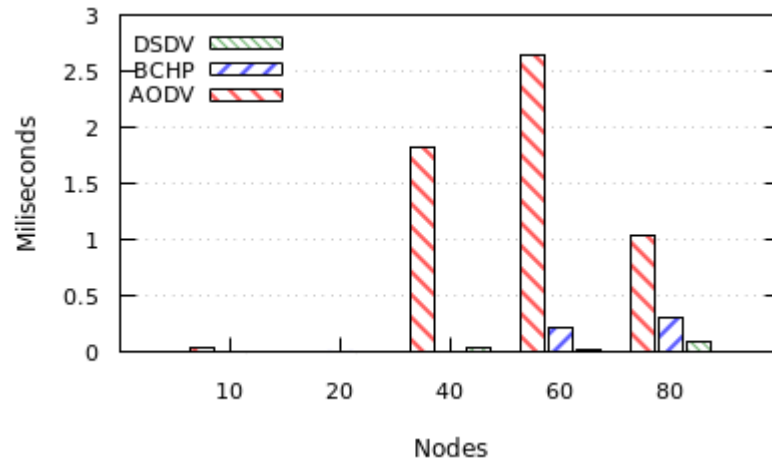


Figure 4. Jitter average.

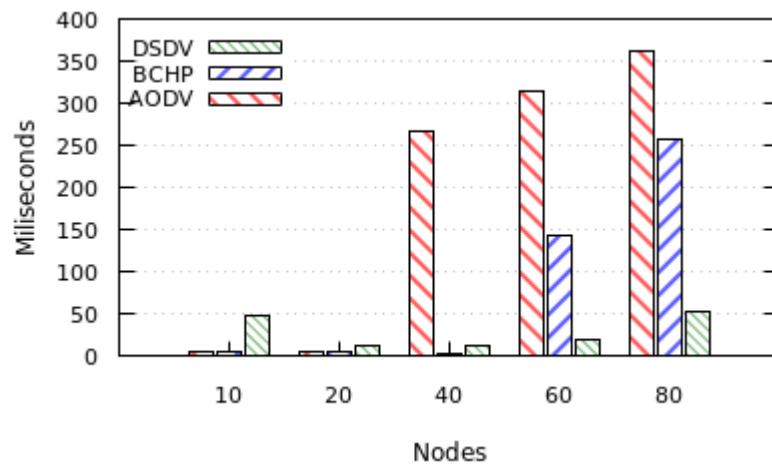


Figure 5. Delay average.

Cumulative ratio application packets: Figure 6 depicts the effectiveness in terms of the ratio between all sent packets versus the received packets belonging to the application layer. It is a measure of how many application packets are generated and how many are received. It is important that this value must be as small as possible. In almost all cases, BCHP shows the best ratio. In other words, BCHP is the most effective because it delivers more application packets than other protocols. BCHP does not saturate the network because the control traffic is concentrated in the cluster. This means, that application packages, in general, will have greater opportunity to reach the destination.

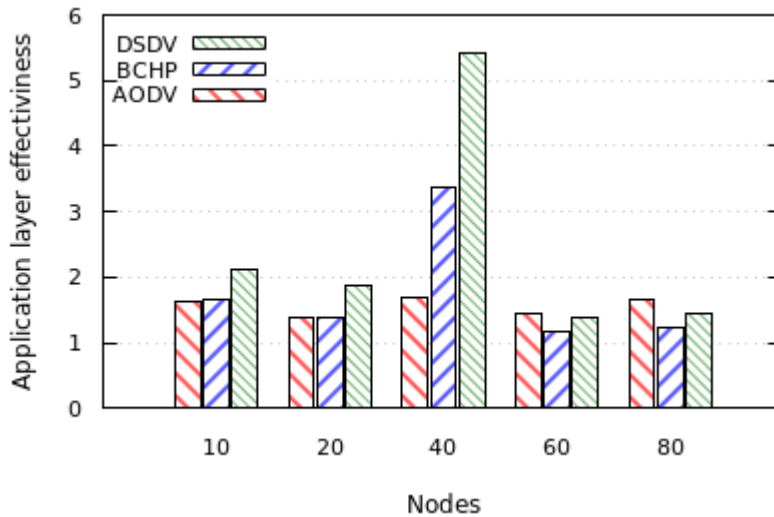


Figure 6. Ratio application packets.

4. Conclusions

The overhead and its relationship with the effectiveness of mobile routing protocols have been analyzed. Research shows that the overhead in all protocols is always greater than the delivered application packets.

DSDV has the best level of overhead but its effectiveness is less than BHP. BHP shows the best relationship between overhead and effectiveness. On the other hand, AODV uses the capacity of communication channel in the best way, but it does not have the same effectiveness than BHP. Therefore, BHP is the best protocol when the overhead and effectiveness approaches are analyzed in each scenario.

Based on this research, in the future, we are looking for the best Ad hoc routing cluster protocol with the aim to develop a new protocol that decreases the overhead and increases the effectiveness.

References

- Alnabhan, M., Alshuqran, M., Hammad, M., and Nawayseh, M. A. (2017). Performance evaluation of unicast routing protocols in manets - current state and future prospects. *International Journal of Interactive Mobile Technologies*, 11(1):84 – 97.
- Boppana, R. V. and Mathur, A. (2005). Analysis of the dynamic source routing protocol for ad hoc networks. In *Workshop on Next Generation Wireless Networks*, page 1.
- Clausen, T., & Jacquet, P. (2003). Optimized link state routing protocol (OLSR) (No. RFC 3626).
- Jiang, M. (1999). Cluster based routing protocol (cbrp). draft-ietf-manet-cbrp-spec-01. txt.

- La, R. J. and Seo, E. (2011). Expected Routing Overhead for Location Service in MANETs under Flat Geographic Routing. *IEEE TRANSACTIONS ON MOBILE COMPUTING*, 10(3):434–448.
- Narayana, M. V., Narsimha, G., and Sarma, S. S. V. N. (2016). Genetic – zhs routing protocol for fault tolerance and load balancing. *Journal of Theoretical and Applied Information Technology*, 83(1):72–80.
- Paul, S. (2016). *Introduction to MANET and Clustering in MANET*. Anchor Academic Publishing.
- Perkins, C. E. and Bhagwat, P. (1994). Highly dynamic destination-sequenced distance-vector routing (dsv) for mobile computers. In *Proceedings of the Conference on Communications Architectures, Protocols and Applications, SIGCOMM '94*, pages 234–244, New York, NY, USA. ACM.
- Perkins, C. E. and Royer, E. M. (1997). Ad-hoc on-demand distance vector routing. In *PROCEEDINGS OF THE 2ND IEEE WORKSHOP ON MOBILE COMPUTING SYSTEMS AND APPLICATIONS*, pages 90–100.
- Singh, G., Saini, D., Rishi, R., and Rohil, H. (2016). Role of link expiration time to make reliable link between the nodes in manets: A review. *International Journal of Applied Engineering Research*, 11(7):5321–5.
- Timo, R. and Hanlen, L. (2006). *MANETs: Routing Overhead and Reliability*.
- Torres, R., Mengual, L., Marban, O., Eibe, S., Menasalvas, E., and Maza, B. (2012). A management ad hoc networks model for rescue and emergency scenarios. *Expert Systems with Applications*, 39(10):9554 – 9563.
- Tran, Q. M. and Dadej, A. (2014). Proactive routing overhead in Mobile Ad-hoc Networks. Proceeding of *IEEE International Symposium on a World of Wireless, Mobile and Multimedia Networks 2014, WoWMoM 2014*.
- Tran, Q. M., Dadej, A., and Pham, T. L. (2015). Reactive routing overhead in mobile ad-hoc networks. Proceedings - 2015 IEEE 17th International Conference on High Performance Computing and Communications, 2015 IEEE 7th International Symposium on Cyberspace Safety and Security and 2015 IEEE 12th International Conference on Embedded Software and Systems, H, pages 1591–1596.

Zhang, X. M., Wang, E. B., Xia, J. J., and Sung, D. K. (2013). A neighbor coverage-based probabilistic rebroadcast for reducing routing overhead in mobile ad hoc networks. *IEEE Transactions on Mobile Computing*, 12(3):424–433.

Hacia la construcción de un dispositivo de asistencia para personas no videntes en el juego de cuarenta

(Towards the construction of a device to support blind people in the “cuarenta” game)

Holger Ortega¹, Rodrigo Tufiño¹, Juan Estévez¹

Resumen:

El presente trabajo tiene como objetivo el desarrollo de un sistema de reconocimiento automático de una carta de baraja ubicada sobre una mesa, como parte del proyecto más general de crear un dispositivo para asistir a personas no videntes en el juego de azar denominado “cuarenta”. El objeto de dicho dispositivo será informar al usuario de las cartas en juego, vía audio. Para esta fase del proyecto se utilizó el algoritmo de k-vecinos más cercanos entrenado con un conjunto de caracteres alfanuméricos sintéticos. El conjunto de prueba constó de fotografías tomadas en condiciones controladas de iluminación, con las cartas ubicadas en orientación arbitraria. La parametrización del algoritmo arrojó un valor de 1 como k óptimo, con el cual se obtuvo un error de clasificación en el conjunto de prueba de 5%. Solo dos caracteres fueron confundidos por el clasificador, la “A” y la “J”, con errores de 20% y 40% cada uno. El algoritmo fue implementado en un sistema embebido Raspberry Pi 3, y obtuvo un tiempo de respuesta de 5 segundos, incluida la conversión a audio, y una ocupación de memoria RAM que no superó el 60% de la capacidad del sistema. Estos resultados sugieren su aplicabilidad en dispositivos portátiles.

Palabras clave: reconocimiento automático; visión artificial; k vecinos más cercanos; juegos de azar; inclusión.

Abstract:

The present work has the objective of developing a system for the automatic recognition of a playing card on a table, as part of a more general project to create a device to assist the blind in the chance game called “cuarenta”. The goal of this device is to inform the user about the cards being played, via audio. For this phase of the project the algorithm used was k-NN, trained with a set of alphanumeric synthetic characters. The test set contained photographs taken in controlled lighting conditions, with the cards positioned in arbitrary orientations. The parameterization of the algorithm gave a value of 1 as the optimal k, with which a classification error of 5% was obtained in the test set. Only two characters were confused by the classifier, the “A” and the “J”, with 20% and 40% error each one. The algorithm was implemented in an embedded Raspberry Pi 3 system, obtaining a response time of 5 seconds, including the conversion to audio, and a memory occupation no greater than 60% of the total capacity of the system. These results suggest its applicability in portable devices

Keywords: automatic recognition; artificial vision; k-nearest neighbors; playing cards; inclusion

¹ Universidad Politécnica Salesiana, Quito – Ecuador ({hortega, rtufino} @ups.edu.ec; jestevez@est.ups.edu.ec)

1. Introducción

En el Ecuador existen alrededor de 274846 personas no videntes (López, 2010), las personas de este sector de la población aún deben sobrellevar grandes dificultades para poder tener una vida normal, y es una política estatal del gobierno del Ecuador permitir que este escenario cambie en el país y se logre una inclusión más eficaz. Los aspectos en los que se ha puesto más énfasis al momento de desarrollar tecnologías para personas no videntes han sido, obviamente, aquellos que son prioritarios para la supervivencia: dispositivos que les permiten caminar con cierta seguridad por las calles, cocinar los alimentos para su familia, acceder a la educación y capacitación, etc. Sin embargo, en el mismo Plan Nacional del Buen Vivir se contempla la satisfacción de necesidades básicas como apenas uno de ocho elementos que conforman el *sumak kawsay* (Secretaría del Buen Vivir, 2017), y por lo tanto es necesario atender también otras necesidades de este sector de la población, como son la recreación y la interacción social con otros sectores. En un artículo publicado por el diario El Comercio (Tello, 2014), se habla de las necesidades de recreación de las personas no videntes, y se menciona que practican habitualmente deportes como el fútbol o el ajedrez adaptado.

El presente proyecto pretende aportar a cubrir esa necesidad mediante un dispositivo que permitirá la inclusión de personas no videntes en el juego del cuarenta (Wikipedia, 2016). Al ser este uno de los juegos más tradicionales y representativos de la cultura ecuatoriana, el dispositivo aportará en el bienestar y el sentimiento de pertenencia al país de las personas no videntes. Cabe resaltar que el dispositivo permitirá que la persona no vidente compita no solo con personas de su misma condición sino con jugadores que sí gozan del sentido de la vista.

Para la consecución del objetivo propuesto en la investigación se ha contemplado que la implementación debería ser en un dispositivo portable, fácil de manipular y que sea asequible; uno de los dispositivos comerciales que cumple con estas características es Raspberry PI (Raspberry Pi Foundation, 2016), un minicomputador de placa reducida y bajo costo sobre el cual se puede instalar *software* libre. Las aplicaciones científicas y de investigación son innumerables y la mayoría se han inclinado hacia el área de la mecatrónica con sus derivadas (Hayward, 2014). El presente trabajo consiste en crear una aplicación para dicho dispositivo en el campo de la inteligencia artificial, puntualmente en la visión por computadora, para realizar las cinco fases del procesamiento de imágenes (Szeliski, 211) descritas en la *Figura 1*.

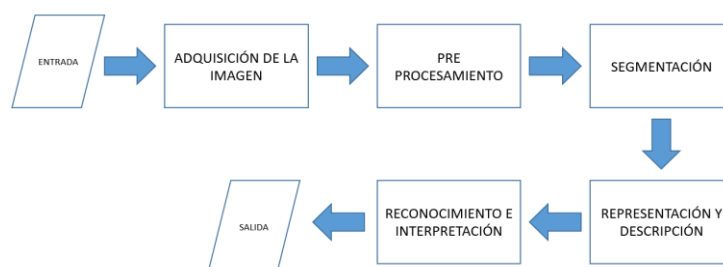


Figura 1. Etapas del procesamiento digital de imágenes.

En el proceso de adquisición de imagen se disciernen dos etapas: la primera se conoce como captura y consiste en utilizar un dispositivo óptico para obtener información relativa a una escena o entorno deseado; la segunda se conoce como digitalización, y consiste en transformar una señal con uno o varios componentes continuos en una imagen digital (Raikwal & Saxena, 2012). La siguiente fase es conocida como segmentación, consiste en aislar las áreas de interés de una escena para interpretarlas. A menudo es necesario refinar esta etapa debido al ruido y al desenfoco que se presenta en la imagen, para lo cual se utilizan diferentes técnicas como: umbralización, agrupación por rasgos comunes, detección de líneas, crecimiento de región y extracción de bordes. La fase de representación y descripción es conocida como extracción de características. En esta fase, la imagen es convertida en un vector que contiene la información más relevante de la misma para el problema. Dado que la representación y descripción son a menudo desconocidas a priori, generalmente se introducen varias características candidatas para intentar representar de una manera adecuada las clases, aun cuando puedan ser redundantes o irrelevantes. Los datos extraídos recogen las características o los rasgos diferenciadores de la imagen analizada.

Cabe mencionar que no siempre las cinco fases siguen un orden secuencial lineal, sino que puede ser necesario volver a una etapa anterior, por ejemplo, a la etapa de segmentación, si la etapa de reconocimiento ha fallado o incluso a la adquisición de la imagen si fuese necesario.

En el reconocimiento e interpretación se utilizan técnicas de reconocimiento geométrico de objetos. El problema fundamental de las técnicas de reconocimiento radica en su comportamiento en sistemas específicos, lo que dificulta la selección del método. Además, en este trabajo se utiliza un sistema embebido de bajas prestaciones, por lo que se deben considerar las capacidades de procesamiento y memoria.

La investigación de trabajos previos (Raikwal & Saxena, 2012), (Sudha & Bhavani, 2012), (Lojo, Losada, & Barreiro, 2009), (Gutiérrez, Lastra, Bacardit, Benítez, & Herrera, 2016) llevó a la elección del clasificador de aprendizaje supervisado k-vecinos más cercanos (kNN) por su procesamiento, rendimiento, precisión, uso de memoria RAM, tiempo de respuesta, tiempo de búsqueda y entrenamiento del algoritmo.

El método de k-vecinos más cercanos es un algoritmo de clasificación. El conjunto de entrenamiento consta del vector de características x_j , más una variable de atributo que es la clase, denominada C_j , para cada uno de los ejemplos. El objetivo de la clasificación es encontrar un modelo para predecir la clase a la que pertenece un vector de características nuevo (Galindo Durán, Juganaru-Mathieu, Áviles Cruz, & Vázquez, 2010). Sea x^* dicho vector. Entonces el algoritmo de k-vecinos más cercanos es el siguiente:

1. Calcular las distancias d_j desde el vector incógnita x^* hasta cada uno de los vectores de entrenamiento x_j . Puede emplearse cualquier definición de distancia, aunque la más recurrida es la euclídea.
2. Hacer una lista con los vectores de características correspondientes a las k distancias más cortas.
3. Asignar a x^* la clase C_j de la mayoría de los vectores de esta lista.

Gráficamente, y mediante la definición euclídea de distancia en un espacio bidimensional, el algoritmo de k -vecinos más cercanos puede visualizarse en la *Figura 2*. El círculo de línea continua representa $k=1$, el de línea entrecortada representa $k=3$. En el primer caso, la clase asignada al vector x^* (en rojo) sería la clase de los círculos negros; en el segundo, la de las cruces azules.

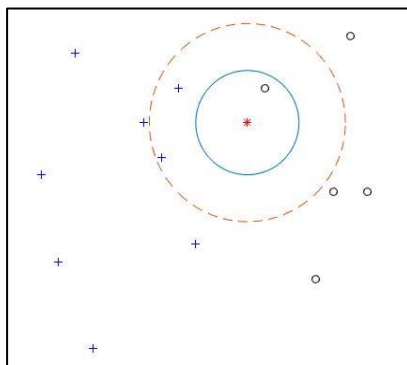


Figura 2. Algoritmo de k -vecinos más cercanos en un espacio bidimensional.

2. Metodología

La primera etapa del desarrollo del sistema corresponde a la investigación exploratoria de las características y capacidades del *hardware* y sistema operativo con respecto a la Raspberry Pi 3. La segunda etapa concierne al desarrollo del sistema de reconocimiento de imágenes y se basa en los requisitos levantados en la primera etapa. En la *Figura 3a* se puede apreciar el proceso de funcionamiento del prototipo desarrollado, mientras que en la *Figura 3b* se aprecia el dispositivo.



a)



b)

Figura 3. a) Sistema automático de reconocimiento de cartas. b) Raspberry Pi 3 modelo B

2.1 Raspberry Pi 3

El sistema embebido Raspberry Pi 3 modelo B es una computadora de placa reducida como lo muestra la *Figura 3b*. Las características principales son su procesador Broadcom BCM2387 *chipset* 1.2 GHz Quad-Core ARM Cortex-A53, su GPU Dual Core VideoCore IV Multimedia Co-Procesador proporciona OpenGL Es 2.0; dispone de una memoria de 1 GB LPDDR2 y la alimentación de energía se realiza a través de un conector Micro USB; su consumo estimado es de 5V, 2.5A. El sistema operativo utilizado es Linux bajo su distribución Raspbian Kernel 4.4 almacenado en una memoria MicroSD de 16 GB y 10 MB/s de velocidad de transferencia. Raspbian Jessie es la distribución *open source* más completa y estable (Monk, 2016). El lenguaje de programación utilizado es Python 2.7 y 3.1 y la librería de visión artificial OpenCV 2.4 y 3.1.

2.2 Dispositivo Óptico

Se utilizó una cámara web USB 2.0 con una resolución de 5 MP 3200 X 2400 a través de un sensor CMOS a color con autoajuste y tasa de transferencia: 480 Mbit/s. Los parámetros a tomar en cuenta durante la adquisición de la imagen son los siguientes: a) Tiempo de integración: mediante la cual las cartas son sometidas a la variabilidad lumínica. b) Tiempo de adquisición: el tiempo que tarda la cámara en transferir la información digital.

2.3 Sistema de iluminación

La iluminación es indispensable en el proceso de la adquisición de la imagen digital, puesto que facilita el análisis y la interpretación de la figura obtenida. Se utilizó un diodo LED de luz blanca de 280 lúmenes y potencia de 4.5 w de 6500K que cumple con las expectativas para controlar los diferentes escenarios a los que puede estar expuesta una imagen.

2.4 Salida de audio

La reproducción del audio como resultado del reconocimiento de la imagen se realiza con la ayuda de una bocina de 2W conectada al jack de audio de 3.5 mm.

2.5 Adquisición de imagen

Una imagen del mundo real, I_C , puede concebirse como una función continua que asigna un valor de intensidad a cada punto del espacio bidimensional, de coordenadas (x, y) (véase la *Ecuación 1*).

$$I_C(x, y) \in R \text{ donde } x, y \in R \quad (1)$$

La imagen digital, discreta, se obtiene tras aplicar un proceso de *muestreo*, que consiste en transformar la matriz I_C en una matriz discreta I_D . Esta última difiere de la primera en que los valores de x e y solo toman valores naturales, pertenecientes a las coordenadas del correspondiente *pixel*

en la pantalla. La matriz I_D correspondiente a una imagen de $N \times M$ pixeles; tiene la estructura mostrada en la *Ecuación 2* (Larcher, Biasoni, & Cattaneo, 2011).

$$I_D(x,y) = \begin{pmatrix} I_D(1,1) & I_D(1,2) & \dots & I_D(1,M) \\ I_D(2,1) & I_D(2,2) & \dots & I_D(2,M) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ I_D(N,1) & I_D(N,2) & \dots & I_D(N,M) \end{pmatrix} \quad (2)$$

Para ser más exactos, una imagen a color se representa mediante *tres* matrices I_D , correspondientes a los canales rojo, verde y azul en el modelo RGB.

La localización de la imagen se especifica por el centro $C(C_x, C_y)$ y la orientación dada por el ángulo Θ , si se tiene en cuenta que toda carta posee simetría en un ángulo de 180° por su característica de doble etiqueta. La orientación es 0° cuando la carta se encuentra paralela al eje de las x (*Figura 4*).

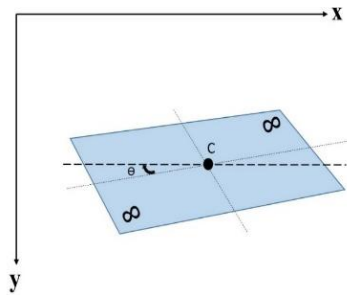


Figura 4. Posición de una carta en la mesa.

2.6 Preprocesamiento

El preprocesamiento de las imágenes en el presente trabajo consistió en la detección de los bordes de la carta. Se entiende por borde al límite que puede tener un objeto o figura y que señala el fin de la superficie en relación con la del medio externo. Una vez determinado su contorno, se puede localizar todo el objeto, así como precisar sus propiedades básicas. La utilización de la información de bordes simplifica en gran medida el análisis de imágenes. Las etapas para la obtención de los bordes se enumeran a continuación y se observan en la *Figura 5*: (a) Imagen original, (b) Escala de grises, (c) Función Gaussiana, (d) Función Canny, (e) Función Morfológica.

La discriminación de otros objetos que no son cuadriláteros se proporciona por la condición de cuatro puntos con respecto a los bordes de la imagen. Se utilizó la implementación del algoritmo de Douglas-Peucker (Bradski & Kaehler, 2008) para dibujar el contorno de la carta. Con las coordenadas obtenidas se trazó el área procesada, mediante las funciones de análisis estructural y descriptores de figuras (Suzuki & Abe, 1985).

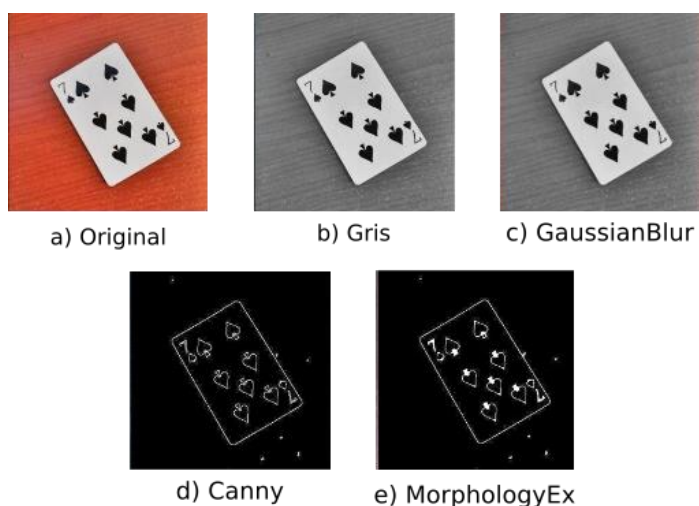


Figura 5. Filtros para la obtención de puntos del cuadrilátero de una imagen.

Para cambiar la perspectiva de las imágenes de las cartas, que aparecen en general como paralelogramos, se aplicó una transformación geométrica (OpenCV Organization, 2014). Dicha transformación convierte los paralelogramos en rectángulos. Posteriormente, se realizó la rotación de la imagen, de manera que la misma aparezca en una orientación horizontal o vertical, a partir de una orientación arbitraria, como se representa en la *Figura 6a*.

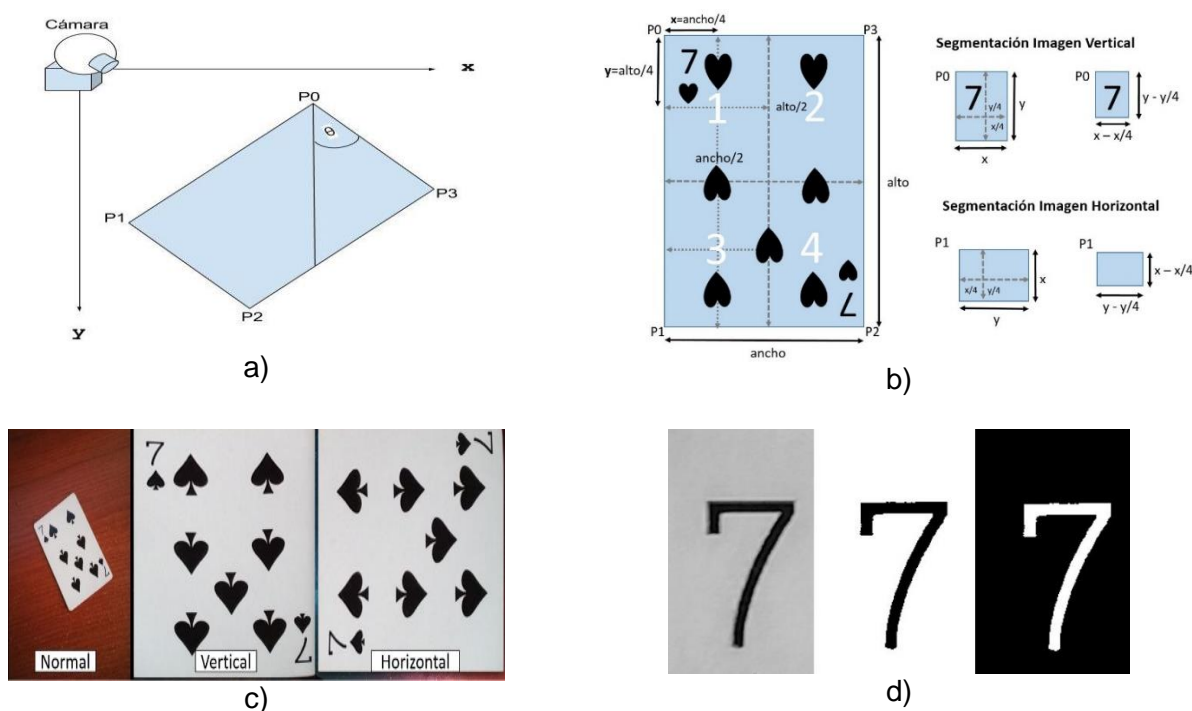


Figura 6. a) Rotación de la carta. b) Segmentación del área de interés. c) Nueva perspectiva y rotación. d) Carácter siete aplicado la operación umbral: imagen normal, umbral binario y umbral binario invertido

Si se toman los puntos en el orden P_0, P_1, P_2, P_3 , la orientación de la imagen es horizontal; caso contrario, si se recogen los puntos en el orden P_0, P_3, P_2, P_1 , la orientación es vertical. El algoritmo de obtención de la imagen con la orientación no distingue qué secuencia de puntos es tomada, debido a este conflicto se deben procesar las dos orientaciones posibles. La rotación de una imagen

dada por el ángulo Θ se representa con la matriz I_p (Ecuación 3) que determina la imagen con la perspectiva transformada.

Para cambiar la orientación de horizontal a vertical o viceversa, se debe aplicar la Ecuación 4 con el ángulo de giro de 90° , donde w y h son el ancho y la altura de la imagen, respectivamente. El resultado de aplicar el cambio de orientación se ilustra en la Figura 6c.

$$I_p = \begin{bmatrix} \cos \Theta & -\sin \Theta \\ \sin \Theta & \cos \Theta \end{bmatrix} \quad (3)$$

$$I_t = \begin{bmatrix} \cos \Theta & \sin \Theta & w \\ -\sin \Theta & \cos \Theta & h \end{bmatrix} \quad (4)$$

2.7 Segmentación

El resultado de este proceso es obtener la región de la carta que contenga la letra correspondiente. Para esto se divide la imagen en dieciséis partes como muestra la siguiente figura. Los puntos para obtener la segmentación del área de interés son las regiones 1 o 4 mientras que las regiones 2 o 3, tienen un área segmentada vacía que será descartada en la etapa posterior. La Ecuación 5 permite entender el proceso de binarización inversa de una imagen, donde $maxval$ representa el valor que tomará el pixel (x, y) si su valor de intensidad es mayor al umbral. En la Figura 6d se ilustra el resultado de este proceso.

$$I_B(x, y) = \begin{cases} maxval & \text{if } I_s(x, y) > \text{umbral} \\ 0 & \text{en otro caso} \end{cases} \quad (5)$$

2.8 Reconocimiento e Interpretación

El algoritmo kNN infiere la clasificación correspondiente a un vector de características x , asignándole la clase C_j correspondiente a los k vecinos más cercanos (o a la mayoría de ellos). Para esto, calcula previamente la distancia entre este vector y todos los vectores del conjunto de entrenamiento. Si R es el número de ejemplos de prueba y S el número de ejemplos de entrenamiento, el algoritmo requiere calcular $R \times S$ distancias.

De este modo, cada instancia de prueba es comparada con todas las instancias de entrenamiento, midiéndose la distancia de ambas. Las instancias correspondientes a los k valores menores se utilizan para predecir la clase de la instancia de prueba (Gutiérrez, Lastra, Bacardit, Benítez, & Herrera, 2016).

En la fase de entrenamiento se usaron un total de 70 imágenes de números de baraja inglesa, tomadas de una base de datos de fuentes (LeCun, Cortes, & Burges, s.f.). Dichas imágenes se procesaron hasta tener imágenes binarias, que fueron transformadas en vectores de características de dimensión 600. Para calcular las distancias se utilizó la definición euclídea dada por la Ecuación 6 (Zapata, Pérez, & Mora, 2014).

$$\|x\| = (\sum_{i=1}^n (x_i)^2)^{1/2} \quad (6)$$

2.9 Parametrización de kNN

Para parametrizar el clasificador kNN se utilizó la aplicación Classification Learner de MATLAB, y se usó un conjunto de entrenamiento de 70 ejemplos (5 por cada clase). Cada ejemplo consta de un vector de características de dimensionalidad 600 y una etiqueta correspondiente a una de las 14 clases (A, K, Q, J, 9, ... ,0). Las variantes ensayadas por la aplicación y los correspondientes resultados se muestran en la *Figura 7*. La opción más viable propuesta por la aplicación es k un vecino más cercano 1NN con una precisión de 95.7 %. La velocidad de precisión fue ~ 260 obs/sec. Métrica de distancia euclídea. El tiempo total del entrenamiento fue de 1.444 segundos.

1.9	☆ KNN	Accuracy: 95.7%
	Last change: Weighted KNN	600/600 features
2	☆ KNN	Accuracy: 87.1%
	Last change: 'DistanceMetric' = 'Hamming'	600/600 features
3	★ KNN	Accuracy: 95.7%
	Last change: 'NumNeighbors' = '1'	600/600 features
4	☆ KNN	Accuracy: 90.0%
	Last change: 'NumNeighbors' = '2'	600/600 features
5	☆ KNN	Accuracy: 91.4%
	Last change: 'NumNeighbors' = '3'	600/600 features
6	☆ KNN	Accuracy: 87.1%
	Last change: 'NumNeighbors' = '4'	600/600 features
7	☆ Ensemble	Accuracy: 95.7%
	Last change: Subspace KNN	600/600 features

Figura 7. Classification Learner Knn de MATLAB

2.10 Clasificación

Se realiza la clasificación mediante matrices de 1xN, donde N es el número de atributos que describen al valor de la carta vertical segmentada. En el proceso de categorización, la función del algoritmo kNN es entregar el valor que representa la clase a la que pertenece la carta de baraja que se encuentra analizando.

2.11. Conversor Text to Speech

Utilizando la API de Google TTS (*Text to Speech*) se transforma el resultado de la clasificación en un archivo de audio mp3, que es reproducido por el dispositivo para informar al usuario no vidente. Para esto se utilizan las librerías de Python gtts y pygame (véase la *Figura 8*).

```

1  from gtts import gTTS
2  import pygame
3  def textoAudio(texto):
4      tts = gTTS(text=texto, lang='es-es')
5      tts.save("audio.mp3")
6      pygame.init()
7      pygame.mixer.music.load("audio.mp3")
8      pygame.mixer.music.play()
```

Figura 8. Código en Python para la conversión de texto a audio

3. Resultados

Las pruebas se realizan cumpliendo las etapas de procesamiento de una imagen como se presentó en la *Figura 1* en los diferentes ambientes a los que estuvo expuesto el sistema de reconocimiento de una carta.

El sistema final brindó la posibilidad de trabajar en ambientes variables, mediante un dióico led de luz blanca para minimizar las variaciones de luminosidad en la imagen de la carta. El comportamiento del sistema al encenderse Raspbian se presenta en los intervalos (0,10] U (63,75] con un rendimiento del CPU de 5.3% y uso de RAM del 26.5%.

El procesamiento del CPU, la memoria RAM y el almacenamiento de la Raspberry Pi 3 bajo la ejecución del sistema automático de reconocimiento de una carta presentan dos etapas, un modo pasivo y un modo activo, como se aprecia en la *Figura 9*.

Modo pasivo

La cámara se encuentra en modo pasivo, cuando el programa se ejecuta y el dispositivo se encuentra a la espera de presionar un botón para capturar una imagen, este momento se presenta en los intervalos (10,20] U (30,40] U (50,60] U (66,75]. El uso del CPU en este instante varía de 7.3% a 13% del total de capacidad de procesamiento. La memoria RAM utilizada para esta operación es del 39%, es decir 362 MB de un total de 925.5 MB, donde solo se ocupan 172.4 MB en el modo pasivo que representa el 18.7% de uso de memoria utilizada por el aplicativo para reconocer las cartas, el resto lo ocupan los procesos del sistema. El almacenamiento del sistema embebido no sufre ninguna variación debido a que todo el proceso de modo pasivo no requiere de lectura o escritura en la microSD.

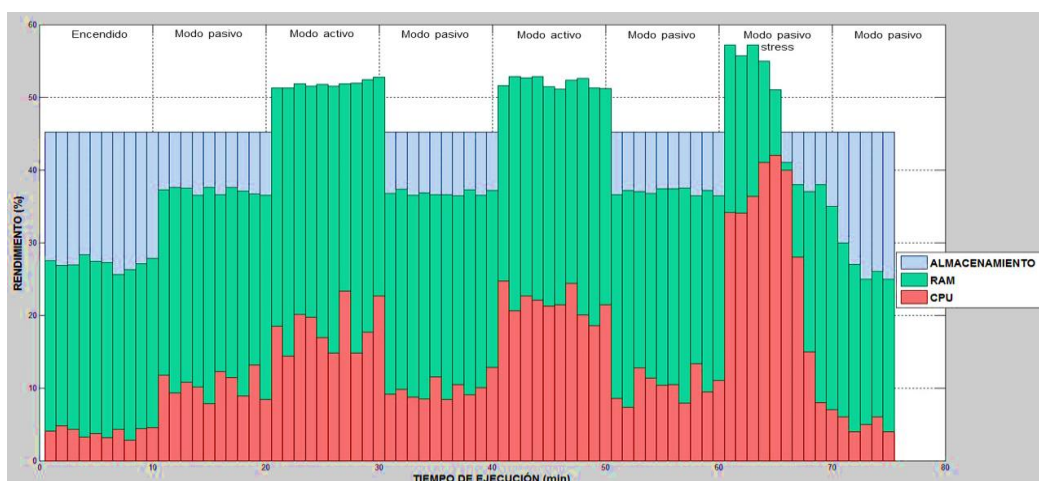


Figura 9. Resultados de las pruebas de rendimiento

Modo activo

El modo activo empieza cuando el sistema embebido realiza las cinco etapas para el procesamiento digital de una imagen en el transcurso de $(20,30]$ U $(40,50]$ donde intervienen los algoritmos expuestos en el apartado 2. El rendimiento del CPU durante el transcurso de predicción varía entre 15% a 25% del total de la capacidad de procesamiento. La memoria RAM utilizada para el modo activo es 52% es decir 481 MB en el cual solo el 28.3% es para uso exclusivo del tratamiento de las imágenes, el resto se divide para la memoria cache 21.2% y el búfer de datos 2.5%. El almacenamiento no se ve afectado debido a que toda imagen se guarda y se sobrescribe, el uso de la microSD es del 45% hasta el momento, que equivale a 7.2 GB de espacio libre de un total de 16 GB el resto de almacenamiento se distribuye entre el sistema operativo y las aplicaciones que vienen por defecto instaladas.

Consecuentemente, en el intervalo de $(60,63]$ se capturaron 360 imágenes en un lapso de 3 minutos para analizar el comportamiento del CPU bajo un período de estrés. Durante este período, el procesamiento del sistema embebido tuvo una respuesta de 41.5% de rendimiento de RAM con un promedio del 37.75% de uso total del CPU. En el intervalo de $(63,66]$ el sistema embebido terminó de realizar las operaciones en el modo pasivo de estrés descrito en el párrafo anterior. La memoria RAM para esta prueba de estrés se mantuvo en 58%, lo que equivale a 536MB. La temperatura del procesador fue de 62.27°C.

4. Discusión

Para la evaluación del clasificador, la selección de las cartas de baraja se realizó de manera aleatoria, sin embargo, también es posible ejecutarla en forma secuencial. El método utilizado fue el método de validación cruzada proporcionada por la herramienta Matlab con sus valores por defecto. La precisión del reconocimiento de las cartas de baraja se estudió a partir de la matriz de confusión. La precisión del sistema de reconocimiento de cartas fue de 95.71% y la clase con más baja exactitud fue la clase J, que fue confundida con las clases 1 y 7 por el clasificador como se muestra en la *Figura 10*.

		CARTAS RECONOCIDAS													
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	A	J	K	Q
CARTAS ORIGINALES	0	100%													
	1		80%										20%		
	2			100%											
	3				100%										
	4					100%									
	5						100%								
	6							100%							
	7								100%						
	8									100%					
	9										100%				
	A											100%			
	J		20%										60%		
	K													100%	
	Q														100%

Figura 10. Matriz de confusión

La bondad de la clasificación para esta clase puede ser evaluada mediante el cálculo de la tasa de verdaderos positivos (VPR) y la tasa de falsos positivos (FPR), definidas mediante las ecuaciones siguientes:

$$VPR = \frac{VP}{VP + FN} \quad (7)$$

$$FPR = \frac{FP}{FP + VN} \quad (8)$$

La matriz de confusión de esta clase, calculada a partir de la matriz general, se muestra en la *Tabla 1*. Se ha llamado aquí “positivas” a las cartas pertenecientes a la clase J, y “negativas” a todas las demás.

Tabla 1. Matriz de confusión de la clase J

	CARTAS RECONOCIDAS		
		P	N
CARTAS ORIGINALES	P	60	40
	N	20	1100

De esta matriz se pueden calcular la tasa VPR y la FPR, como se muestra a continuación:

$$VPR = \frac{60}{60 + 40} = 60\%$$

$$FPR = \frac{20}{20 + 1100} = 1.79\%$$

5. Conclusiones y Recomendaciones

En este artículo se ha desarrollado un sistema automático de reconocimiento de cartas mediante un sistema embebido Raspberry Pi 3 como una alternativa económica, de fácil implementación y baja exigencia computacional. El rendimiento del CPU para este sistema está por debajo del 25% del total de la capacidad de procesamiento; y se utiliza un 28.3% de memoria RAM para realizar todas las operaciones hasta llegar a la clasificación de la carta. El algoritmo de clasificación seleccionado es el de k-NN, con un valor de k igual a 1. Dicho clasificador tuvo una precisión de un 95.71% de efectividad; y fue capaz de reconocer las 14 clases de cartas en diferentes tipos de orientación bajo diferentes condiciones de iluminación con un total de 280 pruebas. El tiempo de respuesta del clasificador en promedio es de 1.785 segundos sin utilizar el *text to speech*, mientras que utilizándolo aumentó 2.983 segundos debido a la generación y reproducción del audio, dando un promedio de respuesta de 4.768 segundos.

El reconocimiento automático de una carta de baraja sobre una mesa corresponde a una de las fases de un proyecto mayor que busca la creación de un dispositivo personal de reconocimiento de cartas a ser utilizado en el juego de cuarenta para personas no videntes. Asimismo, la plataforma

física construida podría ser utilizada en otros proyectos de reconocimiento con visión artificial. El aplicativo puede implementarse en cualquier dispositivo móvil Android debido a su compatibilidad con Kivy Android MV y P4A (Taylor, 2015), en consecuencia, el algoritmo no se limita a funcionar en dispositivos embebidos.

Bibliografía

Bradski, G., & Kaehler, A. (2008). *Learning OpenCV*. O'Reilly Media.

Galindo Durán, C. K., Juganaru-Mathieu, M., Áviles Cruz, C., & Vázquez, H. (2010). Desarrollo de una aplicación destinada a la clasificación de información textual y su evaluación por simulación. *Administración y Organizaciones*, 119-131.

Gutiérrez, P. D., Lastra, M., Bacardit, J., Benítez, J. M., & Herrera, F. (2016). GPU-SME-kNN: Scalable and memory efficient kNN and lazy learning using GPUs. *Information Sciences*, 165-182.

Hayward, D. (14 de marzo de 2014). *CNET*. Obtenido de 25 fun things to do with a Raspberry Pi: <https://www.cnet.com/how-to/25-fun-things-to-do-with-a-raspberry-pi/>

Larcher, L. I., Biasoni, E. M., & Cattaneo, C. A. (2011). ALGORITMO PARA DETECCIÓN DE BORDES Y ULTERIOR. *Mecánica Computacional, Asociación Argentina de Mecánica Computacional*, 2841-2852.

LeCun, Y., Cortes, C., & Burges, C. (s.f.). *THE MNIST DATABASE*. Recuperado el 06 de enero de 2017, de MNIST handwritten digit database: <http://yann.lecun.com/exdb/mnist/>

Lojo, D., Losada, D. E., & Barreiro, Á. (2009). CIE-9-MC Code Classification with knn and SVM. En *Bioinspired Applications in Artificial and Natural Computation* (págs. 499-508). Santiago de Compostela, España: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-02267-8_53

López, G. (2010). *CENSO DE POBLACIÓN Y VIVIENDA (CPV-2010)*. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC), Unidad de procesamiento - Dirección de estudios analíticos estadísticos.

Monk, S. (2016). *Raspberry Pi Cookbook*. O'Reilly Media.

OpenCV Organization. (2014). *Geometric Image Transformations*. Recuperado el 06 de enero de 2017, de OpenCV 2.4.13.2 documentation: http://docs.opencv.org/2.4/modules/imgproc/doc/geometric_transformations.html

- Raikwal, J., & Saxena, K. (2012). Performance Evaluation of SVM and K-Nearest Neighbor Algorithm over Medical Data set. *International Journal of Computer Applications (0975 – 8887)*, 50(14).
- Raspberry Pi Foundation. (2016). *Raspberry Pi*. Recuperado el 06 de enero de 2017, de Raspberry Pi - Teach, Learn, and Make with Raspberry Pi: <https://www.raspberrypi.org/>
- Secretaría del Buen Vivir. (2017). *El Sumak Kawsay*. (Secretaría del Buen Vivir - Gobierno Nacional de la Republica del Ecuador) Recuperado el 06 de enero de 2017, de Secretaría Buen Vivir | Ecuador: <http://www.secretariabuenvivir.gob.ec/el-sumak-kawsay/>
- Sudha, L., & Bhavani, R. (2012). Performance Comparison of SVM and kNN in Automatic Classification of Human Gait Patterns. *INTERNATIONAL JOURNAL OF COMPUTERS*, 6.
- Suzuki, S., & Abe, k. (1985). Topological Structural Analysis of Digitized Binary Images by Border Following. *CVGIP*, 30(1), 32-46.
- Szeliski, R. (211). *Computer Vision Algorithms and Applications*. London: Springer-Verlag. doi:10.1007/978-1-84882-935-0
- Taylor, A. (2015). *Getting Started*. Recuperado el 06 de enero de 2017, de python-for-android 0.1 documentation: <https://python-for-android.readthedocs.io/en/latest/quickstart/>
- Tello, S. (2 de julio de 2014). *Los no videntes cuentan con más dispositivos para desenvolverse*. (Grupo El Comercio) Recuperado el 06 de enero de 2017, de El Comercio: <http://www.elcomercio.com/tendencias/no-videntes-cuentan-mas-dispositivos-desenvolverse.html>
- Wikipedia. (28 de diciembre de 2016). *Wikipedia La enciclopedia libre*. Recuperado el 06 de enero de 2017, de Cuarenta (juego): [https://es.wikipedia.org/wiki/Cuarenta_\(juego\)](https://es.wikipedia.org/wiki/Cuarenta_(juego))
- Zapata, A., Pérez, S., & Mora, J. (2014). Método basado en clasificadores k-NN parametrizados con algoritmos genéticos y la estimación de la reactancia para localización de fallas en sistemas de distribución. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia*, 220-232.

Modelamiento geoestadístico aplicado a la caracterización de yacimientos: modelo basado en Celdas de Alta Resolución

(Applied geostatistics for reservoir characterization: High Resolution Cells based model)

Gonzalo M. Cerón López¹

Resumen:

¿Es extremadamente fácil utilizar geoestadística para caracterizar un yacimiento? ¿Es o no capaz el *software* SGEMS de reproducir las características geológicas de un reservorio en un modelo geoestadístico de alta resolución? Al pasar los años, la geoestadística ha permitido generar modelos de mayor tamaño hasta incrementar el detalle litológico del yacimiento. El presente trabajo muestra una metodología sencilla para la elaboración de un modelo de facies condicionado a un modelo de porosidad, utilizando métodos geoestadísticos de interpolación no lineales en un *software* libre. Para la etapa de elaboración del modelo se tomaron datos de tipo de roca y porosidad de registros eléctricos de 26 pozos de un campo de la Cuenca Oriente. Estos datos fueron cargados en el *software* libre SGEMS, posteriormente, se generó una grilla 3D de alta resolución areal y vertical. Finalmente, se generaron 20 modelos equiprobables de facies y porosidad para seleccionar uno que coteje con las características del reservorio. Como resultado, se obtuvo una grilla de alta resolución que representa el condicionamiento de la porosidad con respecto al modelo de facies.

Palabras clave: Geoestadística; caracterización de yacimientos; SGEMS; variograma; SISIM.

Abstract:

Is it easy to use geostatistics for reservoir characterization or not? Is SGEMS able to reproduce reservoir geological characteristics in a 3D high resolution model? After years, Geostatistics has been allowing high resolution models generation to increase reservoir lithological detail. This work presents a straightforward methodology to create a facies model conditioned with the porosity model. Therefore, Open source geostatistics software was used to interpolate data. Rock type and porosity data, obtained from 26 well-logs of the Oriente Basin, were loaded in SGEMS. A high vertical and areal resolution 3D grid was built. Finally, 20 facies and porosity equiprobable models were generated. The model that better represents the reservoir characteristics was selected. The result is a high-resolution grid that represents the porosity conditioned to a facies model.

Keywords: Geostatistics; reservoir characterization; SGEMS; variogram; SISIM.

¹ Escuela Politécnica Nacional, Quito – Ecuador (gonzalo.ceron@epn.edu.ec)

1. Introducción

La Geoestadística tiene el objetivo de proveer descripciones cuantitativas de variables naturales distribuidas en espacio o tiempo y espacio. Dichas variables exhiben una inmensa complejidad de detalle. Además, por razones económicas, estas variables son a menudo muestreadas muy escasamente y de forma no aleatoria. El hecho que la descripción espacial de un reservorio está sujeta a incertidumbre es generalmente aceptado, pero por algún tiempo dicho hecho tenía resistencia, especialmente por ingenieros que están entrenados para trabajar de forma determinística (Chiles et al., 2012).

No hay una receta completa para la tarea requerida de caracterizar todos los tipos de yacimientos. Usualmente el flujo de trabajo se basa en la disponibilidad de datos, el tamaño anticipado de los recursos y las características del reservorio (Baker, Yarranton & Jensen, 2015). La metodología empleada por varios autores durante décadas ha sido preservada y adaptada de acuerdo con desarrollos tecnológicos (González y Reeves, 2007). Para principiantes puede ser confusa una metodología, por lo tanto, el presente trabajo muestra una simplificada metodología, basada en un flujo de trabajo generalizado, para la elaboración de un modelo de facies y porosidad mediante métodos geoestadísticos de interpolación no lineales en un *software* libre.

Durante los últimos años, se ha empleado *software* libre como una herramienta para generar modelos en 3 dimensiones que representen las características del reservorio. El *software* SGEMS de la Universidad de Stanford contiene herramientas geoestadísticas para la elaboración de un modelo basado en celdas. Las aplicaciones principales comprenden: carga de datos, análisis de datos, variogramas, estimación y simulación. El programa permite la construcción de una grilla rectangular de alta resolución, entre 1 a 100 celdas en dirección vertical. Por lo tanto, al incrementar la resolución vertical incrementa el número de celdas e incluye un mayor detalle litológico al modelo.

Varios autores han desarrollado modelos estáticos con el *software* mencionado; en aquellos trabajos no se observa la inclusión de un modelo de facies. Zhang et al., (2017) en su trabajo genera un modelo geoestadístico del campo Burbank en Oklahoma. Dicho trabajo consta de un modelo de porosidad y permeabilidad, notándose la ausencia de un modelo de facies. Ogbeiwí et al., (2017) en su trabajo realiza un modelo de porosidad y permeabilidad para un caso de estudio de recuperación secundaria de un campo. El autor no presenta resultados del modelo de facies. Finalmente, Zhao et al., (2014) realiza un modelo de espesor, porosidad y permeabilidad. De igual forma, no se incluye un modelo de facies que se encuentre condicionado al modelo petrofísico. Por lo tanto, es necesario preguntarse: ¿Es o no capaz el *software* SGEMS de reproducir las características litológicas de un reservorio en un modelo de facies condicionado a un modelo petrofísico?

2. Metodología

Se define a la geoestadística en un sentido amplio como una técnica estadística que toma en cuenta la relación espacial de variables muestreadas para estimar valores de las variables en ubicaciones no muestreadas (Kelkar. & Pérez. G, 2002).

Para realizar el presente trabajo se construyó un modelo geoestadístico en el *software* libre SGEMS (Stanford Geostatistical Modeling Software). El programa contiene las siguientes características básicas: análisis de datos, análisis variográfico, elaboración de scatterplot, QQ Plots, métodos de interpolación lineales (Kriging Simple, Kriging Ordinario) y condicionales (Simulación Secuencias Indicadora, Simulación Secuencial Gaussiana, entre otros métodos). En la *Figura 1* se describe la metodología empleada para la elaboración del presente trabajo.



Figura 1. Diagrama de Flujo de Trabajo de elaboración de modelo geoestadístico en SGEMS.

Un paso previo a la elaboración de un modelo geoestadístico es la determinación de tipos de roca existentes en el reservorio basado en la información de registros eléctricos y propiedades petrofísicas del reservorio. En este caso, se determinaron tres tipos de roca: No reservorio (0), Sandstone_A (1) y Sandstone_B (2). El tipo de roca (0) NR es de mala calidad con valores de porosidad inferiores a 8 %, el tipo de roca (1) Sandstone_A es de mediana calidad con valores de porosidad entre 7 a 17 % y el tipo de roca (2) con valores de porosidad entre 13 a 26 %.

El siguiente paso es la carga de datos: En la *Figura 2* se observa la información de datos de porosidad de facies de 26 pozos entre verticales y horizontales. Esta información proviene de los datos interpretados de registros eléctricos, posteriormente, cargados en formato gslib (*.*).

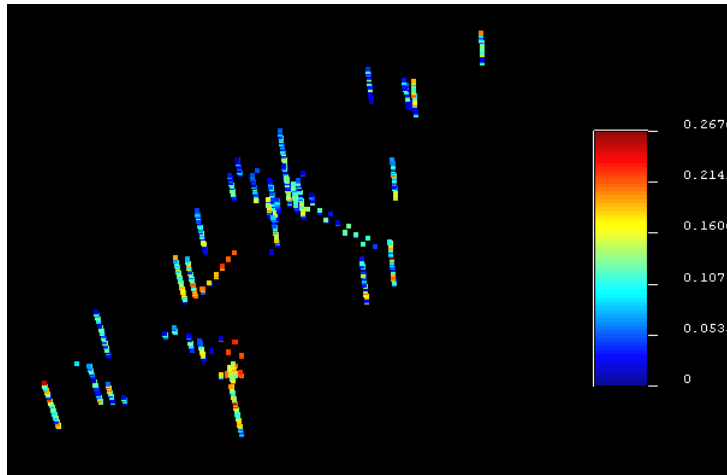


Figura 2 Datos de pozo de Porosidad cargado en SGEMS.

Análisis de datos.- Una vez validada y cargada la información, se procede a realizar un análisis univariado de datos. El principal objetivo es revisar la existencia de datos anómalos que puedan generar errores en el modelo. En este caso, se observa la proporción correspondiente a los tres tipos de roca NR (43%), Sandstone_A (40%) y Sandstone_B (13%) (Figura 3a). Además, se visualiza una distribución bivariada de datos de porosidad (Histograma-derecha), donde claramente se puede diferenciar la distribución de los datos de porosidad para los diferentes tipos de roca (Figura 3b).

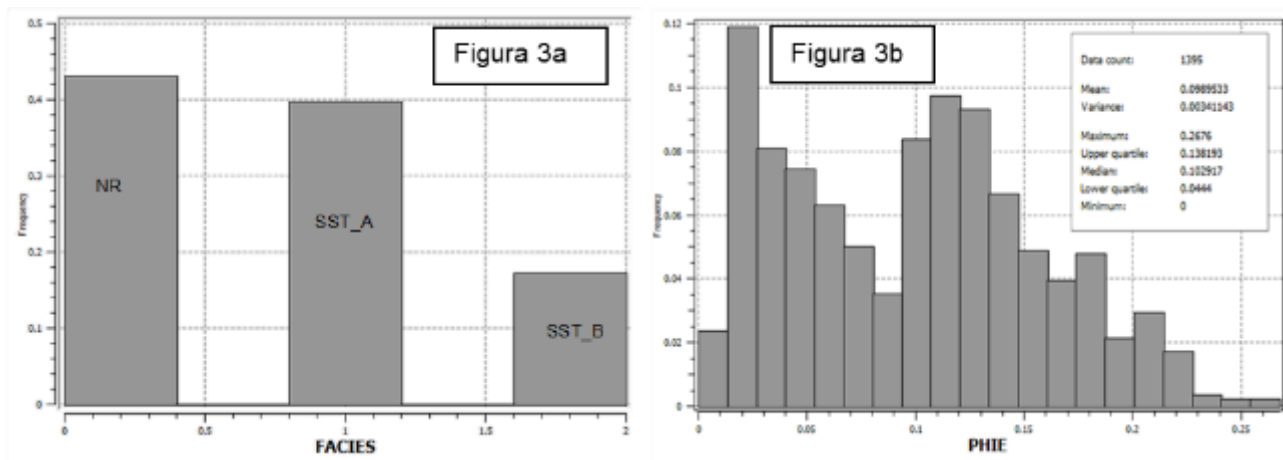


Figura 3. Análisis univariado de datos en SGEMS.

Análisis bivariado de datos.- Se realizó un análisis bivariado de datos para determinar la distribución de porosidad para cada tipo de roca. En la Figura 4 se observan las distribuciones para los diferentes tipos de roca. Indiscutiblemente, se puede concluir que la arenisca de mejor calidad Sand_B posee valores mucho más altos de porosidad, el tipo de roca Sand_A posee propiedades medias y No Reservorio valores bajos de porosidad.

Análisis variográfico.- El primer procedimiento geoestadístico es obtener un variograma relacionado con una correlación regional de los parámetros de interés (Ozturk & Nasuf, 2002). Los pasos de la metodología son: modelar variogramas experimentales en los cuales se

establecen las direcciones principales de continuidad basado en un conocimiento previo de geología. Posteriormente, se ajusta el variograma experimental a un variograma teórico. De esta manera se incorpora al modelamiento el resultado del cálculo variográfico en diferentes direcciones (Gringarten & Deutsch,1999).

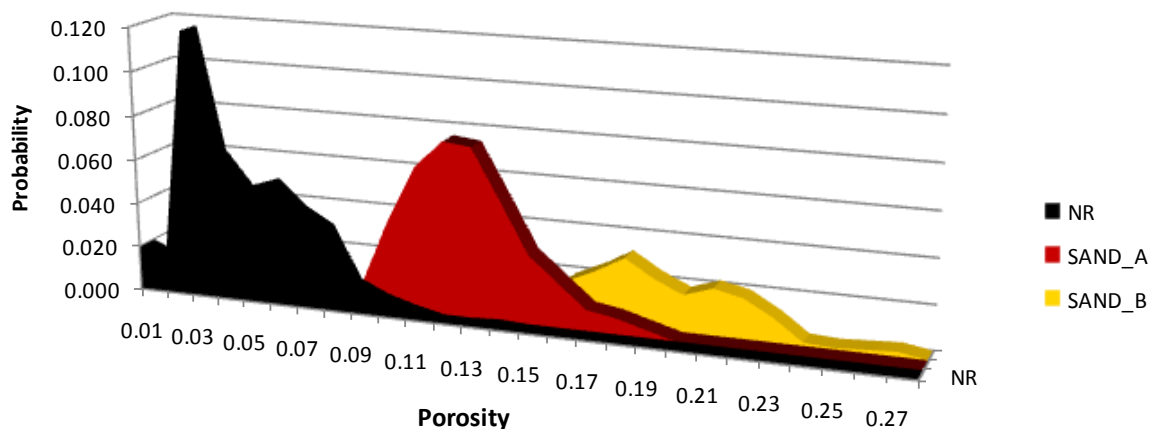


Figura 4. Análisis bivariado de datos.

En este caso, debido a la distribución espacial de los datos (*Figura 6 - Grid Boundary*), donde se observa claramente que existe tendencia en dirección norte-sur, la irregularidad en la distribución espacial de los datos no permite determinar variogramas en el resto de direcciones. Por lo tanto, se realizó el análisis variográfico en dirección norte-sur y se obtuvieron valores de rango y umbral. Dichos valores obtenidos son asumidos para el resto de direcciones y se genera así un modelo adireccional. Debido a la gran cantidad de información vertical, proveniente de los registros eléctricos, se pueden construir fácilmente variogramas verticales. La *Figura 5* muestra el modelo variográfico utilizado en la interpolación (Kriging Ordinario) para poder generar el modelo de facies y porosidad.

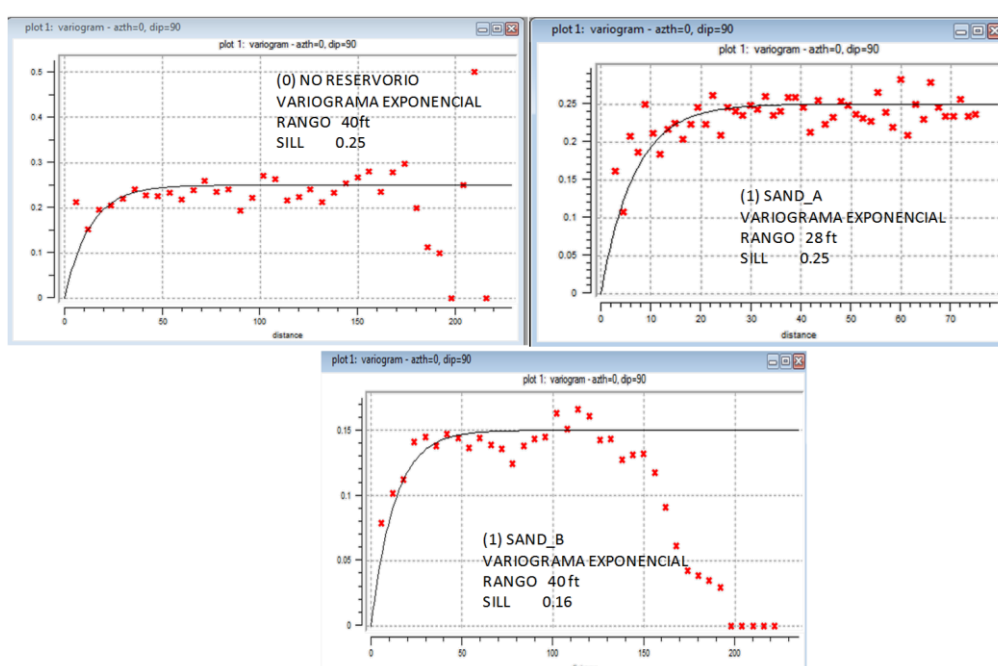


Figura 5. Análisis variográfico de datos – Variogramas Verticales.

Construcción de la grilla geostatística. - una grilla de dimensiones 140x226x50 en dirección x, y, z respectivamente, con un tamaño de 25x25 metros en forma areal y 6 ft en dirección vertical es generada. La grilla geostatística contiene aproximadamente 1'500000 celdas. Por lo tanto, se considera una extensión areal de 3500 metros x 5650 metros, además, un espesor de la formación de 300 pies, donde se asegura que la información vertical se encuentre dentro de la grilla y los datos de cada pozo contengan un espaciamiento adecuado (*Figura 6*).

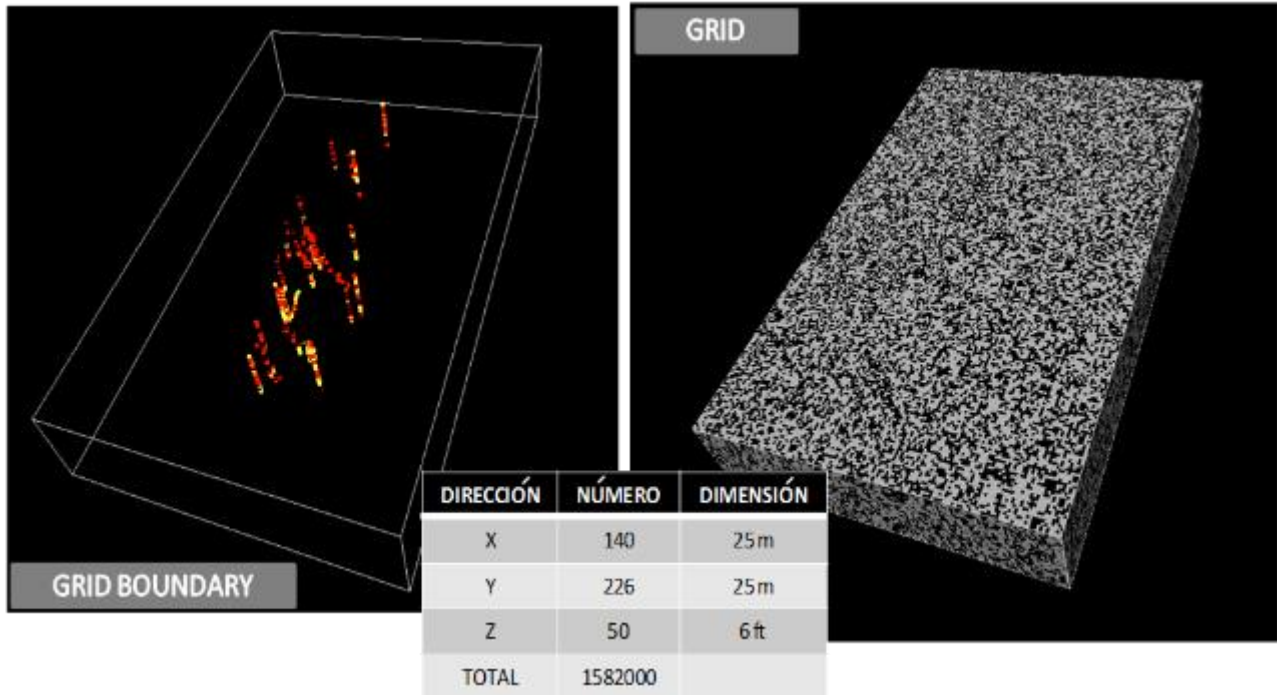


Figura 6. Boundary de la grilla (izq.) - Grilla (Der)-Celdas(Inferior) en SGEMS.

Posteriormente, se aplican los métodos de interpolación condicionales SISIM y COSGSIM. Para generar el modelo de facies, interpolación de los diferentes tipos de roca (datos discretos), se utiliza el método SISIM (Sequential Indicator Simulation). Mientras que, para elaborar el modelo de porosidad, interpolación de datos continuos, se utiliza el método COSGSIM (Sequential Gaussian co-Simulation). El método COSGSIM permite realizar el poblamiento de datos de porosidad en las celdas mediante el método de interpolación Kriging Ordinario, a su vez condiciona los datos al modelo de facies previamente generado (Remy, Boucher & Wu, 2009). En la *Figura 7* se observa el modelo de porosidad condicionado al modelo de facies.

El Kriging Ordinario es un método de interpolación que va a poblar la grilla en función de las variables aleatorias regionalizadas. Este procedimiento se lo realiza para modelar las diferentes propiedades de la roca. El proceso de Kriging interpola valores para una grilla de puntos basado en un ponderado de los puntos que rodean al valor desconocido (Syrjanen & Loven, 1999).

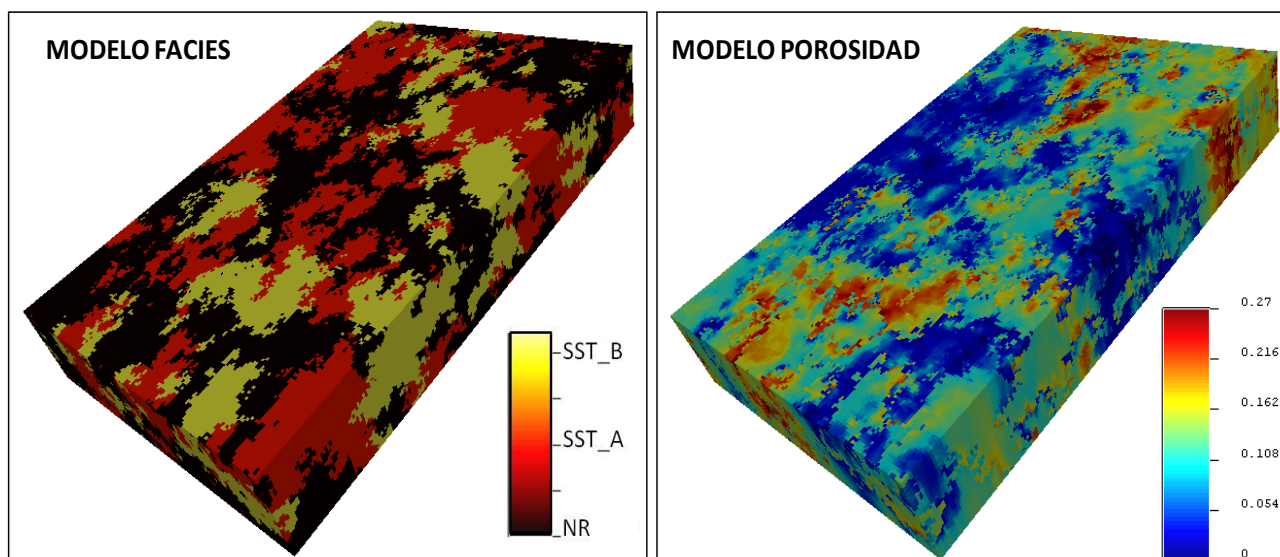


Figura 7. Modelo de facies y porosidad en SGEMS.

Finalmente, se obtiene como resultado varias simulaciones geoestadísticas. De las 20 realizaciones generadas se selecciona aquella o aquellas que logren representar los datos de tipo de roca y porosidad provenientes de los registros eléctricos. En la *Figura 8* se observan las simulaciones o realizaciones de facies generadas mediante el método de interpolación SISIM.

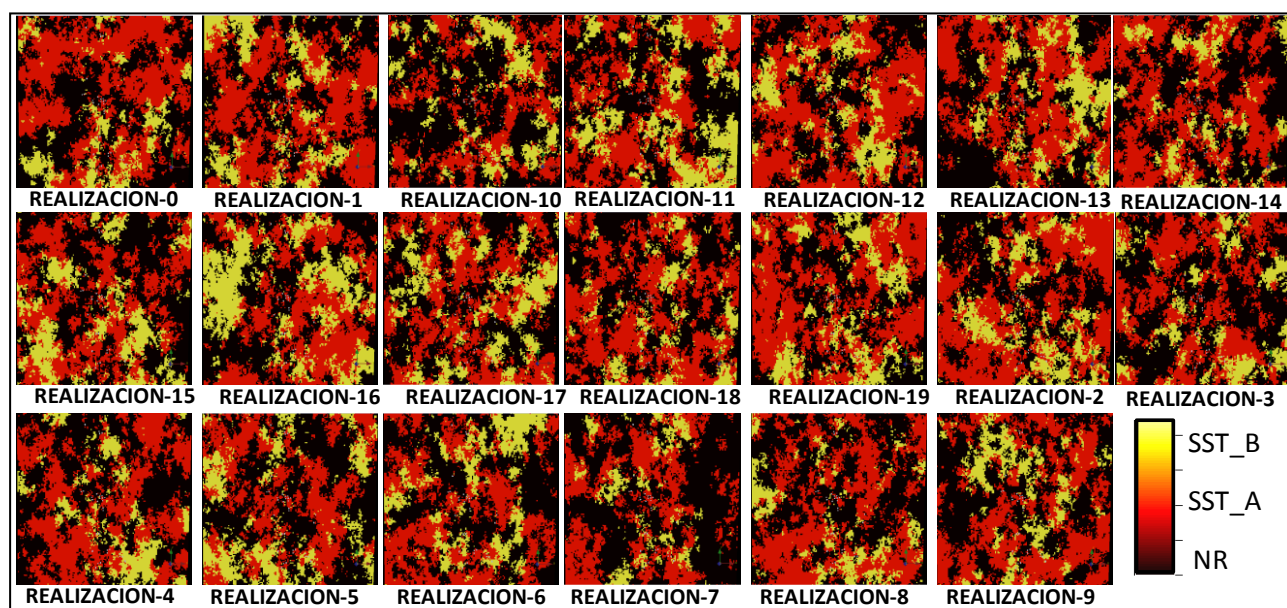


Figura 8. Modelo de facies - 20 realizaciones - layer 30 - SGEMS.

Mediante la validación cruzada se procede a comparar el modelo de porosidad y facies. En este caso, se utiliza un gráfico QQ Plot, para determinar la correspondencia de los datos que se poblaron en la grilla geoestadística con los datos duros de los registros de pozos. En la *Figura 9* se observa que, de los 20 modelos generados, la simulación número 8 es aquella que más se ajusta a los datos de pozo utilizados en el poblamiento de la grilla.

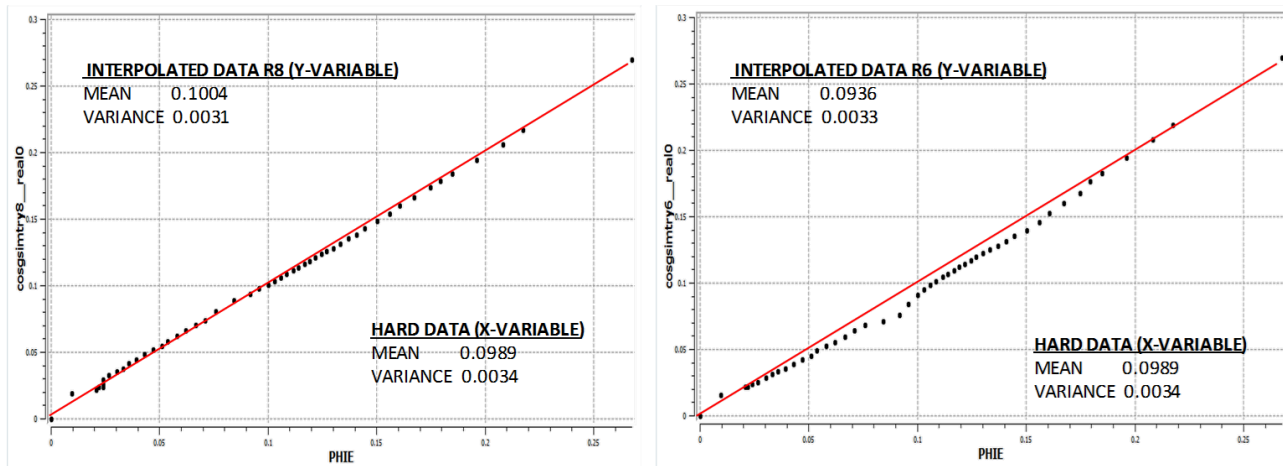


Figura 9. QQ Plot - Data interpolada en celdas versus *hard data*- Simulación 8 (izq.) y R6 (der.) - SGEMS.

3. Resultados

Como resultado, se obtienen 20 simulaciones de facies y porosidad, de las cuales se han seleccionado aquellas que mediante un análisis con un gráfico QQ Plot reproducen de manera similar la data dura de porosidad. Además, se realiza un análisis capa por capa para seleccionar aquella simulación que reproduzca de mejor manera el condicionamiento modelo de porosidad - modelo de facies.

En la *Figura 9* se observan dos gráficos QQ Plot de dos simulaciones resultado diferentes. La simulación 8 muestra una correlación entre datos interpolados con datos duros de una pendiente igual a uno. Por tal motivo, el valor promedio y la distribución de los datos tienen valores muy cercanos. Mientras que en la simulación 6 se observa que la distribución de los datos y los valores promedios varían considerablemente. En la *Figura 10*, se observa los histogramas de la realización 8 y los datos duros provenientes de los registros eléctricos. La Simulación Gaussiana, reproduce la distribución de los datos para cada tipo de roca.

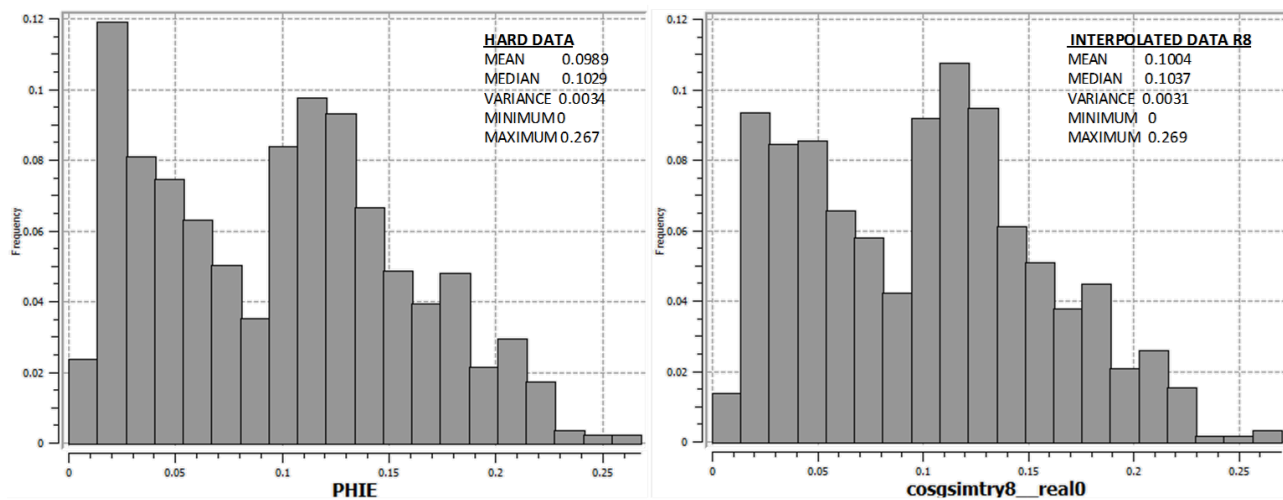


Figura 10. Histogramas - Distribución Porosidad-Data dura de pozo (izq.) - Simulación 8 (der.) - SGEMS.

La Cosimulación Secuencial Gaussiana (COSGSIM) condiciona los datos de porosidad de los registros de pozos con el modelo de facies previamente generado mediante SISIM. En la *Figura 11* se observa una sección vertical o corte de la grilla geoestadística. Se puede visualizar el condicionamiento de la porosidad con el modelo de facies en el poblamiento de las celdas de la grilla. Esto garantiza que nuestro modelo tenga un alto grado de coherencia tanto en la interpretación vertical como areal.

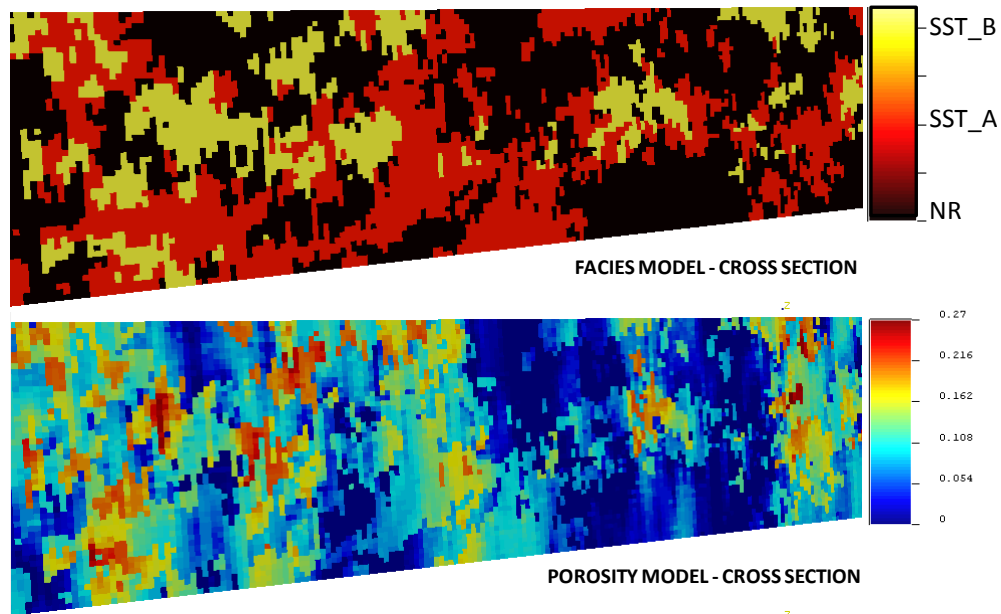


Figura 11. Cross Section - Modelo Facies y Modelo Porosidad- Simulación 8 - SGEMS.

Una vez se ha realizado el análisis de validación cruzada, se procede a realizar una revisión de intervalos perforados de los pozos productores más representativos (Tasa de fluido). En la *Figura 12* se observa el análisis realizado para 3 pozos del campo (Well-A, Well-B y Well-C) en función de sus intervalos productores (color verde). En los diferentes casos, se puede observar que la simulación 8 reproduce las características geológicas y valores de porosidad del reservorio. Por lo tanto, se asegura la existencia de fluidos en el medio poroso al momento de realizar el proceso de ajuste a historia del modelo dinámico.

3. Discusión

El trabajar con software libre para realizar un modelo geoestadístico siempre tiene sus limitaciones. Por ejemplo: la grilla debe ser rectangular, no se puede ajustar con precisión topes y bases. Por tal motivo, existe poca confiabilidad del modelo en zonas donde no existan suficientes muestras, no así en zonas donde exista una gran cantidad de ellas. Al trabajar con *software* comerciales que son mucho más desarrollados, se obtienen una visualización más amigable. A pesar de aquello, el *software* libre SGEMS ofrece una amplia gama de herramientas geoestadísticas que lo convierten en un programa apto para ser utilizado de forma educativa y en proyectos de investigación.

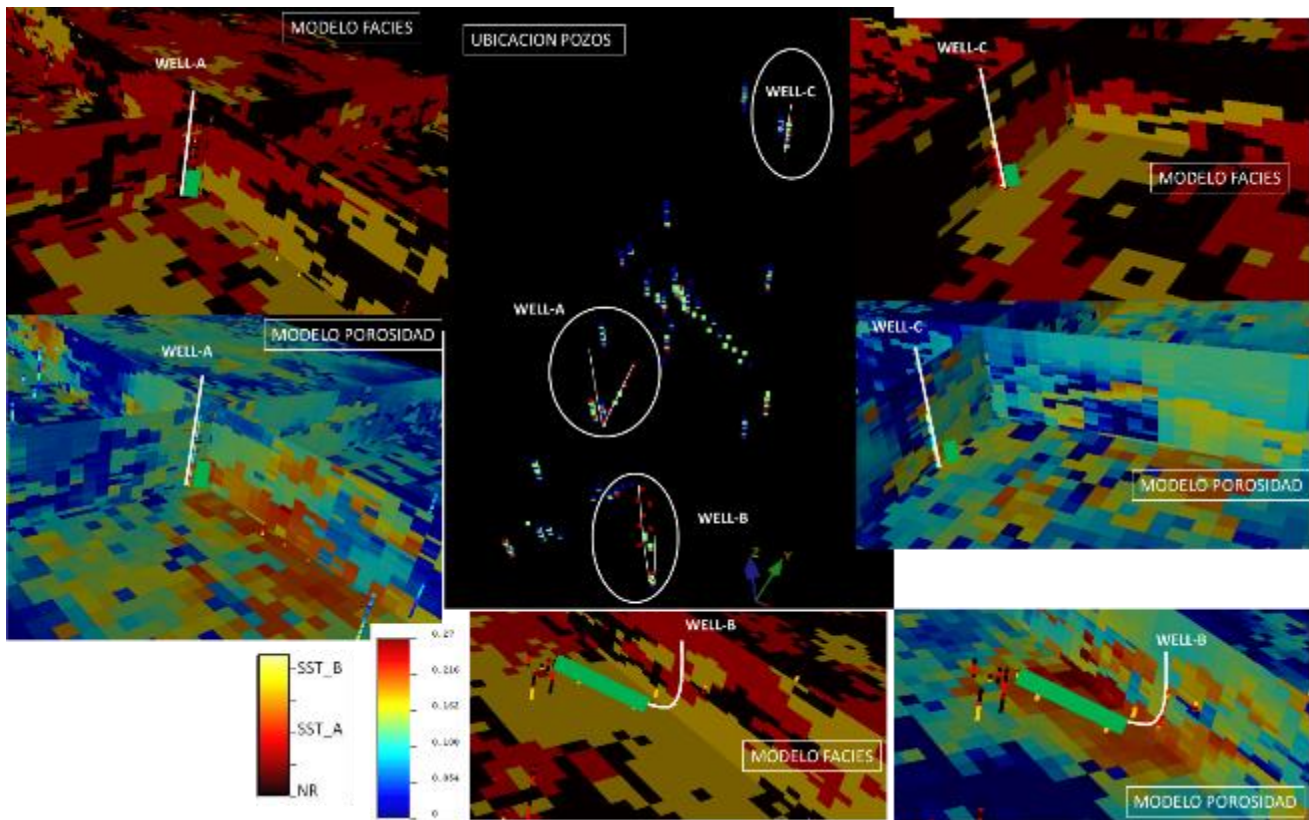


Figura 12. Cross Section - Modelo Facies y Modelo Porosidad- Simulación 8 - SGEMS.

La *Figura 13* muestra un corte de la grilla geoestadística en dirección este-oeste. Se observa un modelo de facies, generado con un *software* comercial de licencia académica (TNavigator -RFD), que incluye la estructura del reservorio (Izquierda-Parte superior) versus el modelo generado con SGEMS (Izquierda-Parte inferior). Además, se observa la zona de interés (Derecha), donde existe una gran cantidad de información de tipo de roca de los pozos del campo. Se evidencia una zona de muy baja calidad en ambos modelos, T superior, seguido de una zona continua de buena calidad (SST_A y SST_B) que representa a T inferior.

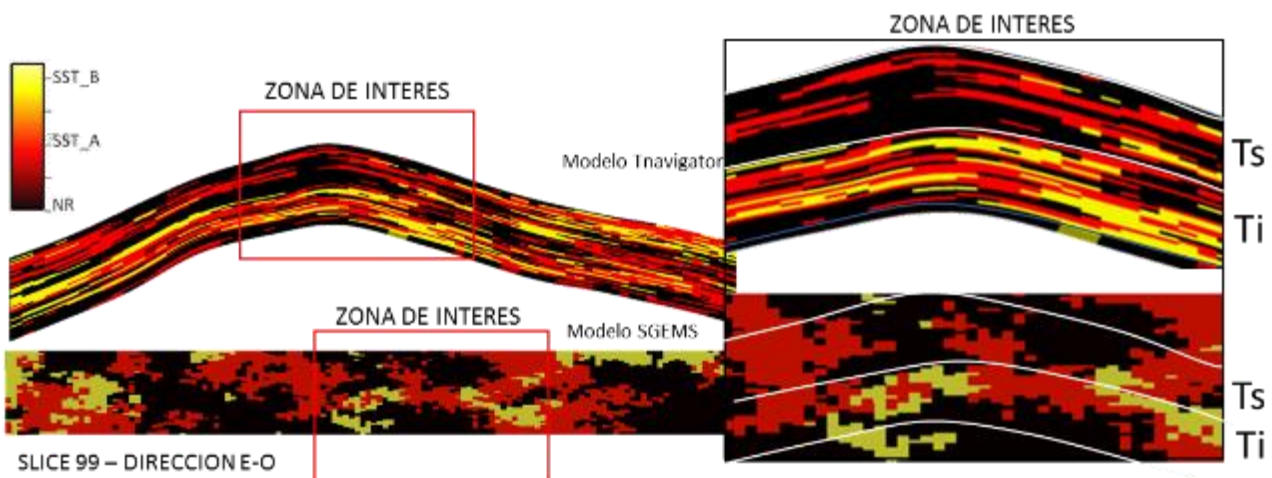


Figura 13. Cross Section - Modelo Facies – Tnavigator (Superior) – SGEMS (Inferior) - Simulación 8.

4. Conclusiones y Recomendaciones

Es posible generar una grilla de alta resolución 140 x 226 x 50 en dirección x, y, z. Obteniéndose un total de alrededor de 1500000 celdas. De esta forma se garantiza una resolución areal y vertical muy detallada para la construcción de la grilla geoestadística y preservar las características del reservorio.

El modelo geoestadístico generado con el *software* SGEMS, no incluye la estructura del yacimiento. Para mayor detalle, se comparó el resultado con un modelo generado por un *software* comercial (TNavigator) que incluye dicho aspecto fundamental. A pesar que el *software* libre no considera la estructura mantiene una coherencia en sus resultados, sobre todo en la zona donde se tienen más muestras o datos de tipo de roca de pozos.

La técnica de simulación condicional utilizada para interpolar la porosidad (simulación secuencial gaussiana) ajusta su resultado al modelo de facies generado previamente mediante la simulación secuencial indicadora.

La *Figura 9* (QQ Plot) de la simulación 8 muestra una distribución de la data donde la relación de los datos entre el valor estimado (Eje Y) y valor duro o verdadero (Eje X) forman una recta de pendiente igual a 1 (45°). Una cantidad similar de valores de porosidad son ligeramente sobrestimados y otros ligeramente subestimado. No así, el ejemplo de la simulación 6 que no representa las características de estacionaridad en la cual se basa la geoestadística.

El presente modelo geoestadístico es una base para realizar un modelo dinámico de reservorios, donde se determina si la simulación seleccionada de los modelos de facies y porosidad son correctos, caso contrario se procede a seleccionar otra simulación.

Bibliografía

- Baker, R., Yarranton, H. y Jensen, J. (2015). *Practical Reservoir Engineering and Characterization: Introduction*. Oxford. Elsevier.
- Chiles, J. y Delfiner, P. (2012). *Geostatistics_ Modeling Spatial Uncertainty*. (2da Edición). New Jersey. Wiley Series.
- González, R. y Reeves, S. (2007). *Geostatistical Reservoir Characterization of the Canyon Formation, SACROC Unit, Permian Basin*. Advanced Resources International. Report for U.S. Department of Energy.
- Gringarten, E. y Deutsch C.V. (1999). *Methodology for Variogram Interpretation and Modeling for Improved Reservoir Characterization*. Society of Petroleum Engineers. Paper 56654. Disponible: <https://www.onepetro.org/search/>

- Kelkar, M. y Pérez, G. (2002). *Applied Geostatistics for Reservoir Characterization*. Richardson. Society of Petroleum Engineers.
- Ogbeiwi, P., Aladeitan, Y. y Udebhulu, D. (2017). *An approach to waterflood optimization: case study of the reservoir X*. Journal of Petroleum Exploration Production Technology, Disponible: [https://DOI 10.1007/s13202-017-0368-5](https://DOI.10.1007/s13202-017-0368-5)
- Ozturk, C.A., Nasuf, E. (2002). *Geostatistical assessment of rock zones for tunneling*. Tunn Undergr Space Technol 17(3):275–285.
- Remy, N., Boucher, A. y Wu, J. (2009). *Applied Geostatistics with SGEMS*. New York. Cambridge University Press: 139.
- Syrjanen, P. and Loven, P. (1999). *Geostatistics and Block Modelling in rock mechanics*. 9th ISRM Congress. International Society of Rock Mechanics. Paris, France. 503-506.
- Zhang, M.L., Zhang, Y.Z. and Yu, G.M. (2017) *Applied Geostatistics Analysis for Reservoir Characterization Based on the SGeMS (Stanford Geostatistical Modeling Software)*. Open Journal of Yangtze Gas and Oil, 2, 45-66. Disponible: <https://doi.org/10.4236/ojogas.2017.21004>
- Zhao, S., Zhou, Y., Wang, M., Xin, X. y Chen, F. (2014). *Thickness, porosity, and permeability prediction: comparative studies and application of the geostatistical modeling in an Oil field*. Environmental Systems Research, 3:7. Disponible: <http://www.environmentalsystemsresearch.com/content/3/1/7>

Extracción purificación y caracterización de inhibidores de tripsina provenientes de semillas andinas

(Extraction purification and characterization of trypsin inhibitors from Andean seeds)

Patricio Castillo¹, Lorena Quinchuela¹, Paulina Echeverría¹, Gonzalo Jácome¹

Resumen:

El presente trabajo determinó las mejores condiciones para inmovilizar covalentemente tripsina en una matriz de sepharosa, con el fin de aplicarla en la purificación de inhibidores de la misma proteasa. Los mayores valores de retención de actividad funcional y de actividad enzimática inmovilizada se obtuvieron en una matriz de Sepharosa 6B-CL a temperatura ambiente, a un pH de 10,5, con una carga enzimática de 25 mg/mL de matriz, en un tiempo mínimo de inmovilización de 12 h, para alcanzar un preparado inmovilizado estable. Posteriormente, se seleccionaron los inhibidores de tripsina más activos a través de la comparación de extractos provenientes de semillas de amaranto (*Amaranthus caudatus L.*), arveja (*Pisum sativum*), lupino o “chocho” (*Lupinus mutabilis*), fréjol (*Phaseolus vulgaris*) y sangorache (*Amaranthus hybridus L.*) que fueron purificados parcialmente mediante ultrafiltración centrífuga, tratamiento calórico y precipitación con TCA. El permeado y retenido de sangorache fueron los extractos inhibidores más activos y se purificaron selectivamente, por separado, mediante cromatografía de afinidad en la matriz de tripsina-glioxil-sepharosa 6B-CL. Su caracterización cinética determinó la presencia de dos inhibidores; el inhibidor I que correspondió a una inhibición competitiva y el inhibidor II, a una de tipo mixta.

Palabras clave: inhibidores de tripsina; inmovilización covalente; *Amaranthus hybridus L.*

Abstract:

This work established the conditions of covalent immobilization of trypsin on a Sepharose matrix, which could be applied for the purification of trypsin inhibitors. The higher values of retention of enzymatic activity and immobilized enzymatic activity were obtained with a Sepharose 6B-CL matrix, at room temperature, a pH value of 10.5, an enzymatic load of 25 mg/mL, and a minimum immobilization time of 12 hours, in order to obtain a stable immobilization. The most active trypsin inhibitors were selected through the comparison of, extracts obtained from the seeds of amaranth (*Amaranthus caudatus L.*), pea (*Pisum sativum*), lupine or “chocho” (*Lupinus mutabilis*), bean (*Phaseolus vulgaris*) and “sangorache” (*Amaranthus hybridus L.*). The inhibitors were partially purified using centrifugal ultrafiltration, heat treatment, and TCA precipitation. The permeated and retained fractions of “sangorache” were selected as the most active trypsin inhibitors, and they were selectively purified using affinity chromatography in a Trypsin - Glyoxyl - Sepharose 6B-CL matrix. The kinetic characterization showed the presence of two inhibitors; the first one corresponded to a competitive inhibitor, while the second one behaved as a mixed inhibitor.

Keywords: Trypsin inhibitor; covalent immobilization; *Amaranthus hybridus L.*

¹ Escuela Politécnica Nacional, Quito – Ecuador ({patricio.castillo, lorena.quinchuela, paulina.echeverria, gonzalo.jacome} @epn.edu.ec)

1. Introducción

Los inhibidores de proteasas (IPs) son proteínas de bajo peso molecular, comunes en el reino vegetal (Habib y Majid, 2007), donde actúan como parte de los mecanismos de defensa de las plantas, ya que inhiben la actividad de las proteasas digestivas como tripsina y quimotripsina, de insectos y otros organismos pequeños, de forma que provocan la pérdida de aminoácidos esenciales, que altera su normal crecimiento (Elizalde, Portilla y Chaparro, 2009).

La obtención y purificación de IPs tienen un alto potencial en varios campos, en especial en la agricultura, puesto que su aplicación como bioinsecticidas específicos puede remplazar a productos sintéticos nocivos para el ambiente (García et al., 2009; Habib y Majid, 2007).

La tripsina es una proteasa que posee una triada catalítica en su centro activo, constituida por residuos de serina, histidina y ácido aspártico, lo que permite la hidrólisis específica de péptidos o proteínas con residuos de lisina y arginina (Müller, 2008). Su uso tiene algunas ventajas a escala industrial, pero se ha visto restringida debido a su termolabilidad, solubilidad en el medio de reacción y pérdida de actividad proteolítica (Tripathi, 2009).

Con el fin de extender sus aplicaciones, la inmovilización covalente, a través de la unión entre la enzima y un soporte capaz de reaccionar con ella, ha permitido reducir las limitaciones que pueden ser causadas por condiciones de operación agresivas, como valores de pH lejanos al óptimo, agitación excesiva o elevadas presiones (Koolman y Röhm, 2004). Adicionalmente, el proceso de inmovilización permite obtener un preparado capaz de ser empleado en la purificación de inhibidores de proteasas, mediante cromatografía de afinidad (Del Monte et al., 2014).

La purificación de los IP puede ser complicada, usualmente se encuentran dentro de las hojas, el tallo o las raíces de las plantas aunque están en mayor proporción en las semillas; por lo cual, son necesarios protocolos que permitan obtener de formas más puras estos elementos. Dentro de las técnicas de mayor selectividad se encuentra la cromatografía de afinidad ya que por su alta eficiencia permite obtener a los inhibidores con elevada pureza; esta técnica aprovecha la afinidad biológica reversible entre los inhibidores y las enzimas sobre las que actúan. Este protocolo es ampliamente usado por su corto tiempo de operación, alta capacidad de selección y porque permite procesar volúmenes considerables de muestra (Dos Santos et al., 2012).

Debido a que algunos estudios señalan que las semillas de cereales y leguminosas andinas presentan altos contenidos de inhibidores de tripsina (Elizalde, Portilla y Chaparro, 2009; Ramírez y Rangel, 2011), en la presente investigación se planteó obtener y caracterizar extractos inhibidores de tripsina purificados por cromatografía de afinidad, en una matriz de tripsina-glioxil-sepharosa a partir de semillas de amaranto (*Amaranthus caudatus* L.), arveja (*Pisum sativum*), chocho (*Lupinus mutabilis*), fréjol (*Phaseolus vulgaris*) y sangorache (*Amaranthus hybridus* L.), que pueden ser utilizados en la formulación de potenciales bioinsecticidas.

2. Metodología

2.1. Materiales

Las semillas de amaranto (*Amaranthus caudatus* L.), arveja (*Pisum sativum*, var. I-432-Lojanita), chocho (*Lupinus mutabilis*, var. I-450-Andino), fréjol (*Phaseolus vulgaris*, var. I-414-Yunguilla) y sangorache (*Amaranthus hybridus* L.), fueron obtenidas del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Se empleó tripsina en polvo de marca GIBCO; el sustrato enzimático BApNA, la sepharosa 4B-CL y 6B-CL y glicidol fueron marca SIGMA. Todos los reactivos empleados superan el 98 % de pureza.

2.2. Preparación de la matriz de afinidad

2.2.1. Activación de la sepharosa

Se activaron 75 g de sepharosa en medio básico y reductor, con 35 mL de hidróxido de sodio 1,7 M y 1,016 g de borohidruro de sodio. Con el fin de obtener gliceril-sepharosa, se agregaron 25 mL de glicidol y se mantuvo en agitación constante durante 16 h. Al cabo de este tiempo, se filtró y lavó con agua destilada la gliceril-sepharosa obtenida. Posteriormente, se añadió una solución de peryodato de sodio 0,12 M y se agitó la mezcla durante 1 h para conseguir glioxil-sepharosa. Finalmente, se realizaron seis lavados con agua destilada, que fueron recolectados para la consecuente determinación del grado de oxidación de la sepharosa (Freije et al., 2005). La cantidad de peryodato de sodio presente en las fracciones obtenidas en los lavados de la sepharosa se determinó de acuerdo con la técnica descrita por Bonzón (1996).

2.2.2. Selección del tamaño de poro en el proceso de inmovilización covalente

La selección de cada uno de los parámetros de inmovilización se realizó con base en tres variables de respuesta: el porcentaje de retención de actividad funcional (%RAF), el porcentaje de enzima inmovilizada %EI y el porcentaje de actividad enzimática inmovilizada %AEI. Estos parámetros se calcularon de acuerdo con las ecuaciones descritas por Li, Gao, Wei, Qu, Ma y Zhou (2010).

Para seleccionar el tamaño de poro de la sepharosa, se colocaron 10 mL de solución enzimática, equivalentes a 28 mg de tripsina/mL de sepharosa, con 3 mL de glioxil-sepharosa a pH 10 y temperatura ambiente (15 °C). Se emplearon dos tamaños de poro, correspondientes a la sepharosa 4 B-CL y 6 B-CL, previamente activadas. Se mantuvo el contacto entre la enzima y el soporte durante 24 h. Posteriormente, se filtró y lavó el preparado inmovilizado. Se redujo la tripsina inmovilizada con borohidruro de sodio, durante 30 min, en baño de hielo para finalmente filtrar y lavar tres veces el preparado con soluciones amortiguadoras de TrisHCl 0,1 M pH 8, acetato 0,1 M pH 4 y borato 0,1 M, pH 10 (Bonzón, 1996; Del Monte et al., 2014).

2.2.3. Definición de la temperatura en el proceso de inmovilización covalente

Se inmovilizaron durante 24 h, 10 mL de solución enzimática de 28 mg/mL de matriz y pH 10, con 3 mL del soporte de tamaño de poro previamente seleccionado, a dos temperaturas, de 15 y 35 °C. Los procesos de reducción y lavado del preparado inmovilizado se realizaron de la manera descrita en la sección anterior.

2.2.4. Influencia de la carga enzimática y del pH en el proceso de inmovilización covalente

El efecto de las combinaciones de pH y carga enzimática se definieron mediante un diseño experimental de composición central con dos factores; los rangos de experimentación fueron para el pH de 8 a 12 y para la carga enzimática de 25 a 85 mg tripsina/mL sepharosa (Montgomery, 2003).

La temperatura y tipo de sepharosa empleados fueron los determinados mediante los ensayos anteriores. Además, el tiempo de inmovilización, el proceso de reducción y los lavados del preparado se ejecutaron de acuerdo con la sección 2.2.2.

2.2.5. Determinación del mejor proceso de inmovilización covalente

Se inmovilizó tripsina por 24 h a las condiciones de tamaño de poro, pH, temperatura y carga enzimática determinadas en las secciones anteriores. Durante este tiempo, se tomaron alícuotas del sobrenadante cada h y se midieron sus actividades proteolíticas. Se ajustaron los datos a una regresión de decaimiento exponencial y se estableció el mínimo tiempo de inmovilización, que correspondió al tiempo en el que alcanza la insolubilización y la estabilización de la interacción covalente.

2.3. Aplicación de la matriz tripsina glioxil-sepharosa en la purificación de inhibidores enzimáticos

2.3.1. Obtención de extractos clarificados

Las semillas fueron molidas hasta obtener una harina fina, que posteriormente fue desengrasada mediante extracciones sólido-líquido con 1-propanol, en una relación peso:volumen 1:4, en intervalos de 30 min. La extracción se repitió hasta que el filtrado no presentó turbidez. La harina desengrasada fue secada a 30 °C por 16 h (Betancur, Guerrero, Hernández y Marrufo, 2012).

Los extractos crudos se prepararon con la suspensión de la harina seca en tampón fosfato de sodio 50 mM, con una relación 1:5 durante 1,5 h, con agitación constante. Se eliminó el material insoluble mediante centrifugación a 835 × g durante 30 min. El extracto fue fraccionado por ultrafiltración centrífuga, en primer lugar con una membrana Millipore con un tamaño de poro de 50 kDa, durante 40 min a 2 000 × g; finalmente, con una membrana Millipore con un tamaño de

poro de 10 kDa, durante 40 min a $1\ 163 \times g$. Se denominó, retenido a las fracciones superiores a 10 kDa y permeado a aquellas con pesos moleculares inferiores a este valor (Chávez et al., 2011).

Los permeados y retenidos de cada semilla fueron purificados mediante un tratamiento combinado; se empleó en primer lugar, un tratamiento calórico, en el cual se sometió a los extractos a calentamiento en baño María, durante 30 min a 60 °C; seguido de un proceso de precipitación de proteínas con ácido tricloro acético (TCA), en una relación 1:5. El TCA fue removido de las muestras mediante filtración en gel en una columna PD-10, Sephadex G-25M, Pharmacia (Chávez et al., 2011).

Para caracterizar a los extractos antes y después de la purificación se determinaron la actividad enzimática, actividad inhibidora, concentración de proteína y actividad inhibidora específica. La actividad de tripsina se determinó por el método de Earlander et al. (1961) con la hidrólisis del sustrato BApNA seguida a 400 nm (Castillo, Gómez, Sinche, Duchicela y Muñoz, R., 2012). La actividad inhibidora (AI) se determinó como la diferencia en la actividad enzimática de tripsina en presencia y ausencia del inhibidor. La concentración de proteína ([P]) se estableció con el método de absorción en el ultravioleta a 280 nm (Aitken y Learmonth, 2002). La actividad inhibidora específica (AIE) se calculó como la relación entre la AI y [P] de cada muestra; este parámetro se consideró para elegir a los inhibidores de tripsina más activos en los permeados y retenidos.

2.3.2. Purificación de los inhibidores de tripsina más activos mediante cromatografía de afinidad

Se preparó la matriz de afinidad tripsina-glioxil-sepharosa 6B-CL y se empacó este gel en una columna del equipo para cromatografía; se lavó el sistema con solución tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7,5, durante 30 min. Se alimentaron 5 mL del extracto semipurificado con mayor actividad de tripsina. Los inhibidores fueron eluidos con una solución de KCl-HCl 1 M pH 1,9. Se recogieron fracciones de 3 mL, de forma continua. Los picos de fracciones con AI y [P] fueron agrupados en lotes que fueron liofilizados a una temperatura de 67 °C y un vacío de 10 Pa.

2.3.3. Caracterización de los inhibidores de tripsina más activos

Se realizó la caracterización cinética con la determinación de la constante de Michaelis-Menten (K_m), velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) y constante de inhibición (K_i).

Con el fin de determinar estos parámetros, se midió la actividad enzimática de tripsina en ausencia de inhibidor y en presencia de iguales volúmenes de alícuotas de los picos A, B, C, D, E y F, frente a soluciones del sustrato BApNA en concentraciones 0,58; 0,96; 1,34; 2,11; 2,87 mM. A través del método de Lineweaver-Burk, se determinaron K_m y $V_{m\acute{a}x}$. Finalmente, con el análisis de estos dos parámetros se determinó la K_i (Nelson y Cox, 2014).

2.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados correspondientes a %EI, %AEI, %RAF, AI, [P] y AIE fue realizado mediante un ANOVA y la prueba de rangos múltiples por el método de Fisher, con un nivel de confianza del 95 %, con el uso del paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI.

3. Resultados y Discusión

3.1. Preparación de la matriz de afinidad

3.1.1. Selección del tamaño de poro en el proceso de inmovilización covalente

Antes de inmovilizar la tripsina, al activar la sepharosa 4B-CL y 6 B-CL y se obtuvieron los grados de oxidación (GOM) de $216,66 \pm 7,30$ y $220,59 \pm 9,71$ $\mu\text{mol NaIO}_4/\text{mL}$ matriz, respectivamente. Se realizó un análisis de varianza para estos resultados y se encontró que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los GOM, por lo tanto el tamaño de poro no influye en el proceso de activación; por lo que, se presume que se formó aproximadamente el mismo número de grupos carbonilo en el soporte. Para seleccionar el tipo de sepharosa se emplearon los dos soportes activos para inmovilizar la tripsina y se encontraron las variables de respuesta que se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. %RAF, %EI y %AEI para tripsina inmovilizada en sepharosa 4 B-CL y 6 B-CL

Variable de respuesta	Sepharosa 4B-CL	Sepharosa 6B-CL
%RAF	$25,78 \pm 0,68^A$	$33,03 \pm 1,31^B$
%EI	$89,28 \pm 1,28^C$	$91,20 \pm 2,33^C$
%AEI	$87,68 \pm 3,49^D$	$96,43 \pm 0,54^E$

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 3)

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas (Fisher, 95 % de confianza)

Los mayores valores de %RAF y %AEI se obtuvieron con sepharosa 6B-CL. Asimismo, los %EI fueron iguales para los dos niveles de tamaño de poro. Esto indica que el preparado inmovilizado en sepharosa 6B-CL presenta mayor actividad proteolítica; probablemente porque la tripsina se fijó en la superficie fuera de los poros de la matriz, lo que pudo disminuir las dificultades difusionales, que podría provocar el proceso de inmovilización (Da Silva et al., 2012). Al obtener mayores valores de las variables de respuesta, se decidió trabajar con sepharosa 6B-CL en los ensayos posteriores.

3.1.2. Definición de la temperatura en el proceso de inmovilización covalente

Los valores obtenidos de las variables de respuesta, luego de la inmovilización en sepharosa 6B-CL a 15 y 35 °C, se muestran en la *Tabla 2*.

Tabla 2. %RAF, %EI y %AEI para tripsina inmovilizada a 15 y 35 °C

Variable de Respuesta	Temperatura	
	35 °C	15 °C
%RAF	22,29 ± 1,20 ^A	33,03 ± 1,31 ^B
%EI	87,79 ± 1,09 ^C	91,20 ± 2,33 ^C
%AEI	98,72 ± 0,17 ^D	96,43 ± 0,54 ^E

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 3)

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas (Fisher, 95 % de confianza)

Se encontró diferencia significativa entre los valores de %RAF y %AEI al inmovilizar la enzima a 15 y 35 °C. Se obtuvo un %RAF mayor al emplear la temperatura de 15 °C, en tanto que ocurrió lo contrario con el %AEI. Debido a que el %RAF toma en cuenta la actividad del preparado inmovilizado y mostró mayor valor a 15 °C, se escogió esta temperatura para buscar la mejor carga enzimática y el pH de trabajo.

3.1.3. Influencia de la carga enzimática y del pH en el proceso de inmovilización covalente

En la *Tabla 3*, los parámetros %RAF, %AEI, %EI para las combinaciones pH y carga enzimática planteados por el diseño de composición central con dos factores.

Tabla 3. Parámetros %RAF, %AEI y %EI a diferente carga enzimática y valores de pH

Carga (mg/mL)	pH	% RAF	%AEI	%EI
25,0	10,0	35,17	95,26	88,94
33,7	8,6	17,51	59,56	91,29
33,7	11,4	24,83	97,47	95,27
55,0	8,0	19,74	64,32	85,48
55,0	10,0	23,73	91,64	89,03
55,0	10,0	23,27	93,19	88,97
55,0	10,0	22,85	93,60	89,09
55,0	12,0	22,72	98,60	91,90
76,3	8,6	11,94	43,12	90,39
76,3	11,4	24,42	95,69	89,38
85,0	10,0	12,03	67,56	87,69

Según los valores tabulados, el mayor %RAF fue 35,17, que se obtuvo a pH 10 y carga de 25 mg/mL de matriz. El análisis de varianza evidenció que la carga enzimática influye significativamente sobre la variable de respuesta (%RAF). También se encontró que la actividad proteolítica directa no presenta diferencias proporcionales con relación al incremento de la carga, es así que para las cargas 25,0; 55,0 y 85,0 mg/mL se obtuvieron valores de actividad directa de 4,71; 6,43 y 6,03 mU/mL de matriz, respectivamente.

Como se observa en la *Tabla 3*, los mayores valores de %AEI se obtienen al trabajar en medio más alcalino. El análisis estadístico determinó que el único factor que presentó diferencia significativa, a un nivel de confianza del 95%, fue el pH. Así también la *Tabla 3* indica los

valores de %EI los cuales mediante el análisis estadístico muestran que no existen diferencias significativas con la variación del pH y carga enzimática.

El máximo valor de %RAF estimado mediante la opción estadística “Optimizar Respuesta” que ofrece el Stagraphics Centurion XVI se encuentra en la *Tabla 4*.

Tabla 4. Valores de pH y carga enzimática determinados para maximizar el %RAF

Factor	VALOR		
	Bajo	Alto	Calculado
pH	8,00	12,00	10,50
Carga (mg/mL)	25,00	85,00	25,00
Valor máximo para %RAF			29,27

Los valores resultantes de la optimización para obtener el máximo %RAF son 25 mg/mL de enzima inmovilizada a pH 10,5. El medio básico es necesario para la unión covalente entre los grupos amino de la enzima y los grupos aldehído del soporte. Sin embargo, cuando se sobrepasa el límite de pH predicho por el modelo, es probable que predomine el fenómeno de desnaturalización de la tripsina, que produciría pérdida de la actividad directa.

3.1.4. Determinación del mejor proceso de inmovilización covalente

La *Figura 1* muestra el decaimiento de la actividad enzimática en el sobrenadante durante el tiempo de inmovilización.

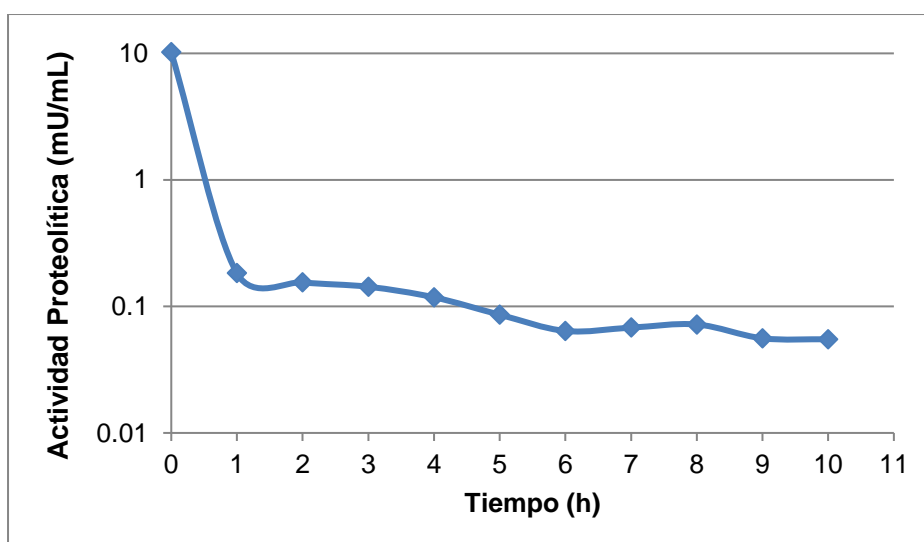


Figura 1. Correlación de decaimiento entre la actividad proteolítica del sobrenadante y el tiempo de inmovilización

La *Figura 1* señala que el mínimo tiempo de contacto entre la enzima y el soporte debería ser 1 h, aunque Rocha, Goncalves y Teixeira, (2011) afirman que durante este período se produciría la insolubilización de la tripsina en el soporte pero la fase de interacción covalente requiere

tiempos mayores a 10 horas; la razón de este comportamiento radica en que durante esta segunda fase ocurre el alineamiento entre los grupos amino de la tripsina y los carbonilo aldehídico del soporte (Da Silva et al., 2012). Con base en este criterio se decidió fijar un tiempo mínimo de inmovilización igual a 12 horas.

La purificación de inhibidores de tripsina procedentes de las semillas de amaranto, arveja, chocho, fréjol y sangorache utilizó ultrafiltración centrífuga, tratamiento calórico, precipitación de proteínas con TCA y cromatografía de afinidad en la matriz de afinidad tripsina-glioxil-sepharosa preparada en las mejores condiciones establecidas en esta sección. Los extractos crudos de los inhibidores se realizaron a partir de la suspensión de la harina desengrasada de las semillas en tampón fosfato de sodio.

3.2. Aplicación de la matriz en la purificación de inhibidores enzimáticos

3.2.1. Selección de los inhibidores de tripsina más activos en los extractos clarificados

Los extractos crudos de cada semilla se fraccionaron en permeados y retenidos mediante ultrafiltración centrífuga, con una membrada de 10 kDa y se purificaron parcialmente por medio de un tratamiento calórico ($T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$) combinado con precipitación de proteínas con TCA (5%).

En la *Tabla 5* se muestran los resultados de la actividad inhibidora específica (AIE) alcanzado luego del proceso de purificación parcial, también se muestra el análisis estadístico realizado por la prueba de rangos múltiples con un nivel de confianza del 95%, para tres repeticiones con cada semilla.

Tabla 5. AEI de los permeados y retenidos purificados con tratamiento calórico y precipitación con TCA

Semilla	AIE (mU/mg)	
	Permeados	Retenidos
Amaranto	17,74 ± 0,91 ^C	31,47 ± 1,55 ^{AB}
Arveja	14,33 ± 1,42 ^B	36,73 ± 1,81 ^C
Chocho	9,01 ± 0,58 ^A	30,40 ± 0,88 ^A
Fréjol	14,77 ± 0,45 ^B	33,66 ± 2,14 ^B
Sangorache	19,22 ± 0,40 ^C	39,88 ± 0,69 ^D

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 3)

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (Fisher, 95 % de confianza)

La purificación se evidenció con el incremento de la actividad inhibidora específica, como consecuencia de un incremento de la actividad inhibidora y una disminución de la concentración de proteína en todos los extractos, que se podrían atribuir a la eliminación de proteínas que no aportan a la actividad inhibidora.

Sobre la base del valor de actividad inhibidora específica alcanzado, se seleccionaron al permeado y al retenido semipurificados del extracto de sangorache, con valores de actividad de

19,22 ± 0,40 y 39,88 ± 0,69 mU/mg respectivamente, para siguiente etapa de purificación mediante cromatografía de afinidad.

3.2.2. Purificación de los inhibidores de tripsina más activos

La cromatografía se desarrolló con una matriz de afinidad tripsina-glioxil-sepharosa 6B-CL, obtenida con un %EI de 88,95, un %AEI de 95,26 y un %RAF de 35,7. Se empleó el mismo procedimiento para el permeado y retenido de la semilla de sangorache.

En la *Figura 2*, se muestra el cromatograma obtenido en la purificación del permeado de sangorache.

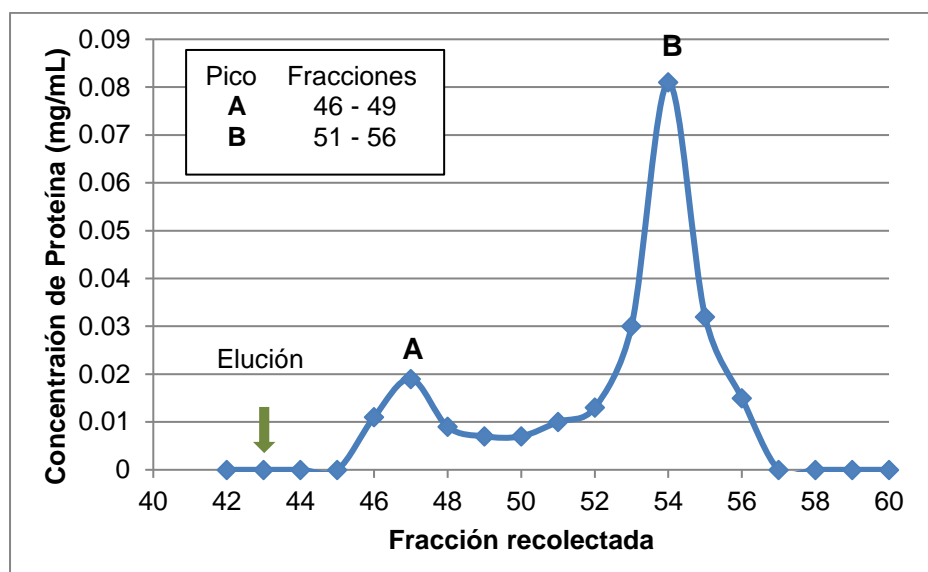


Figura 2. Cromatograma del permeado de sangorache purificado.

Como se observa, después de la elución, se formaron dos picos A y B. Con las fracciones correspondientes se formó un lote con cada pico para determinar los parámetros de control. En la *Tabla 6*, se indican los resultados de la concentración de proteína, actividad inhibidora y actividad inhibidora específica de los lotes A y B.

Tabla 6. Actividad inhibidora, concentración de proteína y actividad inhibidora específica de los lotes obtenidos del permeado < 10kDa

Permeado				
Lote	Volumen (mL)	[P] (mg/mL)	AI (mU/mL)	AIE (mU/mg)
A	12	0,012	12,82	1114,6
B	18	0,030	9,07	300,6

Como se observa en la *Tabla 6*, los lotes A y B, que corresponden a las proteínas que se retuvieron en la matriz, muestran diferentes actividades inhibidoras específicas de tripsina, que podrían estar relacionadas con la existencia de dos inhibidores en el permeado de sangorache.

Se repitió el procedimiento de purificación para el retenido de la semilla de sangorache y se obtuvo el cromatograma que se observa en la *Figura 3*.

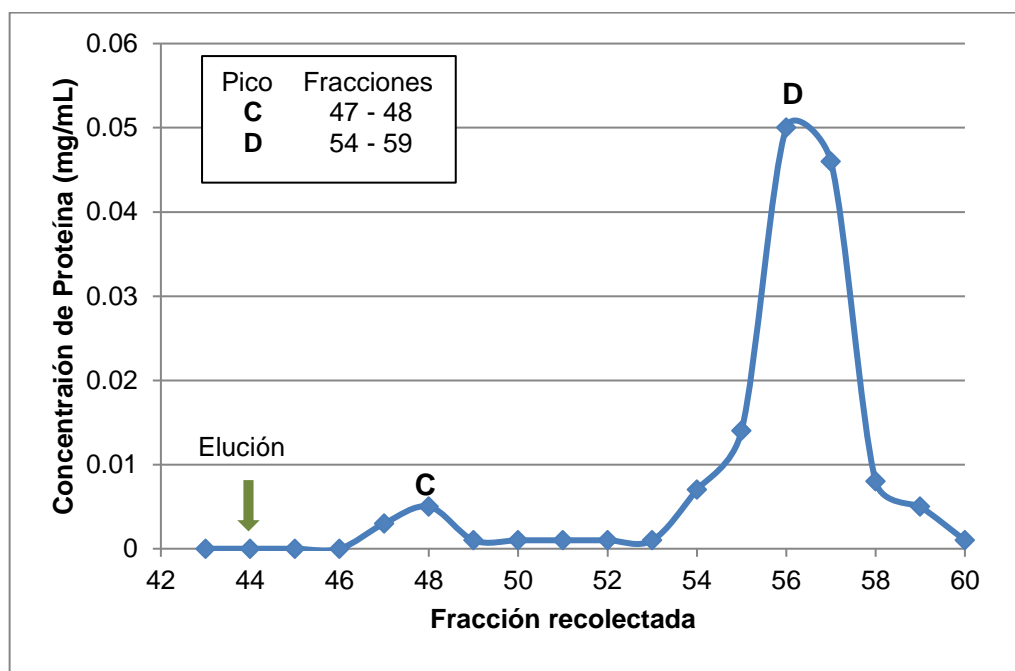


Figura 3. Cromatograma del retenido de sangorache purificado

De igual forma que en el permeado, luego de la elución se formaron 2 picos C y D. Con las fracciones correspondientes se formó un lote con cada pico para determinar los parámetros de control. En la *Tabla 7*, se indican los resultados de la concentración de proteína, actividad inhibidora y actividad inhibidora específica de los lotes C y D.

Tabla 7. Actividad inhibidora, concentración de proteína y actividad inhibidora específica de los lotes obtenidos del retenido > 10 kDa

Lote	Retenido			
	Volumen (mL)	[P] (mg/mL)	AI (mU/mL)	AIE (mU/mg)
C	6	0,004	13,15	3288,33
D	18	0,022	9,99	461,07

3.2.3. Caracterización de los inhibidores de tripsina más activos

En la *Tabla 8*, se muestran los parámetros cinéticos de $V_{máx}$ y K_m determinados en ausencia de inhibidor y con alícuotas de los lotes A, B, C y D, mediante el método de linealización de Lineweaver-Burk.

Sobre la base del análisis de los parámetros cinéticos $V_{máx}$ y K_m , se podría determinar la presencia de dos inhibidores en el extracto de sangorache. El Inhibidor I, en el Lote A y el Inhibidor II, en el lote B del permeado y los lotes C y D del retenido.

Tabla 8. Parámetros cinéticos determinados sin inhibidor y en presencia de los lotes A, B, C y D

	Parámetro	
	V _{máx} (U/mL)	K _m (mM)
Sin inhibidor	4,73 ± 0,27 ^A	11,80 ± 0,87 ^A
Lote A	4,73 ± 0,28 ^A	16,47 ± 0,71 ^B
Lote B	2,65 ± 0,26 ^B	8,53 ± 0,19 ^C
Lote C	2,65 ± 0,64 ^B	8,42 ± 1,35 ^C
Lote D	2,73 ± 0,23 ^B	8,54 ± 0,39 ^C

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 3)

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (Fisher, 95 % de confianza)

A continuación, se compararon los valores de K_m y V_{máx} de los inhibidores y se observó que el Inhibidor I, no tuvo influencia sobre V_{máx}, pero provocó un incremento en K_m y por tanto se determinó el valor de K_i, como inhibidor competitivo. Además, el Inhibidor II generó una disminución en V_{máx} y K_m, por lo cual se trató de un inhibidor mixto y se calcularon las constantes de inhibición K_i' para la unión del inhibidor con el complejo enzima sustrato y K_i de la unión entre la enzima y el inhibidor (Nelson y Cox, 2014). En la *Tabla 9* se muestran los valores de K_i' y K_i para los dos tipos de inhibidores.

Tabla 9. Constantes de inhibición obtenidas para los inhibidores encontrados en el extracto de sangorache

	Inhibidor I	Inhibidor II
Tipo de inhibición	Competitiva	Mixta
K_i' (mM)	-	0,101
K_i (mM)	0,066	0,274

Al igual que la constante de Michaelis-Menten, que se considera como una medida del grado de afinidad entre la enzima y el sustrato, la constante de inhibición también brinda una idea de la relación existente entre la enzima y el inhibidor; de esta forma, mientras menor es su valor, mayor es su afinidad.

En la *Tabla 9* se observa que la constante de inhibición (K_i) es menor en el Inhibidor 1, lo que sugiere mayor afinidad con la enzima; al contrario de lo que se muestra en el Inhibidor II, donde la K_i', que representa la interacción entre el inhibidor II y el complejo enzima-sustrato, es mayor a K_i, que simboliza la relación entre el mismo inhibidor con la enzima, por lo cual se podría decir que este inhibidor afecta de forma más significativa la disociación del complejo enzima-sustrato para la formación del producto (Voet y Voet, 2005).

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1. Conclusiones

Con base en el modelo matemático obtenido del análisis estadístico de las variables %EI, %AEI y %RAF, en la inmovilización de tripsina en sepharosa 6B-CL, a 15 °C, se determinó que a un valor de pH de 10,5 y una carga de 25 mg/mL se alcanzarían valores máximos de 85,5; 98,1 y 29,27, respectivamente.

Los inhibidores de tripsina más activos fueron encontrados en el permeado de la semilla de sangorache con una AIE de $19,22 \pm 0,4$ mU/mg y en el retenido de la misma semilla con un valor de $39,88 \pm 0,69$ mU/mg.

La purificación por cromatografía de afinidad del permeado de la semilla de sangorache permitió obtener lotes con AIE de 1114,6 y 300,6 mU/mg; y, en el caso del retenido se obtuvieron lotes con AIE de 3288,3 y 461,1 mU/mg.

La caracterización cinética de las fracciones inhibidoras principales mostró que existen dos tipos de inhibidores, uno competitivo (K_i : 0,066 mM) y otro mixto (K_i' : 0,101 mM, K_i : 0,274 mM).

4.2 Recomendaciones

Se sugiere purificar por cromatografía de afinidad a los inhibidores presentes en las semillas de arveja, amaranto, chocho y fréjol, ya que también presentaron actividad inhibidora de tripsina.

Se recomienda estudiar el diseño de bioinsecticidas a partir de los inhibidores específicos obtenidos, ya que tendrían un mínimo impacto sobre otros organismos benéficos que se encuentren en el ecosistema.

Bibliografía

- Aitken, A. y Laermonth, M. (2002). *Protein determination by UV absorption*. En Walker, J. (Ed.). *Protocols Handbook* (pp. 3-6). Totowa, Estados Unidos: Humana Press Inc
- American Psychological Association. (2012). *Publication manual of the American Psychological Association*. Washington, DC: American Psychological Assoc.
- Betancur, D., Guerrero, L., Hernández, V. y Marrufo, D. (2012). *Inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina I con hidrolizados proteicos de Jatropha curcas*. *Bioquímica clínica latinoamericana*, 46(3), 385 – 393. Obtenido de <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v46n3/v46n3a06.pdf> .
- Bonzón, E. (1996). *Obtención de una Matriz de Afinidad de Tripsina-Glioxil-Sepharosa CL-4B para la Purificación del Inhibidor de Proteasas de Stichodactyla heliantus*. (Trabajo de diploma). Universidad de la Habana, La Habana, Cuba.

- Castillo, P., Gómez, C., Sinche, M., Duchicela, J., & Muñoz, R. (2012). *Identificación de la actividad proteolítica en especies vegetales presentes en las provincias de Loja y Pastaza*. Revista Politécnica, 31.
- Chávez, M., González, Y., Hernández, A., Pascual, I., Reytor, M. y Rivero, M. (2011). *Screening of protease inhibitory activity in extracts of five Ascidian species from Cuban coasts*. Biotecnología Aplicada, 28(2), 77 – 82. Obtenido de <http://scielo.sld.cu/pdf/bta/v28n2/bta02211.pdf>
- Da Silva, A. M., Tavares, A. P., Rocha, C. M., Cristóvão, R. O., Teixeira, J. A., & Macedo, E. A. (2012). *Immobilization of commercial laccase on spent grain*. Process biochemistry, 47(7), 1095-1101. Obtenido de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511312001353>
- Del Monte, A., Cutiño, B., González, J., Chávez, M., Díaz, J. (2014). *Diseño racional de la inmovilización de proteínas: aplicaciones en cromatografía de afinidad y bioconversión enzimática*. Anales de la Academia de Ciencias de Cuba. Obtenido de <http://www.revistaccuba.cu/index.php/acc/article/viewFile/187/145>
- Dos Santos, E., Oliveira, A., Rabêlo, L., Uchôa, A. y Araujo, A. (2012). *Affinity Chromatography as a key tool purify protein protease inhibitors from plants*. Obtenido de <http://www.intechopen.com/books/affinity-chromatography/affinity-chromatography-asa-key-tool-to-purify-protease-inhibitors-from-plants>
- Earlanger, B., Kokowski, N. y Cohen, W. (1961). *The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 95(2), 271-278.
- Elizalde, A., Porilla, Y. y Chaparro, D. (2009). *Factores antinutricionales en semillas*. Facultad de Ciencias Agropecuarias, 7(1), 46. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v7n1/v7n1a07.pdf>
- Freije, J., Mulder, P., Werkman, W., Rieux, L., Niederlander, H., Verpoorte, E., y Bischoff, R. (2005). *Chemically modified, immobilized trypsin reactor with improved digestion efficiency*. Journal of proteome research, 4(5), 1805-1813.
- García, R., Salas, E., Del monte, A., Del Rivero, A., Guerra, Y. y Chávez M. (2009). *Micro y nanobiotecnologías en la detección y caracterización de inhibidores de proteasas de interés biomédico*. Revista Cubana de Física. 26(1). 76. Obtenido de <http://www.fisica.uh.cu/biblioteca/revcubfi/2009/vol.26-No.1/RCF-26-1-2009-76.pdf>

- Habib, M. y Majid, K. (2007). *Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants*. Biotechnology and Molecular Biology, 2(3), 68-85.
- Koolman, J. y Röhm, K. (2004). *Bioquímica texto y atlas*. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- Li, Y., Gao, F., Wei, W., Qu, J., Ma, G. y Zhou, W. (2010). *Pore size of macroporous polystyrene microspheres affects lipase immobilization*. Journal of Molecular Catalysis, 66 (1), 182-189.
- Montgomery, D. (2003). *Diseño y análisis de experimentos*. México D.F., México: Limusa.
- Müller-Esterl, F. (2008). *Bioquímica. Fundamentos para medicina y ciencias de la vida*. Obtenido de: <http://books.google.com.ec/books?id=X2YV G6Fzp1UC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>
- Nelson D. y Cox, M. (2014). *Principles of biochemistry*. Obtenido de <https://archive.org/details/9788582710739>
- Ramírez, J., y Rangel, I. (2011). *El frijol (Phaseolus vulgaris): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos*. Revista Fuente, 3(8).
- Rocha, C., Gonçalves, P., y Teixeira, J. (2011). *Immobilization of trypsin on spent grains for whey protein hydrolysis*. Process biochemistry, 46(2), 505-511. Obtenido de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511310003843>
- Tripathi, G. (2009). *Enzyme biotechnology*. ABD Publishers.

Evaluación de la extracción de ácidos grasos a partir de cabezas de sardina (*Opisthonema libertate*) subproducto de la industria pesquera

(Evaluation of extraction of fatty acids from sardine's head (*Opisthonema libertate*) by-product of fishing industry)

Belén Carrillo¹, Mauricio Mosquera¹

Resumen:

Los ácidos grasos poliinsaturados son compuestos bioactivos utilizados como suplementos nutricionales en la industria alimentaria y farmacéutica, presentes en peces azules como la sardina (*Opisthonema libertate*). El objetivo de la investigación fue la recuperación de ácidos grasos a partir de las cabezas de sardina. Se realizó una hidrólisis básica con la finalidad de extraer el aceite presente. Como agente hidrolizante se utilizó NaOH en cuatro concentraciones, el mayor porcentaje de recuperación de aceite saponificado correspondió a un 3,64 %, con una concentración 1 M de NaOH. La utilización de esta base en la extracción, permitió simultáneamente saponificar el aceite recuperado. Se analizó la influencia de factores como la temperatura y la concentración de H₂SO₄ en el aislamiento de los ácidos grasos mediante el proceso de acidulación. La mejor condición experimental del proceso se dio a 20 °C y 75 % de concentración de H₂SO₄. El análisis de ácidos grasos se realizó mediante cromatografía de gases, donde se determinó una concentración de 2233,70 µg/m, de los cuales el 82,55 % correspondió a ácidos grasos saturados, el 13,72 % a ácidos monoinsaturados y el 3,73 % para ácidos poliinsaturados. Dentro de los ácidos grasos poliinsaturados se destacó la presencia del ácido eicosapentaenoico EPA (omega-3) con una concentración de 73,12 µg/mL.

Palabras clave: ácidos grasos; hidrólisis; omega-3; saponificación; sardina.

Abstract:

Polyunsaturated fatty acids are bioactive compounds employed as nutritional supplements in the food and pharmaceutical industry, those are present in blue fish like sardine (*Opisthonema libertate*). The purpose of this investigation was the recovery of these acids from sardine heads. A basic hydrolysis was carried out in order to extract the oil. NaOH was the hydrolyzing agent, tested in four concentrations. As a result, 3.64 % was the highest percentage of saponified oil recovery, with a concentration of 1M NaOH. This base allowed simultaneously saponify the recovered oil in the extraction. The influence of temperature and the concentration of H₂SO₄ in the isolation of fatty acids by the acidulation process was analyzed. The best experimental condition of the process was given at 20 °C and 75 % of H₂SO₄ concentration in the extracted oil, it was determined 2233.70 µg/mL of fatty acids, where 82.55% corresponded to saturated fatty acids, 13.72% to monounsaturated acids and 3.73% to polyunsaturated acids. Among the polyunsaturated fatty acids, was emphasized the presence of eicosapentaenoic acid EPA (omega-3) with a concentration of 73.12 µg/mL.

Keywords: fatty acids; hydrolysis; omega-3; saponification; sardine

¹ Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador ({maria.carrillo01, mauricio.mosquera} @epn.edu.ec)

1. Introducción

En Ecuador la capacidad de producción de sardinas en conserva es de aproximadamente 40 mil toneladas anuales, de las cuales solo el 86 % es destinado al consumo humano; mientras que el 14 % restante corresponde a desperdicios como cabezas, colas y vísceras (FAO, 2014; ProEcuador, 2015). Estos desperdicios son comúnmente desechados al océano, práctica que genera un impacto ambiental (MAE, 2013). En el mejor de los casos, los desperdicios de la industria sardinera, son utilizados para la elaboración de productos de bajo valor agregado como harina de pescado, de la cual se obtiene aceite, que suele ser utilizado para la elaboración de alimento de animales de criadero (IFFO, 2008). Sin embargo, en la actualidad se conoce que dicho aceite es la principal fuente de ácidos grasos esenciales de origen animal, los cuales son utilizados para la elaboración de suplementos nutricionales, en la dieta de seres humanos (Sanz, 2009; Valenzuela *et al.*, 2012).

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos cuya cadena puede ser saturada o insaturada. En la cadena saturada, todos sus enlaces son simples; mientras que, la insaturada se caracteriza por la presencia de enlaces dobles (Gargaud, 2011). Los ácidos grasos que no pueden ser sintetizados en el cuerpo humano, reciben el nombre de ácidos grasos esenciales y también son conocidos como ácidos grasos poliinsaturados (Gellman y Turner, 2013; Mora, 2002). En los procesos metabólicos de los seres humanos, estos compuestos son los responsables de otorgar soporte estructural a los fosfolípidos de las membranas celulares y debido a la ausencia en el organismo de los ácidos grasos cuyo doble enlace se encuentre en la posición omega-3 y omega-6, estos deben ser ingeridos en los alimentos (Gatica, 2011; Valenzuela *et al.*, 2011). El consumo de estos ácidos produce además beneficios a la salud, entre los que se destaca la prevención de enfermedades cardiovasculares, artritis reumatoide, deterioro cognitivo y diversos tipos de cáncer (Larsen *et al.*, 2011). Este tipo de beneficios han sido comprobados en diversos estudios realizados en países como Japón, donde el consumo de pescados ricos en omega-3 y omega-6 es elevado y como consecuencia se evidencia una disminución significativa de enfermedades cardiovasculares, en comparación con otras dietas que poseen una baja ingesta de estos ácidos grasos esenciales (Iso *et al.*, 2006).

Implementar métodos, que permitan la extracción y purificación de estos ácidos, representa una alternativa para el desarrollo de nuevos productos a nivel nacional, con los cuales además sea posible incursionar en mercados emergentes. Existen varios estudios enfocados en el desarrollo de técnicas para la extracción de ácidos grasos, a partir de subproductos de la industria pesquera. Algunos métodos enfocan su estudio en el uso de lipasas, enzimas que debido a su selectividad, permiten extraer los ácidos grasos presentes en el aceite, por la ruptura de enlaces específicos (Valverde *et al.*, 2013). Existen otros métodos de purificación mediante solventes orgánicos, donde la diferencia de polaridad y configuración espacial son la base de la extracción (Caprioli *et al.*, 2016).

Otros métodos como la extracción con fluidos supercríticos, separan los ácidos grasos debido a la polaridad de los mismos en el medio (Rubio *et al.*, 2012; Sahena *et al.*, 2009).

En este estudio se plantea la extracción del aceite por medio de una hidrólisis básica con hidróxido de sodio, en la cual la temperatura, fuerza iónica, pH y polaridad del disolvente actúan como agentes desnaturizantes que desestabilizan la proteína transformándola en aminoácidos, los mismos que al ser solubles en agua se separan del aceite debido a la inmiscibilidad entre dichas soluciones, de esta manera se liberan los lípidos de la proteína (Giraldo *et al.*, 2010; Macarulla y Goñi, 2002; Velásquez, 2006).

De manera simultánea al proceso previamente descrito, el NaOH al ser un álcali altamente reactivo, cuando se encuentra en solución, entra en contacto con los lípidos aislados, reacciona con estos y los saponifica, como se observa en la *Figura 1*. Como producto de este proceso se obtiene una sal asociada al ácido graso y glicerina como subproducto (Mercantili *et al.*, 2012; Nolsøe y Undeland, 2009; Wijayarathne y Wasalathilake, 2014).

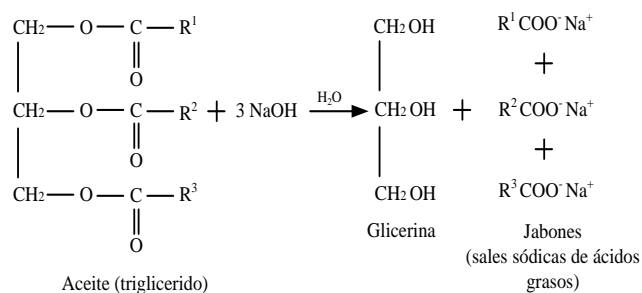


Figura 1. Hidrólisis básica de un triglicérido (McMurry, 2012)

Las sales de ácidos grasos contienen los ácidos grasos que serán aislados por medio de un proceso de acidulación, el cual utiliza ácido sulfúrico como reactivo disociante. La acción catalítica del ácido permite la ruptura de los enlaces en las sales de manera que los ácidos grasos son liberados de la molécula. En este proceso, el sodio asociado al ácido graso es remplazado por un ion H^+ . La sustitución de minerales como el sodio en triglicéridos saponificados se da gracias a la donación de un protón por parte del ácido utilizado, con la consecuente formación de sulfato de sodio como subproducto tal como se observa en la *Figura 2* (Gargaud, 2011; Nielsen, 2003; Yúfera, 2007).

Para poder analizar los ácidos grasos existentes en el aceite, estos deben ser esterificados ya que los ésteres de los ácidos grasos poseen en su estructura un grupo metilo que le otorga menor polaridad y como consecuencia, los vuelve más volátiles, lo que permite la identificación y cuantificación de los mismos mediante cromatografía de gases (Gracia, 2010). La separación dentro del equipo se da por la afinidad que presenta la muestra entre la fase móvil que representa el gas portador y la estacionaria que consiste en la columna de la cromatografía (Karasek y Clement, 2012).

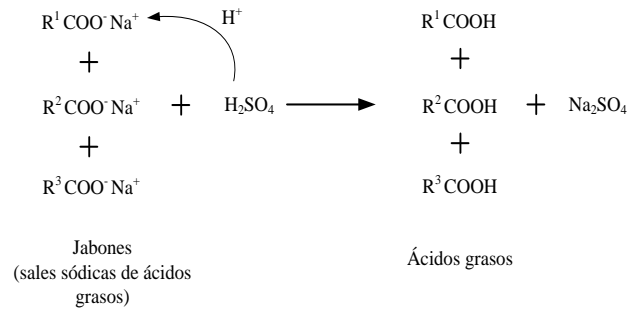


Figura 2. Acidulación del aceite saponificado
(Cermak *et al.*, 2012; Scrimgeour, 2005)

En síntesis, la presente investigación tiene como objetivo obtener ácidos grasos a partir de cabezas de sardina (*Opisthonema libertate*), mediante hidrólisis básica y posterior acidulación de las sales sódicas de los ácidos grasos. Este estudio se presenta como una alternativa para la revalorización de residuos de la industria sardinera.

2. Metodología

2.1. Materia prima

La materia prima que se utilizó para el desarrollo del presente estudio provino de los residuos de la actividad pesquera de la localidad Crucita (0° 52'S; 80° 32'O) ubicada a 0 m.s.n.m. en la costa ecuatoriana de la provincia de Manabí. Se emplearon 10 kg de cabezas de sardina, especie de pelágicos conocidos coloquialmente con el nombre de pinchagua (*Opisthonema libertate*). La materia prima fue congelada hasta su uso.

2.2. Caracterización de la materia prima

El contenido de humedad se determinó mediante el método 950.46 de la AOAC (2007), para lo cual se utilizó una estufa marca MEMMERT con control de temperatura y tiempo. Se determinó el contenido de cenizas mediante el método 920.153 de la AOAC (2007), para lo cual se empleó una mufla marca LINDBERG, modelo BF51728C-1. Para la determinación del contenido de proteína se empleó el método 981.10 de la AOAC (2007), con la ayuda de un destilador marca GERHARDT, modelo Vapodest 45s, en conjunto con un digestor. Finalmente, el porcentaje de extracto etéreo se determinó de acuerdo con lo descrito en el método 960.39 de la AOAC (2007), mediante un extractor de grasas con solventes marca VELP, modelo SER 148.

2.3. Hidrólisis básica para la recuperación de aceite saponificado

El proceso de hidrólisis básica se realizó de acuerdo con el método descrito por Hordur y Necla (2003), con una modificación en la variación de la concentración de NaOH, la cual se llevó a cabo de acuerdo con un diseño experimental al azar con tres repeticiones en el que se utilizaron valores de 0,05; 0,10; 0,50 y 1,00 M. Con base en experimentaciones previas, se pesaron aproximadamente

500 g de materia prima en una balanza marca OHAUS con capacidad de 6 kg y 0,001 kg de sensibilidad. Estas cabezas fueron colocadas en un vaso de precipitación de 1 L de capacidad, al cual se agregaron lentamente 300 mL de cada una de las soluciones de NaOH, de manera que las cabezas quedaron totalmente cubiertas. A continuación, se calentaron hasta una temperatura de 70 °C, con agitación constante de 70 oscilaciones por minuto, durante 2 h, en un baño térmico marca Selecta modelo Unitronic Or (Harting *et al.*, 2010).

Como resultado de la hidrólisis básica se obtuvo aceite saponificado, hidrolizado de proteína y residuos sólidos. Posteriormente, los residuos sólidos que incluyeron espinas, se separaron de la solución mediante la retención de las mismas en un cedazo convencional, con una abertura máxima de 1 mm. Luego, la solución obtenida se colocó en un embudo de separación y se dejó en reposo, de modo que por decantación, se formaron dos fases, de las cuales, la superior conocida como aceite saponificado compuesto por las sales sódicas de ácidos grasos, fue separada, mientras que en la parte inferior se retuvieron residuos sólidos no deseados como arena y una fase acuosa constituida principalmente por hidrolizado de proteína.

El aceite saponificado se procesó en una centrifuga marca Thermo modelo HN SII a 2 500 rpm, durante 10 min, para separar cualquier residuo sólido remanente (Jayasinghe *et al.*, 2013). Finalmente, el aceite saponificado separado y centrifugado se pesó en una balanza marca Boeco con capacidad de 200 g y sensibilidad de 0,1 mg. Posteriormente, se calculó el rendimiento de recuperación del aceite saponificado en el proceso de hidrólisis.

2.5. Acidulación para la recuperación de ácidos grasos

En esta parte del proceso, se llevó a cabo un diseño experimental 3^2 con dos repeticiones en el punto central, en el cual se varió la concentración de ácido sulfúrico con valores de 25, 50 y 75 % v/v; adicionalmente, se varió la temperatura del proceso con valores de 20, 40 y 60 °C. Para el proceso, la solución de H₂SO₄ fue añadida en una cantidad igual a la relación estequiométrica para la neutralización del NaOH usada en la etapa de la hidrólisis básica (Harting *et al.*, 2010). A continuación, la mezcla se agitó constantemente a 30 oscilaciones por minuto durante 10 min en un baño térmico marca Selecta modelo Unitronic Or, a las temperaturas del diseño experimental (Sánchez, 2006). Como consecuencia de la reacción, se formaron dos fases. Una fase aceitosa, en la cual se encuentran los ácidos grasos liberados, la cual flotó y se ubicó en la parte superior de la solución y una fase acuosa que contuvo sales minerales y agua que se ubicó en la parte inferior de la solución.

2.7. Cromatografía de gases

2.7.1. Esterificación de los ácidos grasos

El proceso de esterificación se llevó a cabo como paso previo a la cromatografía de gases, para aumentar la volatilidad de los ácidos grasos, de manera que sus concentraciones puedan ser determinadas. Se esterificaron todas las muestras aciduladas en las diferentes condiciones experimentales.

Para esto, se colocaron 2 gotas de las muestras aciduladas, en un tubo de ensayo con tapa, al cual se añadió 1 mL de una solución 0,5 M de KOH disuelta en metanol. El recipiente se tapó y la solución resultante fue calentada en baño térmico, con la ayuda de una plancha de calentamiento marca Corning, hasta que se alcanzó la ebullición, que se mantuvo durante 10 min. Posteriormente, se agregaron 0,4 mL de una solución 1:4 v/v de HCl al 37%, en metanol. Esta mezcla se mantuvo en ebullición durante 25 min en baño térmico. Luego, la mezcla fue enfriada y se agregaron 2 mL de agua destilada (Metcalf y Schmitz, 1961). A continuación, se realizó una primera extracción, donde se colocaron 3 mL de éter de petróleo en el recipiente con la muestra y se agitó vigorosamente, se dejó en reposo hasta que se formaron dos fases. La fase etérea ubicada en la parte superior fue recuperada con la ayuda de una pipeta Pasteur y se colocó en un vaso de precipitación. De la misma manera, se realizó una segunda extracción a partir de la fase inferior de la solución, para obtener mayor cantidad de muestra de la fase etérea. Posteriormente, se añadió sulfato de sodio anhidro para evitar la presencia de agua residual en la fase etérea recuperada. Finalmente, esta solución fue filtrada con un filtro para cromatografía de 0,45 μm y se colocó en un tubo de ensayo. La solución se dejó en reposo durante 15 h a temperatura ambiente, donde se concentró hasta que se obtuvieron 2 mL de la misma (Metcalf y Schmitz, 1961).

2.7.2. Condiciones para la cromatografía de gases

Con la ayuda de una jeringuilla para cromatografía, se tomaron 0,5 μL de la solución de la muestra esterificada y se inyectaron en una columna HP-23 (cis/FAME Column) de 30 m de longitud, 0,32 mm de diámetro y 0,25 μm de espesor, en un cromatógrafo marca PerkinElmer modelo Clarus 500, a una temperatura inicial del horno de 150 °C, con una rampa de 15 °C/min, hasta 210 °C. La corrida de la muestra en el equipo duró 56 min. La temperatura de inyección de los compuestos fue 250 °C, la temperatura del detector fue 260 °C y la velocidad de inyección de helio fue de 35 cm/s (Piras *et al.*, 2013). Las condiciones descritas fueron aplicadas también a un estándar, con la finalidad de comparar los picos obtenidos en los distintos cromatogramas. Dentro de esta comparación se evaluaron las áreas de los picos, las cuales permitieron determinar las concentraciones de los ácidos grasos en las muestras estudiadas.

3. Resultados y Discusión

3.1. Caracterización química proximal de las cabezas de sardina (*Opisthonema libertate*)

En la *Tabla 1* se representan los valores correspondientes a la caracterización de la especie en estudio mediante un análisis químico proximal. La humedad dentro de la muestra constituyó el valor más elevado en la composición proximal correspondiente a un $67,23 \pm 1,3$ % del total analizado. La composición mayoritaria de agua se debe a la naturaleza del producto, razón por la cual fue importante mantener un manejo adecuado en la cadena de frío desde su origen hasta su tratamiento. Asimismo, el contenido de minerales y materia inorgánica, representado por el porcentaje de cenizas, presentó un valor de $8,50 \pm 0,22$ %, el cual fue mayor al obtenido para los residuos de otras especies de sardina, como la *Sardinella aurita*, que presentó 1,64 % y la *Sardina pilchardus* con un 1,90 % (Kechaou *et al.*, 2009; Valls y Paredes, 2010). Esta peculiaridad se da debido a que la especie en estudio involucra únicamente cabezas; mientras que las especies comparadas involucran además vísceras y el cuerpo de los pescados. Además, se podría considerar que el mayor contenido de cenizas en *Opisthonema libertate* pudo deberse al hábitat del que la especie en estudio procede, correspondiente a agua de mar; mientras que las otras especies mencionadas habitan en ecosistemas de agua dulce (FAO, 1999).

Tabla 1. Resultados de la composición química proximal de cabezas de sardina (*Opisthonema libertate*)

	Humedad (%)	Cenizas (%)	Extracto Etéreo (%)	Proteína (%)
Cabezas de sardina	$67,23 \pm 1,38$	$8,50 \pm 0,22$	$5,58 \pm 0,13$	$17,55 \pm 0,24$

El porcentaje correspondiente al extracto etéreo fue $5,58 \pm 0,13$ %. Al comparar este valor con el de otras especies de pescado del tipo azul como el *Epinephelus coioides*, cuyo porcentaje de lípidos es 3,73 %, la *Sardina pilchardus* con 4,89 % y la *Sardinella aurita* con 3,44 %, se observó que la sardina presentó una mayor cantidad de aceite susceptible de recuperación, lo que probablemente indicaría mayor presencia de ácidos grasos (Kechaou *et al.*, 2009; Tawfik, 2010; Valls y Paredes, 2010).

Finalmente, el contenido de proteína en la muestra correspondió a un valor de $17,55 \pm 0,24$ % e indica la presencia de nutrientes proteicos. Estos nutrientes se encuentran asociados a los lípidos, por lo que la interacción lípido proteica es la más influyente en la selección del método de extracción de aceite, debido a la necesidad de obtener el mismo en su estado más puro. El valor obtenido guarda similitud con otras especies, como la *Sardinella aurita*, cuyo porcentaje es de 16,87 % (Valls y Paredes, 2010).

3.2. Hidrólisis Básica

Dentro del proceso de obtención de aceite saponificado, las cabezas de sardina fueron sometidas a un tratamiento de hidrólisis básica mediante el uso de NaOH en diferentes concentraciones. Dichas concentraciones fueron distintas con el fin de identificar las condiciones idóneas, que maximicen la recuperación de aceite saponificado. Como se observa en la *Figura 3*, a medida que aumenta la concentración de NaOH en la solución hidrolizante, aumenta el rendimiento de recuperación del aceite saponificado.

El análisis estadístico reportado por el *software* Statgraphics Centurion XVI, con análisis de varianza ANOVA manifestó diferencias significativas ($p < 0,05$). Al utilizar concentraciones de 0,05; 0,10 y 0,50 M, el rendimiento de recuperación de aceite saponificado fue estadísticamente similar en todos los casos, con una ligera tendencia creciente conforme el incremento de las concentraciones. Sin embargo, al utilizar una concentración de 1,00 M, la diferencia fue significativa con respecto a las otras concentraciones utilizadas, con un porcentaje de recuperación del 3,64 %. Por este motivo, la solución 1,00 M fue utilizada para continuar con el desarrollo del proyecto. Este resultado estuvo en concordancia con lo descrito por Jayasighe *et al.* (2013), cuyo rendimiento estuvo entre el 2 % y el 3 %. Por lo tanto, el procedimiento empleado para la recuperación de aceite presentó un rendimiento similar al obtenido en procesos que involucran únicamente variaciones térmicas, como es el caso de Jayasighe *et al.* (2013). Sin embargo, la metodología propuesta permitió saponificar simultáneamente el aceite extraído, lo que representa una ventaja respecto a otras metodologías, en las cuales la saponificación es llevada a cabo posteriormente.

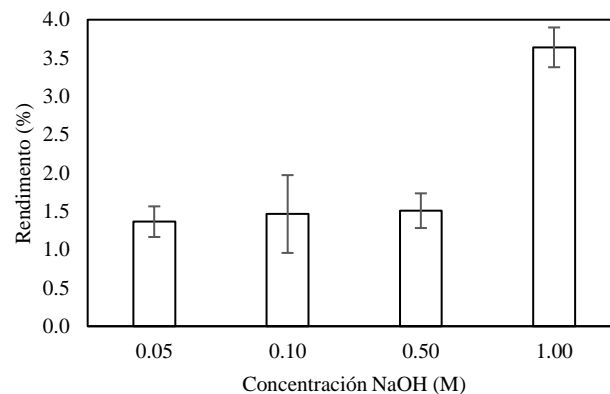


Figura 3. Porcentaje de aceite saponificado recuperado

La razón por la que el porcentaje de rendimiento fue mayor para la concentración 1 M de NaOH, se debe al uso de una base fuerte, que a mayores concentraciones aumentó la carga iónica de la solución y el pH de la misma, lo que pudo influir en el proceso de desnaturalización de la proteína al volverla más soluble en agua. En consecuencia, se favoreció la obtención del aceite saponificado (Giraldo *et al.*, 2010; Macarulla y Goñi, 2002; Velásquez, 2006).

Respecto a la coloración de la muestra, se pudo notar que a mayores concentraciones de NaOH, el aceite saponificado tomó una tonalidad amarilla más intensa, propia de sustancias grasas, como se observa en la *Figura 4* (Caridad *et al.*, 2016); mientras que, a menores concentraciones, las muestras tomaron un color café-rojizo, característico de impurezas, como proteína animal. Cabe mencionar que en la figura se observa la división de dos fases, lo cual no corresponde a diferentes sustancias, sino al estado líquido y sólido de la muestra, lo cual se dio como resultado de la temperatura de almacenamiento. De manera que la fase inferior correspondió a una primera extracción, donde el aceite saponificado fue almacenado en congelación luego de su extracción; mientras que la fase superior representa el aceite saponificado recién extraído.



Figura 4. Aceite recuperado a diferentes concentraciones de NaOH, de izquierda a derecha se empleó 0,05 M, 0,10 M, 0,50 M y 1,00 M

Se analizó el contenido de proteína en la muestra obtenida a 1 M de NaOH, para descartar que fracciones remanentes de proteína se encontraran en la muestra. El valor del contenido de proteína correspondió a $0,19 \pm 0,04$ %, el cual evidenció una remoción casi total de proteína en comparación con la cantidad de proteína obtenida inicialmente en las cabezas de sardina. De esta forma, se pudo concluir que el tratamiento con NaOH, a una concentración 1 M, permitió la mayor extracción del aceite saponificado, en términos de cantidad y pureza.

3.3. Acidulación

Se determinó la influencia de los factores concentración de ácido sulfúrico y temperatura, al observar la concentración de los ácidos grasos en cada una de las condiciones experimentales, medida en ($\mu\text{g}/\text{mL}$). Para el análisis de los datos, se dividieron los ácidos grasos en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. Los ácidos grasos poliinsaturados comprenden a los omega-3 y omega-6, por lo tanto, este grupo de ácidos grasos fue el de mayor importancia para determinar las mejores condiciones del proceso. En la *Figura 5*, se presenta un diagrama de Pareto que evalúa la influencia de las condiciones experimentales utilizadas, con el fin de identificar qué factores inciden significativamente en la investigación. Se puede observar que la concentración de ácido sulfúrico fue el único factor significativo dentro de la experimentación. Además, se indica que la temperatura no presentó una influencia estadísticamente significativa. Del mismo modo, al analizar ambas condiciones en conjunto, se distingue que la interacción entre los dos factores estudiados tampoco fue significativa. El efecto positivo de la concentración de ácido sulfúrico dentro

del proceso implicó que a medida que aumentara la concentración del mismo, la recuperación de ácidos grasos poliinsaturados fuera mayor. Esto se explica en parte, debido a la interacción del ácido como catalizador dentro de la reacción de sustitución, la cual puede observarse en la *Figura 2*. De esta forma, a medida que la concentración del ácido aumentó, la extracción de los ácidos grasos por procesos de sustitución se pudo ver favorecida (Yúfera, 2007).

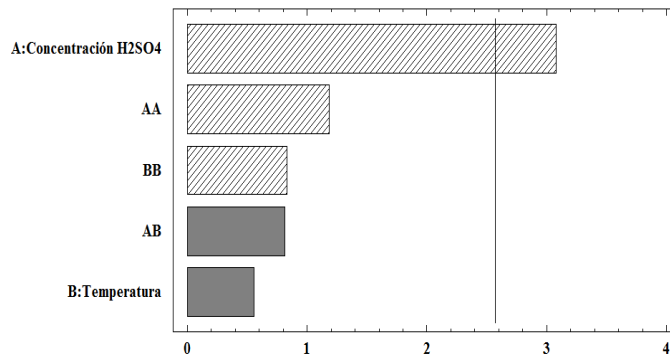


Figura 5. Diagrama de Pareto para la concentración de ácidos grasos poliinsaturados presentes en la muestra respecto a las condiciones de trabajo utilizadas

Para establecer cuál fue la condición óptima dentro del proceso, se analizó la *Figura 6*, donde se puede apreciar que la mayor superficie se encuentra orientada hacia la concentración de 75 % v/v de ácido sulfúrico y 20 °C, con una recuperación total de ácidos grasos poliinsaturados de 83,26 μg/mL, que correspondió a la mayor cantidad recuperada en relación con las demás condiciones analizadas.

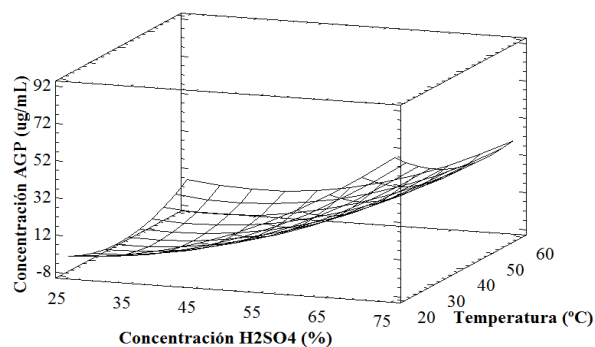


Figura 6. Superficie de respuesta estimada para la concentración de ácidos grasos poliinsaturados presentes en la muestra respecto a las condiciones de trabajo utilizadas

A pesar que la temperatura no mostró ser un factor significativo en el proceso, la mejor condición se presentó a 20 °C, la cual correspondió a la menor temperatura dentro del rango estudiado. Esto pudo deberse a que mayores temperaturas implican una aceleración en las reacciones de deterioro de la estructura molecular de los ácidos grasos, entre las que se pueden destacar procesos de hidrólisis y oxidación (Marcano *et al.*, 2007; Zamorano *et al.*, 2013). La interacción entre la fuerza del ácido en conjunto con las altas temperaturas del proceso pudieron ser la causa de reacciones de degradación del aceite. En la *Tabla 3*, se observa una recopilación de los ácidos grasos obtenidos bajo la mejor condición experimental (20 °C y 75 % v/v de H₂SO₄). Los ácidos grasos

saturados obtuvieron el mayor porcentaje de recuperación, con un 82,55 % del total recuperado. Dentro de dicha categoría, es importante destacar la presencia ácido palmítico C 16:0 con una concentración correspondiente a 970,10 µg/mL, consistente con lo reportado en investigaciones similares (González *et al.*, 2013; Valls y Paredes, 2010).

Asimismo, el contenido de ácidos grasos monoinsaturados fue del 13,72 % del total recuperado. El ácido mayoritario en este grupo fue el ácido oleico C 18:1n9c, con una concentración de 152,35 µg/mL, la cual, al ser comparada con otros resultados obtenidos en estudios similares, cuya concentración fue 395,36 µg/mL, permitió observar que se trató del ácido graso monoinsaturado de mayor proporción en este tipo de muestras (González *et al.*, 2013; Valls y Paredes, 2010).

Tabla 3. Perfil de ácidos grasos en la muestra acidulada a 20 °C y 75 % v/v de H₂SO₄

Ácido graso	Concentración ácidos grasos (µg/mL)
Ác. Butanoico, C 4:0	182,63
Ác. Caproico, C 6:0	47,84
Ác. Caprílico, C 8:0	5,75
Ác. Cáprico, C 10:0	54,29
Ác. Undecanoico, C 11:0	5,46
Ác. Láurico, C 12:0	25,06
Ác. Tridecanoico, C 13:0	166,66
Ác. Mirístico, C 14:0	19,24
Ác. Palmítico, C 16:0	970,10
Ác. Margárico, C 17:0	64,45
Ác. Esteárico, C 18:0	247,78
Ác. Tricosanoico, C 23:0	50,99
Ác. Lignocérico, C 24:0	3,66
TOTAL AGS	1843,94
% TOTAL AGS	82,55
Ác. Misitoleico, C 14:1n5	63,05
Ác. Pentadecanoico cis-10, C 15:1n5	44,22
Ác. Palmitoleico, C 16:1n7	46,53
Ác. Oleico, C 18:1n9c	152,35
Ác. Eicosanoico cis-11, C 20:1n9	0,35
TOTAL AGM	306,50
% TOTAL AGM	13,72
Ác. Linoleico, C 18:2n6c	9,91
Ác. Gama-linoleico, C 18:3n6	0,23
Ác. Eicosapentaenoico EPA, C 20:5n3	73,12
TOTAL AGP	83,26
% TOTAL AGP	3,73

*AGS ácidos grasos saturados, AGM ácidos grasos monoinsaturados, AGP ácidos grasos poliinsaturados

Finalmente, los ácidos grasos poliinsaturados, objeto de este estudio, presentaron un porcentaje equivalente al 3,73 % del total. Se recuperaron: ácido linoleico C 18:2n6c (omega-6), ácido gama

linoleico C 18:3n6 (omega-6) y ácido eicosapentaenoico EPA C 20:5n3 (omega-3). Dentro de estos, el de mayor cantidad fue el EPA con 36,63 µg/mL.

Se observó que *Opisthonema libertate*, especie empleada en este estudio, no presentó porcentajes de contenido de ácidos grasos poliinsaturados similares con los reportados en otros estudios, donde alcanzan valores entre 31,58 % a 37,00 % (Valls y Paredes, 2010). Esto puede deberse a las características genéticas de la especie y además, a pesar que la sardina pertenece al grupo de peces azules, que se caracterizan por el alto contenido de ácidos grasos omega-3 y omega-6, un factor importante a considerar es la temperatura del medio donde habitan. De forma que, a menor temperatura ambiente, mayor es la cantidad de ácidos grasos encontrados en los peces (González *et al.*, 2013). De igual manera, influye la estación del año en la que los peces son capturados, de tal manera que en verano hay una menor cantidad de ácidos grasos susceptibles de recuperación, es decir, cuando la temperatura del ambiente donde habitan es más cálida, como en el caso de las muestras analizadas en este trabajo (Pariona, 2008; Salas *et al.*, 2002).

La *Figura 7* presenta el cromatograma obtenido en la mejor condición experimental, en el cual se pueden observar los picos característicos para cada ácido graso presente en la muestra. La identificación de la mayoría de los ácidos grasos por cromatografía se dio en tiempos relativamente cortos de 1,5 a 6 min. La mayoría de los ácidos grasos recuperados a menores tiempos correspondieron a aquellos que poseen su cadena completamente saturada. Igualmente, el ácido palmítico posee el pico más alto dentro del cromatograma en estudio, con un tiempo de extracción de aproximadamente 3,6 min.

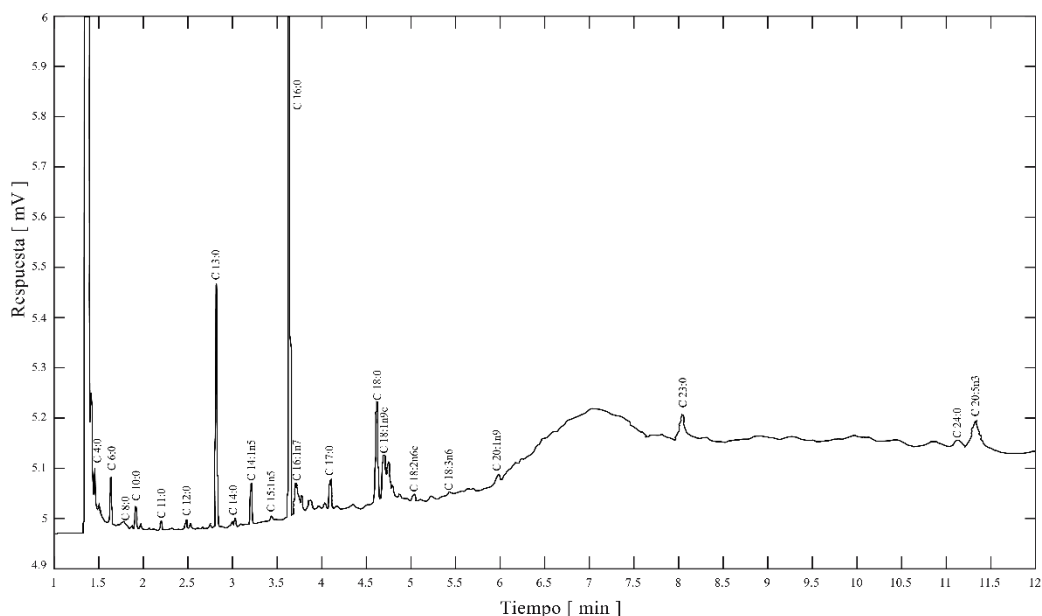


Figura 7. Cromatograma de aceite acidulado a 75 % de H₂SO₄ y 20 °C

A medida que los tiempos aumentan, se puede observar que los ácidos grasos de cadena más larga son identificados, como por ejemplo los ácidos grasos poliinsaturados que se identifican en tiempos superiores a los 11 min. Finalmente, al realizar una comparación del cromatograma obtenido con otros presentados en estudios similares, se observa que el comportamiento de los picos es similar (Salas *et al.*, 2002).

4. Conclusiones y Recomendaciones

El análisis proximal de las cabezas de sardina (*Opisthonema libertate*) permitió determinar un contenido de humedad del $67,23 \pm 1,38$ %, $8,50 \pm 0,22$ % en cenizas, $5,58 \pm 0,13$ % de extracto etéreo y $17,55 \pm 0,24$ % de proteína.

En el proceso de hidrólisis básica, al utilizar concentraciones de 0,05; 0,10 y 0,50 M de NaOH, el rendimiento de recuperación de aceite saponificado fue estadísticamente similar en todos los casos con una ligera tendencia creciente al aumentar la concentración. La concentración de NaOH con la cual se obtuvo la mayor recuperación de aceite saponificado correspondió a un valor de 1 M, con un rendimiento correspondiente a un 3,64 %.

En el proceso de acidulación, la mejor condición experimental se dio en un valor de 75 % de concentración de ácido sulfúrico y una temperatura equivalente a 20 °C. A dichas condiciones, la concentración de ácidos grasos poliinsaturados correspondió a 83,26 µg/mL.

El efecto de la interacción entre la temperatura y la concentración de ácido sulfúrico dentro del proceso fue no significativo. Mientras que, la concentración de ácido sulfúrico si influyó significativamente en la recuperación de ácidos grasos.

De acuerdo con su saturación, los porcentajes de ácidos grasos obtenidos en la mejor condición experimental fueron 82,5 % para los saturados, 13,7 % para los monoinsaturados y 3,8 % para los poliinsaturados del total recuperado.

Dentro de los ácidos grasos saturados, el de mayor recuperación fue el ácido palmítico con una concentración correspondiente a 970,10 µg/mL. Mientras que, para los ácidos grasos monoinsaturados, el de mayor recuperación fue el ácido oleico con una concentración de 152,35 µg/mL.

Los ácidos grasos poliinsaturados obtenidos fueron: ácido linoléico (omega-6), ácido gama linoleico (omega-6) y ácido eicosapentaenoico EPA (omega-3). Dentro de estos, el de mayor concentración fue el EPA con 73,12 µg/mL.

Bibliografía

- Association of Official Analytical Methods. Official Methods 920.153: Ash of Meat: *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 2007.
- Association of Official Analytical Methods. Official Methods 981.10: Crude Protein in Meat: *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 2007.
- Association of Official Analytical Methods. Official Methods 960.39: Fat-Crude or Ether Extract in Meat: *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 2007.
- Association of Official Analytical Methods. Official Methods 950.46: Moisture in Meat: *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 2007.
- Association of Official Analytical Methods. Official Methods 920.160: Saponification Number: *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 2007.
- Atinafu, D., & Bedemo, B. (2011). Estimation of total free fatty acid and cholesterol content in some commercial edible oils in Ethiopia, Bahir DAR. *Journal of Cereals and Oilseeds*, 2(5), 71-76. doi: 10.5897/JCO11.025
- Baião, N. C., & Lara, L. J. C. (2005). Oil and fat in broiler nutrition. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 7(3), 129-141.
- Caprioli, G., Giusti, F., Ballini, R., Sagratini, G., Vila-Donat, P., Vittori, S., & Fiorini, D. (2016). Lipid nutritional value of legumes: Evaluation of different extraction methods and determination of fatty acid composition. *Food chemistry*, 192, 965-971. doi:10.1016/j.foodchem.2015.07.102
- Caridad, M., Fernández, M., Castiñeira, M., Rodríguez, J., Romero, J., & Márquez, T. (2016). Evaluación y establecimiento de las especificaciones de calidad del pool de aceite de hígado de tiburón. *Ars Pharmaceutica*, 55(1), 23-29.
- Cermak, S. C., Kenar, J. A., & Evangelista, R. L. (2012). Distillation of natural fatty acids and their chemical derivatives. *INTECH Open Access Publisher*.
- FAO. (1999). El pescado fresco: su calidad y cambios de calidad. Recuperado de: <http://www.fao.org/docrep/v7180s/v7180s05.htm> (febrero, 2017).
- FAO. (2014). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/a-i3720s.pdf> (febrero, 2016).
- Gatica, A. (2011). Ácidos grasos EPA y DHA y su vital importancia en la Nutrición Humana. *Indualimentos*. Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos (INTA). Universidad de Chile. Santiago de Chile, 58-60.

- Gargaud, M. (2011). *Encyclopedia of astrobiology* (Vol. 3). Springer Science & Business Media. Bordeaux, Francia.
- Gellman, M., & Turner, J. R. (2013). *Encyclopedia of Behavioral Medicine*. Springer. Dong Nai, Vietnam.
- Giraldo, G. A. G., Chamorro, N. L., & Doria, C. M. M. (2010). *Laboratorio de Bioquímica: Una Visión Práctica*. ELIZCOM SAS. Armenia, Colombia.
- González, M. I. C., Rodríguez, A. G. M., & Gómez, C. G. (2013). Perfil de ácidos grasos de diversas especies de pescados consumidos en México. *Revista de Biología Tropical*, 61(4), 1981-1998.
- Gracia, M. D. (2010). *Esterificación de colofonia con glicerina: estudio cinético y fenomenológico*. Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones.
- Harting, T., Díaz M., & Markovits, A. (2010). *Proceso para la obtención de un concentrado de esteres de ácidos eicopentaenoico y docosahexaenoico*. WO 2010/139085. Múnich: Oficina de Patentes Europeas.
- Hordur, K., & Necla, D. (2003). Functional Fish Protein Ingredients from Fish Species of Warm and Temperate Waters: Comparison of Acid- and Alkali-Aided Processing vs. Conventional Surimi Processing. *Advances in Seafood Byproducts 2002 Conference Proceedings*, Anchorage, Estados Unidos. Recuperado de: http://nsgd.gso.uri.edu/aku/akuw02001/akuw02001_full.pdf (enero, 2016).
- IFFO. (2008). Los Omega-3 más saludables EPA y DHA se encuentran principalmente en el aceite y la harina de pescado. Recuperado de: <http://www.iffonet.es/system/files/DPSP4.pdf> (enero, 2016).
- Iso, H., Kobayashi, M., Ishihara, J., Sasaki, S., Okada, K., Kita, Y., & Tsugane, S. (2006). Intake of fish and n3 fatty acids and risk of coronary heart disease among Japanese. *Circulation*, 113(2), 195-202.
- Jayasinghe, P., Adeoti, I., & Hawboldt, K. (2013). A study of process optimization of extraction of oil from fish waste for use as a low-grade fuel. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90(12), 1903-1915. doi: 10.1007/s11746-013-2321-1
- Karasek, F. W., & Clement, R. E. (2012). *Basic gas chromatography-mass spectrometry: principles and techniques*. Elsevier. Ontario, Canada.
- Kechaou, E. S., Dumay, J., Donnay-Moreno, C., Jaouen, P., Gouygou, J. P., Bergé, J. P., & Amar, R. B. (2009). Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardina*

- pilchardus) viscera using commercial proteases: effects on lipid distribution and amino acid composition. *Journal of bioscience and bioengineering*, 107(2), 158-164.
- Larsen, R., Eilertsen, K., & Elvevoll, E. (2011). Health benefits of marine foods and ingredients. *Biotechnology Advances*, 29(5), 508-518. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.05.017
- Macarulla, J. M., & Goñi, F. M. (2002). *Biomoléculas: lecciones de bioquímica estructural*. Reverté. Bilbao, España.
- MAE. (2013). Estudio de potenciales impactos y vulnerabilidad relacionada con las sustancias químicas y tratamiento de desechos peligrosos en el sector productivo del Ecuador. Recuperado de: <http://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2013/03/PART11.pdf> (Febrero, 2016).
- Maqsood, S., & Benjakul, S. (2010). Comparative studies of four different phenolic compounds on in vitro antioxidative activity and the preventive effect on lipid oxidation of fish oil emulsion and fish mince. *Food Chemistry*, 119(1), 123-132. doi:10.1016/j.foodchem.2009.06.004
- Marcano, E. S., Douglas, B., Marín, G., & Moreno, H. (2007). Cinética de deterioro del aceite de la semilla de la palma Coroba (*Attalea maripa*). *SABER. Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente*, 19(2), 172-182.
- Mercantili, L., Davis, F., & Higson, S. (2012). Ultrasonic Initiation of the Alkaline Hydrolysis of Triglycerides (Saponification) Without Phase Catalysis. *AOCS*, 17, 133-141. doi: 10.1007/s11743-013-1450-8
- Metcalf, L., & Schmitz, A. (1961). The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry*, 33(3), 363-364. doi: 10.1021/ac60171a016
- McMurry, J., *Química orgánica*. Cengage Learning Editores, 2012. México DF., México
- Mora, R. J. (2002). *Soporte nutricional especial*. Ed. Médica Panamericana. Bogotá, Colombia
- Nielsen, S. (2003). *Food Analysis*. West Lafayette, Estados Unidos: Kluwer Academic/ Plenum Publishers.
- Nolsøe, H., & Undeland, I. (2009). The acid and alkaline solubilization process for the isolation of muscle proteins: state of the art. *Food and Bioprocess Technology*, 2(1), 1-27. doi: 10.1007/s11947-008-0088-4
- Pariona, N. (2008). Obtención de los ácidos grasos del aceite de la *Plukenetia volubilis* L." Sacha Inchi" para la utilización en la industria y estudio fitoquímico cualitativo de la almendra.

- Piras, A., Rosa, A., Marongiu, B., Porcedda, S., Falconieri, D., Dessì, M. A., & Koca, U. (2013). Chemical composition and in vitro bioactivity of the volatile and fixed oils of *Nigella sativa* L. extracted by supercritical carbon dioxide. *Industrial Crops and Products*, 46, 317-323.
- ProEcuador. (2015). Análisis sectorial: Sardinias. Recuperado de: http://www.proecuador.gob.ec/wpcontent/uploads/2015/08/PROEC_AS2015_SARDINAS.pdf (Enero, 2016).
- Rubio-Rodríguez, N., Sara, M., Beltrán, S., Jaime, I., Sanz, M. T., & Rovira, J. (2012). Supercritical fluid extraction of fish oil from fish by-products: A comparison with other extraction methods. *Journal of Food Engineering*, 109(2), 238-248. doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.10.011
- Sahena, F., Zaidul, I. S. M., Jinap, S., Yazid, A. M., Khatib, A., & Norulaini, N. A. N. (2010). Fatty acid compositions of fish oil extracted from different parts of Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) using various techniques of supercritical CO₂ extraction. *Food Chemistry*, 120(3), 879-885. doi:10.1016/j.foodchem.2009.10.055
- Salas, A., Ayala, M. E., & Albrecht, M. (2002). Contenido de EPA y DHA en aceite crudo de pescado producido en el Perú durante el período 1996-2000. *Cienc. Tecnol. Aliment*, 3(5), 283-287.
- Sánchez, J. (2006). Extracción de Ácidos Grasos insaturados y obtención del Omega 3 de los residuos industriales pesqueros utilizando tecnologías más limpias. (Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Biólogo). Recuperado de la base de datos Academia
- Sanz, F. (2009). *La nutrición y alimentación en piscicultura*. Madrid, España: Publicaciones científicas y tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura.
- Scrimgeour, C. (2005). Chemistry of fatty acids. Scottish crop research institute. Dundee, Scotland. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, Sixth Edition, Six Volume Set. Edited by Fereidoon Shahidi, 2. Dundee, Escocia
- Tawfik, M. (2010). Proximate composition and fatty acids profiles in most common available fish species in Saudi market. *Asian Journal of Clinical Nutrition*, 2(3), 157-164.
- Tobón, F. A., Román, M. O., Molina, S., & Bothert, J. P. (2016). Determinación del perfil de ácidos grasos de la secreción de la glándula uropigial de la *Coturnix coturnix japonica* (codorniz doméstica). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 15(2), 169-179.
- Valenzuela, A., Sanhueza, J., & De la Barra, F. (2012). El aceite de pescado: ayer un desecho industrial, hoy un producto de alto valor nutricional. *Revista Chilena de Nutrición*, 39(2), 201-209. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182012000200009>

- Valenzuela, R., Tapia, G., González, M., & Valenzuela, A. (2011). Ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) y su aplicación en diversas situaciones clínicas. *Revista Chilena de Nutrición*, 38(3), 356-367. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182011000300011>
- Valls, J. E., & Paredes, A. (2010). Caracterización física y química de la sardina (*Sardinella aurita*). *Revista Científica*, 20(5), 546-554.
- Valverde, L. M., Moreno, P. A. G., Callejón, M. J. J., Cerdán, L. E., & Medina, A. R. (2013). Concentration of eicosapentaenoic acid (EPA) by selective alcoholysis catalyzed by lipases. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(9), 990-1004. doi:10.1002/ejlt.201300005
- Velásquez, G. (2006). *Fundamentos de alimentación saludable*. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
- Wijayarathne, U., & Wasalathilake, K. (2014). Aspen Plus Simulation of Saponification of Ethyl Acetate in the Presence of Sodium Hydroxide in a Plug Flow Reactor. *Journal of Chemical Engineering & Process Technology*, 2014. doi:10.4172/2157-7048.1000205
- Yúfera, E. P. (2007). *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria* (Vol. 2). Reverté. Valencia, España.
- Zamorano, M., Martínez, S., & Medel, J. (2013). Comportamiento del perfil de ácidos grasos de aceites y materias grasas hidrogenadas sometidos a calentamiento prolongado. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*. Universidad Nacional de Cuyo, 45(1), 0-0.



www.ute.edu.ec

EnfoqueUTE

REVISTA

Volumen 8
Número 4
Septiembre 2017

e-ISSN 1390-6542
p-ISSN 1390-9363



TRASCENDE
DONDE
NADIE
HA
LLEGADO