

Revista de



TECNOLÓGICO

RIDTEC | Vol. 11, N.º2, Julio - Diciembre 2015

ISSN16880-8894

Edición Semestral

Publicación Regional

Publicación y directorio
en catálogo

latindex

www.latindex.unam.mx



EDITORIAL
TECNOLÓGICA

Revista de TECNOLÓGICO

Revista de investigación de la Universidad Tecnológica de Panamá

Volumen 11, Número 2, Edición Semestral, Julio - Diciembre 2015
ISSN 1680-8894

Director del Comité Editorial

Dr. Humberto Rodríguez
Dirección de Investigación
Universidad Tecnológica de Panamá

Comité Editorial

Dr. Humberto Álvarez
Centro de Investigación e Innovación Eléctrica, Mecánica de la
Industria (CINEMI)
Universidad Tecnológica de Panamá

Dr. Wedleys Tejedor
Centro de Producción e Investigaciones Agroindustriales (CEPIA)
Universidad Tecnológica de Panamá

Dr. Carlos Medina
Facultad de Ingeniería Eléctrica
Universidad Tecnológica de Panamá

Dr. Jaime Estrella
Consultor e Investigador en Biología Molecular y Evolución; Especialista en Biodiversidad Agrícola.

Dra. Jazmina Urriola
Dirección de Investigación y Desarrollo (I+D)
Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT)

Ing. Eli Faskha
Miembro del Consejo Nacional de la Empresa Privada (CONEP) y de la Junta Directiva de Cámara Panameña de Tecnología y Comunicaciones

Suplentes

Dr. Ramfis Miguelena
Centro de Investigación, Desarrollo en Tecnologías de la Información y las Comunicaciones (CIDITIC)
Universidad Tecnológica de Panamá

Lic. José Javier Rivera
Miembro del Consejo Nacional de la Empresa Privada (CONEP)



Ing. Libia Batista
Directora

Licda. Sandra Siebert
Sr. Armando Pinillo
Mercadeo y Ventas

Sección de Diseño Gráfico
Diseño y diagramación

Licdo. Rafael Saturno
Idea y diseño original de la portada

Lcda. Klenya Morales
Corrección de estilo

Ing. Eduardo Caballero
Coordinación y logística
Dirección de Investigación, UTP.

Escribir en I+D Tecnológico
<http://utp.ac.pa/publicaciones-digitales-de-la-revista-de-id-tecnologico>

Plataforma para la Recepción de Artículos
<http://www.redinvestigadores.utp.ac.pa/revista+D/openconf/openconf.php>

© Derechos reservados, UTP, 2015

Impreso en Panamá, Ciudad de Panamá
Imprenta de la Universidad Tecnológica de Panamá
Tiraje: 300 ejemplares.

Contenido

7

Método por Tres Valores Mejorado un método estocástico para la estimación temprana de la duración de los proyectos

Enhanced Three Point Estimation Method a stochastic method for the early estimation of the duration of projects

Pablo Andrés Ortiz

18

Lipid oxidation of Dutch style semi-dry fermented sausages prepared with beef and ostrich meat enriched with encapsulated linseed, algal and fish oil

Oxidación lipídica de embutidos fermentados semisecos estilo holandés preparados con carnes de res y avestruz enriquecidos con aceites encapsulados de linaza, algas y pescado

Kathia Broce | Jozef Linssen

29

Diseño de rodilla policéntrica, simulación y evaluación de la resistencia a la fatiga

A polycentric knee design, simulation and evaluation of fatigue resistance

Domingo Vega M. | Eduardo Escobar

35

Producción de hidrocarburos biológicos utilizando un subproducto agroalimentario como sustrato

Production of biological hydrocarbons using an agrifood product as a substrate

Kesia M. Barrows | Ubaldo Ábrego-Delgado | Grimaldo Ureña-Matos | Indira Franco

40

Determinación de metales pesados mediante el uso del *Artificial Mussel* bajo condiciones controladas de pH, salinidad y temperatura: Estudio de validación

Determination of heavy metals using the Artificial Mussel under controlled conditions of pH, salinity and temperature: Validation study

Alma Chen | Kathia Broce

48

Instructivo para autores

Guide for authors

Revista indexada en:



www.latindex.unam.mx



Universidad Tecnológica de Panamá

AUTORIDADES

Dr. Oscar M. Ramírez R.

Rector

Ing. Rubén D. Espitia P.

Vicerrector Académico

Dra. Casilda Saavedra de Madrid

Vicerrectora de Investigación, Postgrado y Extensión

Ing. Esmeralda Hernández P.

Vicerrectora Administrativa

Ing. Luis A. Barahona G.

Secretario General

Lic. Jeremías Herrera D.

Coordinador General de los Centros Regionales

Mensaje del Rector

La investigación, la innovación y la transferencia tecnológica son ejes fundamentales del desarrollo sostenible de un país o región, y le corresponde a las universidades, como entes formadores y generadores del conocimiento, la gran responsabilidad de liderizar esta condición imprescindible en la nueva era del conocimiento. La Universidad Tecnológica de Panamá, consciente de esta responsabilidad, crea espacios de comunicación entre investigadores para que la comunidad científica a nivel nacional, regional e internacional, cuente con mecanismos de intercambio de información los cuales contribuyen al desarrollo y transformación de nuestras naciones. Es importante, además, asegurar que los resultados de las investigaciones se proyecten hacia la solución de problemas, por lo que también la sociedad debe conocer del quehacer científico de sus universidades.

La Universidad Tecnológica de Panamá se complace en presentar a la comunidad científica en general la segunda edición del año 2015 de la Revista de I+D Tecnológico, correspondiente al volumen 11 número 2. Desde su lanzamiento en el año 2002, la RIDTEC se ha constituido en una plataforma importante para que docentes e investigadores de la UTP, del país y de la región, puedan divulgar sus trabajos científicos. La Revista I+D Tecnológico ha crecido y se ha fortalecido en estos 13 años de existencia, logrando la indexación en Latindex en el año 2013.

Queremos extender una cordial invitación a los investigadores de la región, para compartir por este medio sus trabajos, en beneficio del fortalecimiento de la gestión y desarrollo de proyectos de I+D con alto contenido científico y tecnológico.

Dr. Oscar M. Ramírez R.

Rector

Universidad Tecnológica de Panamá

resentación

La Universidad Tecnológica de Panamá se complace en presentar a la comunidad científica en general la segunda edición del año 2015 de la Revista I+D Tecnológico, correspondiente al volumen 11, número 2. En esta edición se han incluido trabajos en las áreas de Ingeniería de Proyectos, Ingeniería de Alimentos, Biomecánica, Síntesis Biológica e Ingeniería del Medio Ambiente.

En el primer artículo, Pablo Ortiz de la Universidad Tecnológica de Uruguay nos presenta una nueva técnica denominada Método por Tres Valores Mejorado (MTVM) para la estimación de la duración de proyectos, la cual incorpora una estimación de los factores de riesgo de retraso en las etapas tempranas de los proyectos. Para ello, aplica la Distribución Beta-Rectangular que usa los valores heurísticos del Cono de Incertidumbre de Boehm y el juicio de expertos.

La Dra. Kathia Broce nos presenta una evaluación de la calidad de un nuevo producto alimenticio, a saber, salchichas tipo holandesas preparadas con aceites encapsulados de linaza, alga, y pescado, como sustitutos de la grasa dorsal del cerdo, y para aumentar los niveles de ácidos grasos poliinsaturados (especialmente los omega 3 o n-3). Las carnes de res y avestruz fueron utilizadas como ingrediente cárnico. La oxidación lipídica fue estudiada hasta los 60 días de almacenamiento y se utilizaron las mediciones de peróxido (PV), de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y el hexanal como marcadores de oxidación y deterioro del producto. Además, se usó evaluación sensorial.

El trabajo que nos presenta el Dr. Domingo Vega se enfoca en el diseño de los componentes de una rodilla policéntrica, por lo que incorpora la simulación de su comportamiento cuando es sometida a cargas estáticas y dinámicas. El proceso se realiza en tres fases, mediante

software de simulación numérica: una de síntesis y dimensionamiento; otra de diseño y simulación del comportamiento estático y finalmente una de simulación del comportamiento de resistencia a fatiga. En el diseño se emplearon e integraron dos materiales, acero A36 y Aluminio 6061-T6, lo cual permite obtener el desempeño deseado a un menor costo.

En el área de Biología Sintética, los autores liderados por Kesia Barrows nos presentan los resultados de un trabajo de investigación que tuvo como objetivo la obtención de alcanos de origen biológico a partir de la melaza, como sustrato principal en el cultivo bacteriano M9. Las bacterias utilizadas fueron *Escherichia coli* K12, las cuales se modificaron genéticamente para que expresaran la enzima *Acyl-ACP Reductasa* (AAR) y la *Aldehído Descarboxilasa* (ADC) de *Synechococcus elongatus* PCC7942. Esta modificación se realizó mediante métodos desarrollados en el campo de la biología sintética.

En el último artículo de esta edición, Alma Chen presenta un estudio sobre el uso de “*Artificial Mussels* (AM)” para el monitoreo de metales pesados en ambientes acuáticos tropicales. Los AM consisten en un polímero ligando capaz de acumular y liberar metales en respuesta a la concentración de éstos disueltos en el agua marina, permitiendo así su evaluación y comparación directa. El estudio contempla construcción y validación de la eficiencia de captura de los metales cadmio, cobre y cromo por parte del AM, bajo condiciones controladas de pH, salinidad y temperatura en el laboratorio.

DR. HUMBERTO RODRÍGUEZ DEL ROSARIO
Director del Comité Editorial
Julio - Diciembre de 2015

Método por Tres Valores Mejorado un método estocástico para la estimación temprana de la duración de los proyectos

Enhanced Three Point Estimation Method a stochastic method for the early estimation of the duration of projects

Pablo Andrés Ortiz
Área de Mecatrónica, Universidad Tecnológica del Uruguay
pablo.ortiz@utec.edu.uy

Resumen— La tasa de proyectos no exitosos (esto es, cancelados o modificados) se mantiene en valores significativamente altos, para el Standish Group [1] este valor es del 61 % y para IBM [2] del 59 %. La estimación de la duración de los proyectos se cita como una de las causas principales de este fenómeno. En la práctica se aplican métodos sencillos, como es el caso de PERT/ Método por Tres Valores (MTV), que en general subestiman la duración del proyecto; por otra parte métodos más precisos, aunque más complejos, como el método Monte Carlo (MMC), son raramente usados por los estimadores. Adicionalmente, en las etapas tempranas de estimación, donde nos enfocaremos, la gran mayoría de los métodos no consideran el factor de riesgo o se usan técnicas simples que no evalúan el riesgo en detalle. Este artículo propone una técnica de estimación temprana que considere los factores de riesgo inherentes de esta etapa y logre una buena precisión. Se propone entonces una técnica denominada Método por Tres Valores Mejorado (MTVM). La cuantificación de los riesgos se establece aplicando la Distribución Beta-Rectangular que usa los valores heurísticos del Cono de Incertidumbre de Boehm y el juicio de expertos. Se usará evidencia empírica y teórica para validar este método, comparando los resultados del mismo con los valores de cuatro proyectos reales de tecnología y teóricamente con los valores estimados por el método Monte Carlo.

Palabras claves— Cono de incertidumbre de Boehm, Estimación temprana, Distribución Beta-Rectangular, Método Monte Carlo, Método por Tres Valores.

Abstract— The rate of failed (i.e. failed or challenged) projects remains at significantly high values, for the Standish group this rate is 61 % and for IBM 59 %. The estimation of project duration is one of the principal causes cited for this observation. In practice, simple methods such as PERT/ Three point estimation values are used, which in general underestimate project duration; on the other hand, when more precise, but also more complex methods are proposed, such as Monte-Carlo simulation, these are rarely used by estimators. Additionally, in the early phases of estimation, which we focus here, the great majority of methods do not consider the factor of risk or simple techniques are used that do not evaluate the risk in detail. This article develops a technique for early estimation that is based on the risk factors inherent to this phase and get a good precision. We propose a technique called Enhanced Three Point Estimation (ETPE). The risk quantification is established by applying a Beta-Rectangular Distribution using the heuristic values of the Boehm's Cone of Uncertainty and through expert judgment. We use empirical and theoretical evidence to validate the method, comparing its results with real-life values of four technology projects and for the theoretical comparison with the estimated values of the Monte-Carlo method.

Keywords— Boehm cone of uncertainty, Early estimation, Beta-Rectangular Distribution, Monte Carlo method, Three point estimation.

Tipo de artículo: Original

Fecha de recepción: 13 de febrero de 2015

Fecha de aceptación: 30 de octubre de 2015

1. Introducción

No existe una única causa que determine el éxito, o fracaso de un proyecto, ya que éste por definición es “único” en su esencia [3]. No obstante, diversas fuentes ratifican que la estimación de la duración de los proyectos es una de las causas que los Gerentes de Proyecto (GP) manifiestan como uno de los errores en los que incurren más frecuentemente, y

también aducen que es uno de los factores más complejos de calcular.

El problema se acentúa si la estimación se realiza en etapas tempranas¹. En este punto la estimación tiene un alto grado de incertidumbre debido a que la información del proyecto es muy acotada e incompleta [3], por ejemplo, de acuerdo al PMI [3] varía en el rango [-25 %, +75 %]. En etapas más tardías, cuando el proyecto ya está en implementación, es cuando las estimaciones se vuelven más confiables. Este es un problema cotidiano

¹ Definiremos como tal el momento en que se tienen definidos, completados y firmados los requisitos del cliente, el llamado Documento de Requisitos [3].

para el GP, proveer estimaciones confiables en etapas tempranas del proyecto (o muy tempranas). Esta estimación, primaria e imprecisa, es tomada por el cliente (y a veces por la propia empresa proveedora) como un compromiso inamovible del proyecto, quedando el GP rehén de la misma.

Una de las razones de la inexactitud de la estimación es que la probabilidad de que ocurran eventos imprevistos es muy alta en las etapas tempranas del proyecto. Esto pone de manifiesto que uno de los factores que tiene un peso superlativo en ese momento es el análisis del Riesgo y en consecuencia este factor debería incidir si se quiere mejorar la precisión de la estimación. No obstante, muchas técnicas no consideran la incertidumbre en las estimaciones de las duraciones y/o costos o se usa un método muy simple en lugar de realizar una evaluación detallada del riesgo [5], [6]. Proponemos, en consecuencia, un enfoque más completo, que integre el riesgo en el modelo propuesto el cual se ha denominado Método por Tres Valores Mejorado (MTVM).

Adicionalmente se asumirá que no se dispone de información histórica, es decir, de una base de datos con información de proyectos anteriores que puedan servir de base para una mejor estimación, situación que es sumamente frecuente, identificándose hasta un 60 % de proyectos en esta situación.

En resumen, el objetivo principal del trabajo fue desarrollar una técnica de estimación estocástica que permitiera calcular la duración de proyectos en un marco de incertidumbre en etapas tempranas, cuantificando ésta y formulando un modelo con una buena precisión.

2. Revisión bibliográfica

Existen diversas clasificaciones usadas en las técnicas de estimación, no obstante, una categorización frecuente es dividir las en dos grupos: algorítmicas y no-algorítmicas [7], [8]. Los modelos algorítmicos están basados en algoritmos especiales, por ejemplo modelos de regresión múltiple. Estos se basan en relaciones matemáticas y parámetros con los que realizan las estimaciones. Por otra parte los modelos no algorítmicos están basados en comparaciones analíticas e inferencias [8].

En el grupo de las técnicas algorítmicas se ubican los métodos de estimación paramétricos y otra diversidad de métodos, especialmente fértiles en el campo de la Ingeniería de *Software* (citemos, a modo de ejemplo, los métodos

COCOMO, Puntos de Función, SLIM, entre otros). A este grupo también pertenecen las estimaciones paramétricas: estimación WBS (*Work Breakdown Structure*), el Método por Tres Valores (MTV) y el Método Monte Carlo (MMC). En las técnicas no algorítmicas se encuentran el juicio de expertos y la estimación por analogía, entre otros.

Nos centraremos principalmente en el MTV (Método por Tres Valores o Estimación por Tres Puntos), base del MTVM y en el MMC.

2.1 Técnica del Método por Tres Valores

Esta técnica basada en la técnica PERT (*Program Evaluation and Review Technique*) [9], se basa en las siguientes hipótesis [10]:

- las actividades siguen una distribución Beta, y no existe correlación en la duración de las actividades;
- la estimación por tres puntos (esto es, MTV), puede ser usada para modelar la distribución de probabilidad de las actividades;
- solamente existe un camino crítico y ningún otro camino es candidato a ser crítico;
- las actividades del calendario son ignoradas.

En particular, a partir del punto b. se ha propuesto una estimación para la duración y desvío de un proyecto que emplea las siguientes ecuaciones:

$$E(x) = \frac{O+4M+P}{6} \quad (1)$$

$$Var(x) = \frac{(P-O)^2}{36} \quad (2)$$

donde:

- O. Valor optimista de duración de la tarea.
- M. El valor más probable (moda) de la tarea; el valor mas frecuente.
- P. Valor pesimista de duración de la tarea.

El procedimiento se inicia descomponiendo progresivamente el proyecto en un conjunto de módulos estimables, de lo cual resulta un árbol que se denomina Estructura de Desglose de Trabajo (EDS) o en inglés WBS término que adoptaremos dada su amplia difusión.

Los módulos del nivel inferior, es decir, aquellos con mayores nivel de detalle, indivisibles y estimables, se denominan Paquetes de Trabajo (PT) [3], su duración y desvío se estiman usando las ecuaciones (1) y (2).

Luego la duración total del sistema se obtiene sumando la duración de todos los PT del proyecto.

No obstante, teniendo en cuenta la etapa temprana en la cual nos ubicamos, se advierte que en muchos casos para cuantificar el riesgo del proyecto es más factible considerar módulos más genéricos que el PT, ya que en ese momento no se dispone de la información necesaria para realizar un análisis de riesgo con ese nivel de granularidad. Por ello definiremos un elemento al cual denominamos genéricamente como Componente (CO), el cual debe cumplir dos propiedades importantes:

- a. todos los hijos de un componente tienen el mismo grado de riesgo, caso contrario, se deberá descomponer el CO hasta tanto se cumpla esta premisa (eventualmente podrá no tener hijos, es decir, será un PT);
- b. el CO se ubicará indistintamente en el primer, segundo o tercer nivel del WBS, en tanto el análisis del riesgo se pueda realizar de forma tan rigurosa y cuantitativa como sea posible.

2.2 Método Monte Carlo

Cuando las actividades de un proyecto se conocen con certeza, calcular la duración de un proyecto es una cuestión relativamente directa, pero en la mayoría de los proyectos ocurre lo contrario, la duración de las actividades solo se conoce con un alto grado de incertidumbre [11], en estos casos se recurre a otras técnicas, la más difundida es el Método Monte Carlo (MMC).

Esta técnica fue creada por Ulam y Von Neuman en 1949, pero recién en 1963 Van Slyke la aplicó por primera vez en el cálculo de la duración de los proyectos [11].

El MMC, es un método de simulación que implica la toma de muestras al azar de cada distribución de probabilidad del modelo para producir cientos o miles de iteraciones, los resultados forman una distribución general para el modelo que refleja la distribución de la duración total del proyecto.

Una de las ventajas más importantes del MMC es la capacidad para definir la distribución más adecuada para la duración de cada actividad en lugar de fijar una única distribución para todo el proyecto (como lo asume la técnica MTV, en su acepción más aplicada). La clave es identificar cuáles son las distribuciones de probabilidad adecuadas que deben utilizarse para simular cada una de las variables

aleatorias de un modelo [11]. Esto normalmente requiere analizar información empírica o histórica y ajustarla a alguna distribución. Como contraparte, es un método de muy baja aceptación por parte de estimadores y GP [12], [13].

Para la simulación usaremos una de las técnicas del MMC denominada Método de Replicaciones Independientes (MRI). La misma se basa en un concepto resumido en [14] (p. 360): "...la simulación Monte Carlo está basada en un conjunto de varias replications del mismo sistema, estático, estocástico del mismo parámetro de interés".

Consecuentemente en el MRI se realizan r replications (simulaciones) independientes e idénticamente distribuidas del sistema en lugar de una gran replicación de tamaño m , donde cada replicación consiste de k valores y $k = m/r$. Es importante que la cantidad de replications se mantenga reducida, típicamente $10 \leq r \leq 30$, para que k sea suficientemente grande ya que interesa el comportamiento del sistema en el largo plazo [15].

Se ejecutarán r replications cada una con k observaciones para la variable Y (siendo Y la variable observada), por ejemplo, para la replicación 1 se tendrán los valores $Y_{1,1}, Y_{1,2}, \dots, Y_{1,k}$, la media de la de la fila 1 la denominaremos X'_1 , por tanto para las replications de $j=1, \dots, r$ tendremos:

$$X'_j = \frac{1}{k} \sum_{i=1}^k Y_{j,i} \quad (3)$$

El estimador final para el valor esperado de la media (llamado a veces gran media) y la varianza es:

$$\bar{X}(r) = \frac{1}{r} \sum_{j=1}^r X'_j \quad (4)$$

$$S^2 = \frac{1}{r-1} \sum_{j=1}^r \left(X'_j - \bar{X}(r) \right)^2 \quad (5)$$

3. El Método por Tres Valores Mejorado

El MTVM se basa en el MTV y ajusta su precisión incorporando el concepto de riesgo.

Los pasos son los siguientes:

1-2. Se descompone progresivamente el proyecto, usando la técnica WBS, hasta un nivel donde cada componente (y sus subcomponentes) tengan un nivel uniforme de riesgo (ver reglas en la sección 2.1). En efecto, como

sugiere Cooper et al., un análisis sistemático del riesgo debe ser hecho subdividiendo un proyecto en sus módulos principales (los componentes) para luego analizar el riesgo y la incertidumbre en detalle [16].

Dada la criticidad de este paso, una incorrecta priorización (ordenamiento) de los riesgos puede alterar significativamente el resultado, debido a ello se compararon varios métodos de priorización: AHP (*Analytic Hierarchy Process*) [17], *Binary Search Tree* [18], *Bubble Sort* [19] y *Cost-value ranking* [20] entre otros. El método AHP se basa en que cada componente se compara con todos los restantes (comparación por pares; i.e., “todos contra todos”). Este método ha recibido diversas críticas, por ejemplo, se menciona que es un método costoso tanto en la colección de los datos como en el análisis. Efectivamente, la cantidad de cálculos que deben realizarse es de $O(n^2)$, por lo que su uso se recomienda con no más de 20 ítems (en nuestro caso 20 componentes es una cantidad razonable para los proyectos de tamaño medio o medio-grande analizados), lo que implica una limitante en el escalamiento. No obstante, como menciona Karlsson, “la comparación por pares implica mucha redundancia y por tanto es menos sensible a los errores de juicio que las técnicas que usan asignaciones absolutas” [20], además garantiza la consistencia de comparación de alternativas durante el proceso, por lo que a nuestro juicio, resulta la mejor elección entre las técnicas analizadas.

3. Los componentes se clasifican según su riesgo en Riesgo Bajo (RB), Riesgo Medio (RM) o Riesgo Alto (RA), aplicando juicio de expertos por parte del estimador y/o equipo de trabajo.

4. A continuación, se suman las duraciones de cada componente según la categoría de riesgo en la que haya sido clasificado el componente. Es decir, la duración de todos los componentes de RB más la duración de los de RM más la duración de los de RA.

Para ello se usan los valores de media y desvío estándar de la función de distribución Beta-Rectangular $f(BR)$ con los parámetros pertinentes según el tipo de riesgo del componente:

$$E_i(t) = \text{Media}(f_{BR_i}(O, M, P)) \quad (6)$$

$$\text{Var}_i(t) = \text{Var}(f_{BR_i}(O, M, P)) \quad (7)$$

$$\{i = RB, RM, RA\}$$

5. Finalmente, se suma la duración esperada y la varianza de todos los componentes para determinar la duración, varianza y desvío del proyecto.

3.1 Procedimiento para el cálculo de la duración, varianza y desvío estándar

El método, como se infiere de (6) y (7), requiere determinar los parámetros O, M y P que usa la función de distribución, lo que explicaremos en esta sección.

Los valores de O, M y P se obtendrán de la valoración del riesgo del proyecto, para lo cual se propone el uso de los parámetros del llamado “cono e incertidumbre” [21], [22] como se ilustra en la figura 1.

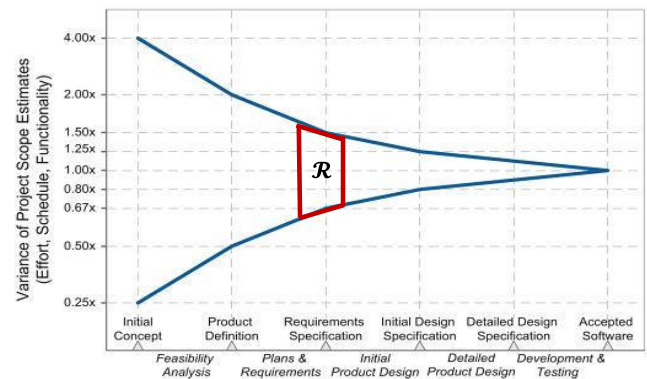


Figura 1. Cono de Incertidumbre.

El concepto de “cono de incertidumbre” representa la evolución de la incertidumbre de un proyecto durante su ciclo de vida. Propuesto inicialmente por Boehm [21] y posteriormente refrendado por McConnell [22] y otros autores, en la actualidad es usado y aceptado ampliamente en la industria de TIC (Tecnologías de la Información y la Comunicación). No obstante algunos autores han presentado fundados reparos al mismo [23], [24]. En consecuencia, estos parámetros deben valorarse como heurísticas propuestas por los autores aunque refrendados ampliamente por la industria. Los intervalos de variación, mínimos y máximos según la fase de avance del proyecto (figura 1), con un 80 % de confiabilidad [21] son:

1. Concepto Inicial. Min.: 0,25; Max.:4.0.
2. Definición del Producto. Min.:0,5; Máx.: 2.
3. Requerimientos Completos. Min.: 0,67; Max.: 1,5.
4. Diseño de la Interface del Usuario completa. Min.:0,8; Max.:1,25.
5. Diseño detallado completo. Min: 0,9; Máx.:1,10.

El valor de la incertidumbre en la fase que nos interesa, esto es, “Requerimientos Completos” (correspondiente a la Estimación Temprana), establece una variación de [0,67 (67 %); 1,5 (150 %)]. Esta referencia si bien establece un rango mínimo y máximo en la variación (eje de las ordenadas) y representan “el mejor caso” (otros factores pueden conducir a valores superiores [22]), no contempla que el que la incertidumbre también puede variar en función del momento en el que comience la etapa de Especificación de Requerimientos y la duración de la misma (variación en el eje de las abscisas), por ejemplo, un relevamiento realizado en un corto tiempo conlleva mayores riesgos que uno que se realiza en un tiempo mayor. Esto define una región R de incertidumbre (recuadro en la figura 1).

Asumamos que al tiempo de comienzo de la etapa se le asigna un valor concreto; de acuerdo a diversos estudios las dos primeras fases tienen una duración de 22 % aproximadamente, tal como lo ratifican los valores de la tabla 1 extraídos del estudio de Eveleens y Verhoef [25] (p.969).

Tabla 1. Valores de duración del Cono de Incertidumbre

McConnell phase	Organization phase(s)	% of completion
Initial product concept	Feasibility study	0%–14.4%
Approved product concept	Business study	14.4%–21.8%
Requirements specification	Functional model iteration	21.8%–30.8%
Product design specification	1/2 of Design & Build iteration	30.8%–40.7%
Detailed design specification	1/2 of Design & Build iteration, System testing Functional acceptance Product acceptance and implementation	40.7%–100%

Luego, si bien un proyecto depende de múltiples factores, tales como dominio de proyecto (sector de la industria), requerimientos funcionales, tamaño y experiencia del equipo de trabajo, etc.; para proyectos que aplican metodologías tradicionales en TIC, los valores considerados por la industria para la fase de requerimientos varían en un entorno mínimo de 5 % y máximo de 20 %, este rango permite establecer cotas según el tipo de riesgo, tal como se detalla en la tabla 2.

Tabla 2. Cotas Inferiores y Superiores

Tipo Riesgo	Min	Máx	Cota Inf	Cota Sup
RA	5 %	10 %	27 %	32 %
RM	10 %	15 %	32 %	37 %
RB	15 %	20 %	37 %	42 %

Efectivamente, para los RA se puede considerar con duración mínima del 5 % y una máxima del 10 %, si estos valores se suman al 22 % de duración de las etapas anteriores (el valor 21,8 % de la tabla 1), se obtienen valores de cota inferior y superior de 27 % (22 %+5 %) y 32 % (22 %+10 %) en el tiempo, ver figura 2. Similar razonamiento se aplica a los restantes tipos de riesgo.

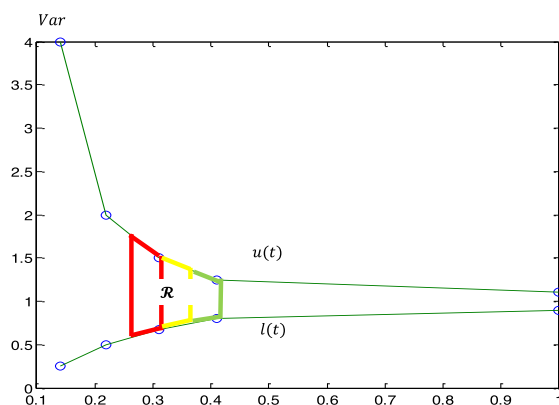


Figura 2. Región de Incertidumbre.

Basándonos entonces en que la Especificación de Requerimientos comienza un 22 % luego de iniciado el proyecto y en los valores de la tabla 2, es factible aplicar interpolación de segmentos lineales (*splines*) para los valores de tiempo $t = \{27\%, 32\%, 37\%, 42\%\}$ y obtener los valores de ordenada de las curvas $l(t)$ con los valores inferiores (optimistas) y los valores $u(t)$ con los valores superiores (pesimistas). Luego, considerando el valor inferior de ordenada de cada tipo de riesgo se obtiene:

$$l(t) = \{68\%, 75\%, 80\%\} \quad \text{y}$$

$$u(t) = \{148\%, 135\%, 125\%\}$$

Quedando, en consecuencia, definida la región \mathcal{R} de incertidumbre, tal como se aprecia en la figura 2.

Esto permite interpolar las curvas en cualquier punto deseado y obtener valores estimados para los parámetros O, M y P según sea el tipo de riesgo, tal como lo indica la tabla siguiente.

Tabla 3. Valores de los parámetros O, M y P

Cotas de Riesgo			
Tipo de Riesgo →	RB	RM	RA
Cota Superior (P)	125 %	135 %	148 %
Cota Media (M)	103 %	105 %	108 %
Cota Inferior (O)	80 %	75 %	68 %

Adviértase que el rango para los RB es bastante similar a los valores de Boehm indicados anteriormente (67 %; 150 %), lo cual corrobora una estimación razonable.

3.2 La Función Beta-Rectangular

El método MTVM busca asociar el tipo de riesgo con la distribución más adecuada para estimar su duración, a diferencia del MTV tradicional donde se usa (por lo general) una única distribución para todos sus componentes, usualmente la distribución Beta-PERT.

Para la elección de la distribución observaremos el comportamiento de la media y desvío estándar. Un componente de alto riesgo será deseable que se corresponda con una función de distribución con mayor media y desvío que otro de menor riesgo. Goodpasture señala que la media y desvío estándar es mayor en la Distribución Normal que en la Distribución Uniforme [26] y esta a su vez mayor que la distribución Beta. Por su parte otros autores proponen que el orden de las distribuciones, según su desvío creciente, es: beta, normal, triangular y uniforme. No obstante, en la práctica la distribución Beta-PERT resulta superlativa en su aplicación [27], [28].

Hahn propone una nueva función que denomina Beta-Rectangular la cual se basa en la función Beta-PERT pero subsana las restricciones en los parámetros que limitan los diferentes niveles de incertidumbre en la duración de las actividades, es decir, no proveen la ductilidad necesaria para el tratamiento específico de la incertidumbre del proyecto [29].

La función Beta-Rectangular incorpora un parámetro θ : $0 \leq \theta \leq 1$ expresando la ecuación de la siguiente forma ([27], p.453):

$$p(x|\alpha, \beta, \theta) = \frac{\theta \Gamma(\alpha + \beta) (x-a)^{\alpha-1} (b-x)^{\beta-1}}{\Gamma(\alpha) \Gamma(\beta) (b-a)^{\alpha+\beta+1}} + \frac{1-\theta}{b-a} \quad (8)$$

Esta ecuación es válida en el intervalo $a \leq x \leq b$ y tiene valor 0 fuera del mismo.

Cuando $\theta=0$ se obtiene la distribución uniforme, que representa la máxima incertidumbre, inversamente cuando $\theta=1$ se obtiene la distribución Beta-PERT, la de menor incertidumbre, cuando $\theta=0,86$ se obtienen valores similares a la triangular. Esto serán los valores que adoptaremos. No

obstante, adviértase que dada la ductilidad de la función se pueden establecer los valores más adecuados al proyecto bajo estudio a criterio del estimador.

La expresión de las ecuaciones de tres valores para el valor esperado y la varianza para esta función es:

$$E(x) = \frac{\theta(O+4M+P)+3(1-\theta)(O+P)}{6} \quad (9)$$

$$Var(x) = \frac{(P-O)^2(3-2\theta^2)}{36} \quad (10)$$

Estas serán las ecuaciones que usaremos para determinar la media y desvío de los componentes.

3.3 Precisión del Método

Para la validación teórica comparativa entre el método MMC, MTVM y MTV el resultado esperado deberá cumplir:

$$Dur. MTV \leq dur. MTVM \leq dur. MMC$$

Para la validación empírica se usarán los estimadores de precisión más comúnmente usados en la industria: MRE (*magnitude of relative error*; magnitud del error relativo) y MMRE (*mean magnitude of relative error*; magnitud promedio del error relativo). Se acepta, siguiendo a Conte et al., que la precisión es buena si el valor de estos indicadores es menor o igual a 25 % [30].

4. Validación teórica

Se propone en primer lugar un método teórico que funcionará en carácter de piloto para validar el modelo inicialmente y luego proceder a su validación empírica.

4.1 Método Monte Carlo

Se generaron 100 CO con una duración aleatoria entre 8 y 320 horas.

1. Para estos CO se generaron tres de conjuntos escenarios:

- a. Riesgos Bajos. Se crearon 5 escenarios posibles con distintas cantidades de componentes y prevalencia de los RB y,
- b. 5 escenarios para los RM y 5 para los RA respectivamente, totalizando 15 escenarios.

2. Se agruparon y totalizaron los componentes de

riesgo similar, llegándose a un total en horas por tipo de riesgo; por ej., para los RB:

$$total_hrs_{RB} = \sum_{i=1}^{cant\ RB} dur(CO_i)$$

De forma similar se procedió a totalizar la duración de los RM y RA.

- Finalmente se calcularon las distintas duraciones aplicando los métodos MTV, MTVM y MMC considerando aceptable el resultado si éste satisface (9).

4.2 Método por Tres Valores

Las ecuaciones de las medias y varianzas son:

$$E(x) = \left(\frac{O+4 \times M+P}{6} \right) \sum_{i=1}^{100} t(CO_i) \quad (11)$$

$$Var(x) = \left(\frac{O-P}{6} \right)^2 \sum_{i=1}^{100} t(CO_i) \quad (12)$$

donde los valores (O, M, P) corresponden a los valores de la columna RB del Tabla 3 (P=125 %; M=103 %; O=80 %).

4.3 Método por Tres Valores Mejorado

Basándose en (9) y (10) y con $\theta=1$ para los RB, $\theta=0,86$ para los RM y $\theta=0$ para los RA, las ecuaciones quedarán expresadas de la siguiente forma:

$$E_j(x) = \left(\frac{\theta(O+4M+P)+3(1-\theta)(O+P)}{6} \right) \times \sum_{i=1}^{cant\ R_j} t(CO_i) \quad (13)$$

$$Var_j(x) = \left(\frac{(P-O)^2(3-2\theta^2)}{36} \right) \times \sum_{i=1}^{cant\ R_j} t(CO_i) \quad (14)$$

Donde $j=1,2,3$ corresponde con los tres tipos de riesgo y representa la cantidad de riesgos de tipo j .

4.4 Método Monte Carlo

Se aplicó el método MRI asumiendo $k=m/r$ con los siguientes valores:

$r=25$; cantidad de replicaciones
 $k=3000$; cantidad de observaciones p/replicación
 $m=75.000$; total de observaciones

Es decir, que para cada simulación (escenario) se usaron 75.000 datos para simular el modelo teórico, los resultados representan los valores ideales teóricos y es deseable que el método MTVM se aproxime lo más posible a ellos, tal cual se expresa en (11).

Para simular los valores del MMC se opta por la Distribución Normal, ya que se consideran 100 valores independientes, por lo que el Teorema Central del Límite habilita el uso de esta distribución. Por tanto se usará la media:

$$E(x) = O + (P - O) / 2 \quad (15)$$

y

$$Var(x) = (P - O) / 6 \quad (16)$$

consecuente con Goodpasture [24] (p.53).

4.5 Resultados Obtenidos

El comportamiento del método y los resultados derivados fueron muy consistentes para todos los tipos de riesgo.

A modo de ejemplo veamos el grupo de CO aleatorios en los que el tipo de riesgo preponderante se consideró Bajo. Se generaron 5 escenarios (En), con 100 componentes en total pero con preeminencia siempre de RB (i.e., un proyecto de “bajo riesgo”), a partir de lo cual se obtuvieron los siguientes resultados para la media (μ) y desvío estándar (σ):

Tabla 4. Resultados de la Simulación con RB

Método	$\mu E1$	$\sigma E1$	$\mu E2$	$\sigma E2$	$\mu E3$	$\sigma E3$	$\mu E4$	$\sigma E4$	$\mu E5$	$\sigma E5$
MTV	18411	9	18411	9	18411	9	18411	9	18411	9
MTVM	18810	25	18681	23	18648	22	18519	20	18411	18
Monte Carlo	18801	25	18689	26	18654	30	18.515	34	18407	46

En cuanto a la precisión de las estimaciones se obtuvieron resultados muy aceptables:

Tabla 5. Ajuste del modelo

	E1	E2	E3	E4	E5	MMRE
MRE MTVM	0,05%	0,04%	0,03%	0,02%	0,02%	0,03%
MRE MTVM+1 σ	0,18%	0,08%	0,09%	0,13%	0,12%	0,12%
MRE MTVM+2 σ	0,32%	0,20%	0,21%	0,23%	0,21%	0,23%

Para los 3 tipos de riesgos y los 15 escenarios distintos las medias resultaron en valores muy satisfactorios, con una alta correspondencia con los valores de la simulación del MMC y superiores a los valores de MTV. En todos los casos se validó (11). En cuanto a los desvíos estándar, se advierte que el MTVM presenta valores levemente superiores, pero totalmente aceptables para los tiempos de duración de los CO que se manejan.

5. Validación Empírica

El método propuesto se contrastó con los resultados de cuatro proyectos reales de TIC realizados durante el período 2008-2012, en las áreas de retail, red de distribución de combustible, salud y telecomunicaciones en Uruguay y otros 2 países de Latinoamérica.

5.1 Procedimiento

Paso 1. Descomposición del proyecto y creación del WBS. Se desglosa el proyecto hasta el nivel de componentes con un riesgo uniforme. Por ejemplo, un WBS de TIC típico puede ser desglosado en los siguientes componentes:

- CO1. Relevamiento,
- CO2. Análisis y Diseño,
- CO3..CO_n. Construcción. Aquí es donde en proyectos de TIC usualmente se dedica la mayor cantidad de tiempo, por lo que resulta conveniente subdividirlo en varios componentes ya que el riesgo suele ser distinto para cada uno de ellos.
- CO_n+1. *Testing*, Liberación y Capacitación,
- CO_n+2. Gestión del proyecto.

Paso 2. Priorización. A continuación se aplicó el método AHP, realizando la comparación de los riesgos relativos de cada componente en relación a los restantes, el resultado son los componentes ordenados en orden creciente de importancia.

Paso 3. Clasificación. Para la clasificación se aplicó juicio de expertos (expertos del negocio en conjunto con líderes técnicos senior), dividiendo los componentes en tres conjuntos: RB, RM y RA.

Paso 4. Estimación. Luego se pasó a considerar la aplicación del método propiamente, teniendo en cuenta las cotas de riesgo de la tabla 3 y (13) y (14).

5.2 Proyecto 1 (P1)

El proyecto supuso el cambio del frente de cajas de

atención al público por un nuevo sistema para una empresa de telecomunicaciones de un país de Latinoamérica. El mismo tuvo una duración de 1,5 años y el equipo de trabajo fueron 6 personas.

Presentaremos los resultados de este primer proyecto con algo de mayor detalle a efectos de ilustrar el método, para los restantes solo se presentarán los resultados más relevantes. Los CO del proyecto fueron los siguientes:

- Relevamiento: 152 horas.
- Análisis y Diseño: 1.520 horas.
- Construcción: 3.207 horas.
- Testing: 950 horas.
- Liberación y Capacitación: 114 horas.
- Gestión: 553 horas.
- Total del Proyecto: 5.943 horas.

Luego se aplicó el método AHP (priorización) y juicio de expertos (clasificación) y se obtuvo lo siguiente:

• App. Configuración (Const.)	Pr. 3 %;	RB
• Liberación y Capacitación.	Pr. 5 %;	RB
• App. Cuadre (Constr.)	Pr. 5 %;	RB
• App. Punto de Vta. (Const.)	Pr. 7 %;	RM
• Gestión del Proyecto.	Pr. 9 %;	RM
• Testing.	Pr. 15 %;	RM
• App. Switch. (Constr.)	Pr. 17 %;	RA
• Análisis y Diseño.	Pr. 20 %;	RA
• Relevamiento.	Pr. 20 %;	RA

Luego se procedió a sumar las horas de cada componente agrupados según el tipo de riesgo y se obtuvo el total de horas de cada uno.

Para determinar la duración y el desvío se emplean los valores de la tabla 3, y se procedió a aplicar (13) y (14). Ilustremos el método detallando el cálculo para los RB, considerando $\theta=1$:

$$E_{RB}(x) = \left(\frac{\theta(O+4M+P)+3(1-\theta)(O+P)}{6} \right) \times \sum_{i=1}^{cant\ RB} t(CO_i).$$

$$Var_{RB}(x) = \left(\frac{(P-O)^2(3-2\theta^2)}{36} \right) \times \sum_{i=1}^{cant\ RB} t(CO_i).$$

La suma de los componentes de RB (en color verde) totalizó 1.470 horas.

Sustituyendo por los valores obtenidos:

$$E_{RB}(x) = \left(\frac{(0,8+4,1,03+1,25)+3(1-1)(0,8+1,25)}{6} \right) \times 1470 = 1.507$$

$$\text{Var}_{RB}(x) = \left(\frac{(1,25-0,8)^2(3-2,1^2)}{36} \right) \times 1470 = 1.507$$

El resumen, para el proyecto completo los valores calculados según el método MTVM fueron:

- Media: 6.471 horas.
- Varianza: 137 horas.
- Desvío estándar: 12 horas.

Como contraparte el valor de duración real recabado del proyecto fue de 6.716 horas.

Analizando la precisión obtenida que resulta de la comparación del método MTVM y los valores reales resulta un valor de MRE=4 %, lo cual es una precisión muy buena y muy inferior al 25 % requerido para una precisión aceptable.

5.3 Restantes Proyectos (P2, P3 y P4)

Se resumen a continuación los resultados de los restantes proyectos.

Proyecto 2

Los valores resultantes de la aplicación del método MTVM fueron:

- Media: 4.312 horas.
- Varianza: 21 horas.
- Desvío estándar: 5 horas.

Las horas reales del proyecto fueron 4.814.

La precisión en este caso fue de MRE= 10 %, lo cual también representa una muy buena precisión.

Proyecto 3

Las horas estimadas por componente/tipo de riesgo para este proyecto fueron:

- Media: 363 días.
- Varianza: 15 días.
- Desvío estándar: 4 días.

La duración real del proyecto fue de 532 días.

En este caso el MRE= 32 %, no logrando cumplir con la cota aceptable. Esto se atribuye a que la estimación inicial, base, fue altamente imprecisa (el grupo de estimadores era básicamente poco experiente), por lo cual es razonable que el método (y ciertamente cualquier otro) no arroje resultados de una precisión aceptable.

Proyecto 4

Los valores estimados por el método MTVM fueron:

- Media: 14.074 horas.
- Varianza: 535 horas.
- Desvío estándar: 23 horas.

Las horas reales que insumió el proyecto fueron 17.871.

La precisión en este caso fue de MRE= 21 %, el cual es menor al umbral del 25 %.

6. Conclusiones

Se resumen a continuación los principales hallazgos y posibles tópicos de investigación futura.

6.1 Hallazgos

Se expuso un nuevo método denominado Método por Tres Valores Mejorado, el cual se basa en el Método por Tres Valores y propone un refinamiento del mismo incorporando el factor de incertidumbre, cuantificado mediante la distribución de probabilidad Beta-Rectangular, que usa como parámetros los valores heurísticos del cono de incertidumbre. Se buscó desarrollar un procedimiento que fuera tuviera precisión mejor a la del MTV.

La validación teórica contra el método Monte Carlo arrojó excelentes resultados, con valores de media muy cercanos y desvíos estándar razonables como lo indica la tabla 5.

En cuanto a la validación empírica, aunque se contaba con una cantidad acotada de proyectos, tres arrojaron resultados que verificaron que $MRE \leq 25\%$, por lo cual su precisión fue buena, no obstante el tercer proyecto presentó valores que superaron esta cota, producto de una mala estimación inicial. Este proyecto evidencia que si la estimación básica inicial es imprecisa y no se siguen técnicas de gestión de requerimientos y planificación rigurosos la estimación resultante es esperable que no sea buena, independientemente de la técnica de estimación usada.

Asimismo se entiende que el método es apropiado para proyectos medio, medio-grandes, en función que el

método de priorización emplea la técnica AHP y ésta es recomendada cuando la cantidad de ítems a comparar no supera a los 20. Considerando que es un método que se aplica en etapas tempranas es razonable que la cantidad de componentes no supere este valor para los proyectos del porte mencionados.

Por otra parte, si bien el trabajo se enfoca en proyectos de TIC, se entiende que el método es lo bastante genérico para aplicarlo en otros campos del conocimiento, tales como construcción, seguridad de la información, etc.

6.2 Trabajos futuros

En primer lugar se debe ampliar la base de proyectos reales para validar el método con una muestra más grande.

Por otra parte, se advierte que el método es altamente sensible al proceso de priorización (por eso se optó por usar un modelo riguroso como es AHP) y a la clasificación de los riesgos. Este último punto debe realizarse de forma meticulosa y exhaustiva, con un dominio importante del tema, dado que la ubicación de un componente en una categoría de riesgos incorrecta puede alterar la estimación. Una estimación cualitativa, basada en el juicio de expertos, tales como el GP, equipo de trabajo y/o estimadores, admite desvíos cognitivos que pueden afectar el resultado, especialmente si la priorización resulta en valores muy concentrados. Queda entonces por delante investigar técnicas cuantitativas que permitan una clasificación más objetiva y rigurosa.

7. Agradecimiento

Agradezco a la Dra. Nuvia Martez por su asistencia técnica y minuciosa corrección.

Agradezco también al Dr. Thomas Schwarz por su guía y generosa disposición de tiempo y conocimientos.

8. Referencias

- [1] Standish Group International. "The CHAOS Manifiesto" [en línea]. 2013. <https://larlet.fr/static/david/stream/ChaosManifiesto2013.pdf> [Consulta: 06 de mayo de 2014].
- [2] IBM Corporation. "Making Change Work" [en línea]. 2008. <http://www-935.ibm.com/services/us/gbs/bus/html/gbs-making-change-work.html> [Consulta: 12 de octubre de 2015].
- [3] Project Management Institute, Guía de los Fundamentos para la Dirección de Proyectos (Guía del PMBOK), 5ta. Edición. Newton Square, Pennsylvania: Project Management Institute Inc., 2013.
- [4] Rad, P., Anantamula, V., Project Planning Techniques, 1st. Edition. Vienna: Management Concepts, 2005.
- [5] Jørgensen, M., "Realism in assessment of effort estimation uncertainty: It matters how you ask". IEEE Transactions Software Engineering. vol. 30, pp. 209–217, 2004.
- [6] Jørgensen, M., Sheppard, M., "A systematic review of software development cost estimation studies" [en línea]. January 2007. <http://simula.no/research/se/publications/Jorgensen.2007.1> [Consulta: 30 setiembre 2014].
- [7] Leung, H., Fanz Z., Software Cost Estimation. Handbook of software engineering and knowledge engineering. World scientific publications company, River Edge: NJ. 2002.
- [8] Khatibi, V., Jawawi, D., "Software Cost Estimation Methods: A Review". Journal of Emerging Trends in Computing and Information Science., vol. 2 no.1, pp. 21-29, 2010-11.
- [9] Malcom, D.G., Roseboom, C.E., Clark, C.E. y Fazar, W. "Application of a technique for research and development program evaluation", Operations Research, no. 7, pp. 646- 649, 1959.
- [10] Hadju, M., Mályusz, L., "Modeling spatial and temporal relationships in network techniques". Procedia Engineering, vol.85, pp. 193-205, 2014.
- [11] Van Slyke, R.M., "Monte Carlo methods and the PERT problem". Operational. Research, vol. 11, pp. 839-860, 1963.
- [12] Besner, C., Hobbes, B., "The Reality of Project Management Practice: Phase two of an ongoing study". University of Quebec at Montreal, 2007 [en línea]. <http://www.pmi.org/~media/PDF/Surveys/Besner%20and%20Hobbs%20Practices%20Survey%20Report%20Phase%202.ashx> [Consulta: 19 de mayo 2015].
- [13] Whelan, B. "An Analysis of Influences on Estimating Practice in Software Projects" [en línea]. 2010. <http://www.pmi.org/~media/PDF/Surveys/BWhelan%20-%20MSc%20PM%20Thesis%20Excerpt.ashx> [Consulta: 19 de mayo de 2015].
- [14] Leemis, L., Park, S., Discrete Event-Simulation: A First Course. Prentice-Hall, 2006.
- [15] Nakayama, M., "Statistical analysis of simulation output". Proceedings of the 2008 Winter Simulation Conference. [en línea], <http://www.informs-sim.org/wsc08papers/009.pdf> [Consulta: 20 de mayo 2015].
- [16] Cooper, D.F., MacDonald, D.H. y Chapman, C.B., "Risk analysis of a construction cost estimate", International Journal of Project Management, Vol. 3, No.3, pp. 141-9, 1985
- [17] Saaty, T. The Analytic Hierarchy Process. New York: McGraw-Hill, 1980.
- [18] Duan C., Laurent, P., Clealand-Huang, J., "Towards automated

- requirement prioritization and triage”, *Requir. Eng.* Vol. 14, No. 2, pp. 73-89. 2009.
- [19] Babar, M., Ramzan, M., Ghayyur, S., “Challenge and future trends in software requirements prioritization”, *Computer Networks and Information Technology (ICCNIT)*, 2011 International Conference on, IEEE, pp. 319-324.
- [20] Karlsson, J., Ryan, K., A cost-value approach for prioritizing requirements, *IEEE Softw.* Vol. 14, pp- 67-74, 1997
- [21] Boehm, B. *Software Engineering Economics*. New Jersey: Prentice Hall PTR, 1981.
- [22] McConnell, S., *Software Estimation: Demystifying the Black Art*, 1st.edition. Redmond: Microsoft Press, 2006.
- [23] Bossavit, L., *The Leprechauns of Software Engineer*. Leanpub, 2013.
- [24] Little, T., “Schedule Estimation and Uncertainty Surrounding the Cone of Uncertainty”, *IEEE Software*, 2006.
- [25] Eveleens, J.L., Verhoef, C., “Quantifying IT forecasting quality”, *Science of Computer Programming*, vol. 74, pp. 934-988, 2009.
- [26] Goodpasture, J., *Quantitative Methods in Project Management*. J. Ross Publishing, 2006.
- [27] Hulett, D., *Practical Schedule Risk Analysis*. Gower Publishing Ltd, 2009.
- [28] Vose, D. *Risk Analysis: A Quantitative Analysis*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. 2000.
- [29] Hahn, E.D., “Mixture densities for project management activity times: A robust approach to PERT”. *European Journal of Operational Research*, vol. 188, pp. 450-459, 2008.
- [30] Conte, S., Dunsmore, H., Shen V., *Software Engineering metrics and models*. Menlo Park: Benjamin/Cummings Publishing, 1986.

Lipid oxidation of Dutch style semi-dry fermented sausages prepared with beef and ostrich meat enriched with encapsulated linseed, algal and fish oils

Oxidación lipídica de embutidos fermentados semisecos estilo holandés preparados con carnes de res y avestruz enriquecidos con aceites encapsulados de linaza, algas y pescado

Kathia Broce¹, Jozef Linssen²

¹ CIHH, Universidad Tecnológica de Panamá, ² Department of Product Design and Quality Management, Wageningen University
¹ kathia.broce@utp.ac.pa, ² Jozef.Linssen@wur.nl

Resumen— Las salchichas fermentadas semi secas tipo holandesas fueron preparadas con aceites encapsulados de linaza, alga, y pescado, como sustitutos de la grasa dorsal del cerdo, y para aumentar los niveles de ácidos grasos poliinsaturados (especialmente los omega 3 o n-3). Las carnes de res y avestruz fueron utilizadas como ingrediente cárnico. La oxidación lipídica fue estudiada hasta los 60 días de almacenamiento del producto a 7 °C en una atmósfera modificada con un contenido de 63 % de oxígeno. El valor de peróxido (PV), las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y el hexanal fueron medidos como marcadores de oxidación y deterioro del producto. La evaluación sensorial fue llevada a cabo al final de los 60 días de almacenamiento por un panel entrenado de 11 miembros. El valor de peróxido disminuyó a los 60 días de almacenamiento bajo estas condiciones, debido a la inestabilidad de los peróxidos, generando productos secundarios de la oxidación, lo cual resultó en el incremento de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico y hexanal. La evaluación sensorial estuvo acorde con los valores obtenidos en los análisis de oxidación, encontrándose puntuaciones bajas en la aceptación de la mayoría de los productos después de los 60 días de almacenamiento, como resultado de la aparición de olor a pescado originado por la oxidación de los ácidos grasos n-3. La incorporación de carne de avestruz contribuyó a disminuir el contenido de grasa total y la adición de aceites con ácidos grasos n-3 incrementó el contenido de ácidos grasos poliinsaturados en el producto, haciendo disminuir a la vez, el contenido de ácidos grasos saturados. Sin embargo, este incremento en los ácidos grasos poliinsaturados y el tipo de carne empleada en la elaboración de salchichas fermentadas tipo holandesas afectó negativamente la preservación del producto durante el almacenamiento debido a la susceptibilidad de estos a las reacciones de oxidación causando deterioro y pérdida de calidad del producto.

Palabras claves— Aceites encapsulados, ácidos grasos n-3, análisis sensorial, hexanal, oxidación lipídica, TBARS, valor de peróxido.

Abstract— Dutch style fermented semi-dry sausages were prepared using encapsulated linseed, algal and fish oil, as pork backfat replacers to increase the levels of Polyunsaturated Fatty Acids (especially n-3). Beef and ostrich meat were used as the meat ingredients. Lipid oxidation was studied until 60 days of storage at 7 °C in a modified atmosphere containing 63 % of oxygen. Peroxide Value, Thiobarbituric Acid Reactive Substances and Hexanal were measured as markers of oxidation and deterioration of the product. Sensory evaluation was carried out at the end of 60 days of storage. PV decreased after 60 days of storage under these conditions, due to the instability of peroxides, generating secondary lipid oxidation products, which resulted in an increase of Thiobarbituric Acid Reactive Substances and Hexanal. Sensory evaluation was performed by a trained panel of 11 members, in accordance with values obtained in the lipid oxidation analyses, being low scores of acceptance in most of the products after 60 days of storage due to the presence of fishy smell originated from the oxidation of n-3 fatty acids. The incorporation of ostrich meat decreased to the total fat content and the addition of oils with n-3 fatty acids to these products increased PUFAs and decreased saturated fatty acid. However, this increase in PUFAs and the type of meat using in the elaboration of Dutch style semi-dry fermented sausages adversely affected the preservation of the product during storage due to the susceptibility of PUFAs to the lipid oxidation reactions causing deterioration and quality loss.

Keywords— Encapsulated oils, hexanal, n-3 fatty acids, lipid oxidation, peroxide value, TBARS, sensory analyses.

Tipo de artículo: Original

Fecha de recepción: 20 de marzo de 2015

Fecha de aceptación: 30 de octubre de 2015

1. Introduction

The development of food that supports beneficial health effects including reduction of risks on diseases like cancer, cardiovascular diseases and obesity, is rapidly growing. A significant diet related

risk factor for all these diseases is the amount and composition of fat intake. The present consumption of meat and meat products contributes substantially to the daily fat intake; however, sometimes it is not nutritionally optimal. Because of the composition of much animal fat, increased consumption of them has been associated with an increase in dietary ratio of n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids and increased chronic disease [1].

As meat products are some of the most important sources of dietary fat, modification of the lipid profile of such products, by enhancing n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), by addition of oils such as linseed oil, fish oil, and other oils alter product fatty acid profiles producing “healthier” meat products, for example semi-dry fermented sausages [2], can help to improve the nutritional quality of the occidental diet [3]. To improve the health status of the population is recommended to regulate the consumption of food rich in n-3 PUFAs, in such a way that a n-6/n-3 PUFA ratio of less than 4 can be achieved and that the ratio of polyunsaturated and saturated fatty acids (P/S ratio) is higher than 0.4 [4].

The importance of PUFAs, especially the long chain n-3 PUFAs, such as eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), is due to their biological function in human health and protective effect against some common cancers such as breast and colon cancer, rheumatoid arthritis and inflammatory bowel diseases [5], they are also implied in inflammatory processes and regulation of immune system [6]. Natural sources of long chain n-3 PUFAs are fish oils, marine protists, dinoflagellates and microalgae [7].

Modification of the ingredients used for the elaboration of semi-dry fermented sausages has been tested previously [8]. However, total or partial replacement of animal fat in meat product by vegetable oils, or different sources, as encapsulated linseed oil, algal and fish oils, having increased PUFA contents, may contribute to a higher susceptibility to lipid oxidation, the primary process by which sensory quality declines in muscle foods [9]. The changes in lipids during processing and storage, such as lipolysis and lipid oxidation, have a major impact, both desirable and deleterious for the final product quality of meat products [10].

In semi-dry fermented sausages, being relatively high fat foodstuffs, lipid oxidation can negative influence their sensorial properties, by generation of degradation compounds such as n-alkenals and dienals, which are associated to rancid taste and odour. Oxidation can also affect the nutritional value of food by decomposition of vitamins, unsaturated essential fatty acids or can even give rise to toxic compounds [3].

The research as described in this paper is aimed to develop meat products based on a lower fat content and a better fatty acid profile by adding oils (encapsulated

linseed, algal and fish oils) rich in essential fatty acid, especially n-3 fatty acids, and to study the effects of altered fat composition on lipid oxidation and sensory quality of the products.

2. Materials and methods

2.1 Sausage Preparation

Dutch style fermented sausages were manufactured at Wageningen University (The Netherlands). Lean beef, ostrich meat, pork backfat, encapsulated linseed, algal and fish oils were used as raw materials. The lean beef was from Ireland (Kepak Chuck Group, Ireland), the ostrich meat was from Namibia (Ostrich Production Namibia, LTD), and the encapsulated flaxseed oil (VANA-SANA ALA 30 ES), encapsulated algal oil (DHA KSF35) and encapsulated fish oil (VANA-SANA EPA/DHA 10/8 ES) were kindly provided by Kievit (Meppel, The Netherlands).

Table 1 shows the fatty acid profiles of the meats, pork back fat, and encapsulated oils, used in the different formulations.

Ten (10) formulations of fermented sausages of about 1.5 kg each were prepared. Four controls, traditional and low fat versions (two prepared with beef meat, sample codes C1 and C2 and two prepared with ostrich meat, sample codes S7 and S8, were produced using 30 % and 10 % pork backfat, respectively). C1 and S8 contain 30 % pork backfat and C2 and S7 contain 10 % pork backfat. Six formulations were produced with 10 % of added fat, in which pork backfat was replaced by 300 g encapsulated flaxseed, algal and fish oil, all containing 50 % of oil. Three samples were prepared with ostrich meat (S1, S2, and S3) and three samples were prepared with beef meat (S4, S5, and S6). The amount of the other ingredients in all formulations, expressed per 1.5 kg of meat mixture were: nitrite curing salt, 37.50 g; starter sausage (*Lactobacillus curvatis*), 15 g; glucose, 10.50 g; glutamate, 3 g; white pepper, 1.80 g; paprika powder, 1.50 g; crushed pepper, 1.50 g; ascorbic acid, 0.75 g; mace, 0.38 g; clove, 0.24 g; and garlic powder, 0.23 g.

The frozen meat (beef or ostrich) and pork backfat were cut, and the meat was chopped for 30 s in a FA-20 cutter (Stephan Nederland B.V., Almelo, The Netherlands) at low speed and 30 s at high speed and mixed with all other ingredients, except nitrite curing salt. The pork backfat was added and the meat mixture was chopped for 1 min at high

Table 1. Fatty acid profile of different meats and encapsulated oils (%)

Fatty acid	Meats			Encapsulated oils		
	Beef ¹	Ostrich ²	Pork-back fat ³	ALA 30 ES ⁴	DHA KSF35 ⁴	EPA/DHA 10/8 ES ⁴
C14:0	2.90	3.6	----	----	10.1	5.2
C16:0	23.90	22.2	22.1	5.0	23.2	12.4
C16:1	2.33	6.4	1.75	----	2.1	4.7
C18:0	19.54	9.9	10.8	3.8	0.8	3.5
C18:1	35.30	34.3	39.1	18.9	2.8	6.0
C18:2	1.78	16.2	19.3	17.1	0.7	3.5
C18:3	0.63	2.4	1.34	54.1	----	0.9
C20:1	----	----	0.88	----	----	1.6
C20:4n6	0.08	----	----	----	0.6	1.4
C20:5n3	0.35	----	----	----	1.5	23.8
C22:5n3	0.25	4.5	----	----	13.6	----
C22:6n3	0.03	----	----	----	35.6	18.4
Others	11.25	----	----	1.1	9.0	18.6
Σ SFA	53.21	36.8	34.9	8.8	34.1	21.1
Σ MUFA	41.99	40.7	42.8	18.9	4.9	12.3
Σ PUFA	4.81	23.1	22.3	71.2	52.0	48.0
P/S	0.09	0.6	0.63	8.1	1.5	2.3
n-6/n-3	1.55	2.3	12.63	0.3	0.4	0.1

Source: ¹ Realini et al., 2005. ² Broce, 2003. ³ Prieto et al., 2014. ⁴ Kievit (Meppel, The Netherlands).

speed. The obtained meat dough, encapsulated oils and nitrite curing salt were mixed in an N-506 Hobart mixer (Hobart MFG. Co., Troy, USA) at low speed for 1 min. After mixing, the meat dough was transferred into a plastic vacuum bag and air was removed with an Alvac-1-90 vacuum apparatus (Stephan Nederland B.V., Almelo, The Netherlands) and stuffed into 52 mm diameter cellulose based casings using a Dick, model TWF-12, stuffer (Friedr. DICK GmbH & Co. KG, Deizisau, Germany). The sausages were fermented for three days at 25 °C and dried at 15 °C and 65-80 % relative humidity for 12 days at Meester-Stegeman B.V. in Deventer (The Netherlands). To accelerate the rate of oxidation the sausages were cut in slices with a thickness of 6 mm and stored in the dark at 7 °C in modified atmosphere containing 63 % O₂, 22 % CO₂ and 15 % N₂. The packaging of the slices was carried out at PROMESSA in Deventer (The Netherlands), in polypropylene packages.

2.2 Chemical Analyses

2.2.1 Moisture

The moisture was determined in duplicate according to the official method for meat products [11].

2.2.2 Fat content

The total fat was quantified in duplicate according to the International Standard Meat and Meat Products [12].

2.2.3 Protein content

Protein was analyzed in duplicate with a NA 2100 Protein analyzer (CE Instruments, Milan, Italy) according to the Dumas Method described by Pelsler et al. [8].

2.2.4 Fatty acid profiles

Fatty acids profiles were determined by gas chromatography. The fatty acid composition of the lipid fractions was determined in duplicate by preparing fatty acids methyl esters, as described by the International Organization for Standardization International Standards (1978).

Chromatographic conditions: GC-FID, HRGC 5300 (CE Instruments, Milan, Italy), equipped with a cold on-column injector and fitted with a capillary column 30 m x 0.53 mm ZB-wax; film thickness 0.50 µm (Phenomenex, Torrance, USA). The temperature of the detector was 270 °C, the oven temperature was programmed to increase from 80 to 160 °C with a rate of 15 °C min⁻¹ followed by a rate of 7.5 °C min⁻¹ from 160 to 240 °C and a final hold for 14 min. The carrier gas was helium at 60 kPa and the injection volume was 1 µl [8].

Standard used for identification was Supelco 47085-U, PUFA No. 3 (from Menhaden Oil), Sigma-Aldrich, Germany.

Fatty acid methyl esters were identified comparing retention time with standards and expressed as area % with respect to the total fatty acids.

2.2.5 Lipid Oxidation Analyses

2.2.5.1 Micro determination of Peroxide Values (PV)

Micro determination of Peroxide values was determined in duplicate as described by Asakawa and Matsushita [14] using a CARY 50 BIO UV-Visible spectrophotometer (Varian Analytical Instruments, Middelburg, The Netherlands) and reading at 560 nm.

2.2.6 Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

Thiobarbituric acid reactive substances were determined in duplicate, as described by Alasnier et al. [15]. Analyses were carried out reading the samples at 535 nm in a CARY 50 BIO UV-Visible spectrophotometer (Varian Analytical Instruments, Middelburg, The Netherlands). TBARS were expressed as μg equivalent of malonaldehyde per kg of sample, using tetraethoxypropane as standard. A calibration curve was prepared.

2.2.7 Hexanal

The hexanal content was determined by a GC static headspace method according to Shahidi and Pegg [16]. 1.0 g of sample was transferred into 10 ml glass headspace vial. For the GC separation, an 8000 top GC (CE Instruments, Milan, Italy) with a capillary column Supelcowax (30 m x 0.54 mm; film thickness 1.0 μm , Supelco, Bellefonte, USA) and flame ionization detection (250 $^{\circ}\text{C}$) was used. The oven temperature was raised linearly (7.5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$) from 60 to 80 $^{\circ}\text{C}$ and the final hold was 150 $^{\circ}\text{C}$. Helium was used as a carrier gas with a pressure of 30 kPa and the injection volume was 1500 μl [8]. Analyses were done in duplicate.

2.3 Physical analyses

2.3.1 pH

pH measurements were carried out with a PHM82 Standard pH meter (Radiometer, Copenhagen, Denmark) on 10 g of sample homogenized with an Ultraturrax T 25 basic) (IKA-Werke, Staufen, Germany) with 10 ml of distilled water for 45 s.

2.3.2 Firmness

Firmness of the samples was measured using a texture analyzer (TA-XT2i/25, Stable Micro Systems, Etten-Leur, The Netherlands). Slices of sausages (6 mm thickness) were compressed in the central part to 50 % of their original height with a compression plate 30 mm in diameter at a speed of 5 mm/s. Compression force was taken as the maximum recorded force on the output expressed as Newton (N). The measurements were performed at room temperature [8]. For each formulation 4 determinations were carried out.

2.3.3 Color

Color measurements of the surface were obtained using a DRLANGE Tricolor LFM3 instrument (Dr Bruno

Lange GmbH, Berlin, Germany). Results were expressed as L^* (brightness), a^* (redness) and b^* (yellowness). For each formulation 4 determinations were carried out.

2.4 Sensory analyses

The sausages were sensory evaluated by an eleventh member trained sensory panel 60 days after production. Assessors were served with half a slice of sausage from each treatment with a thickness of 6 mm. The following attributes were tested: color intensity (redness), firmness (compression between thumb and index finger), and quality of texture (approximate texture in comparison to commercial sausages), smell intensity, quality of smell (approximate smell in comparison to commercial sausages), fishy smell, spicy smell and oiliness. A 5 point structured scale (1: minimum value, 5: maximum value) was used. The assessors also hedonically tested the sausages (11 sausages in total, including the commercial brand) and each one was ranged in the order of preferences (1: preferred, 11: not preferred).

3. Statistical analyses

A One-Way anova and Post Hoc test (Tukey) were performed to determine significant differences ($p < 0.05$) among the different types of sausages. The software used was SPSS version 15.0 (© 2006, SPSS inc., Chicago, Illinois).

4. Results and discussion

Table 2 shows the gross composition of the products (moisture, fat and protein content, and pH).

Control sausages C1 and S8 prepared with 30 % of pork backfat show the highest fat content in comparison to other formulations and these are consistent with the reported values from other authors for similar products [8, 17, 18]. The sausages in the present study prepared with 10 % fat can be considered as reduced fat according to the regulation (EC) N.º 1924 (2006) on nutrition and health claims made on foods (the reduced fat claim may only be made where the fat content reduction is at least 30 %) [19]. In the case of reduced fat fermented sausages, statistical differences ($p < 0.05$) were found in moisture and fat content between sausages prepared with beef (S4, S5, S6) and ostrich meat (S1, S2, S3). However, sausages prepared with beef meat showed higher differences in total fat content in comparison to the sausages with ostrich meat. Differences were found in protein content between sausages and the pH values for these

products ranged 4.8 and 4.9. Mora-Gallego, Serra, Guàrdia and Arnau [19] found that the pH is significantly affected by the fat type level in reduced fat fuets, nonetheless, for Dutch style fermented sausages apparently this was not the case.

Table 2. Moisture, fat and protein contents (%) and pH values of different sausages

Samples	Physicochemical analyses			
	Moisture (%)	Fat (%)	Protein (%)	pH
C1	33.5 ^a	41.3 ^g	19.2 ^a	4.75 ^a
C2	42.2 ^c	22.7 ^d	24.8 ^{a,b,c}	4.78 ^{a,b}
S1	43.0 ^{c,d}	15.4 ^b	25.6 ^{b,c}	4.90 ^{d,e}
S2	38.3 ^b	10.4 ^{d,e}	23.5 ^{a,b}	4.95 ^e
S3	42.7 ^{c,d}	14.6 ^b	25.0 ^{b,c}	4.91 ^{d,e}
S4	38.7 ^b	24.9 ^e	21.2 ^{a,b}	4.85 ^{c,d}
S5	43.7 ^d	19.7 ^a	25.1 ^{b,c}	4.92 ^{d,e}
S6	38.0 ^b	23.9 ^c	22.0 ^{a,b}	4.87 ^{c,d}
S7	47.4 ^e	13.9 ^b	29.6 ^c	4.82 ^{b,c}
S8	37.8 ^b	33.6 ^f	21.6 ^{a,b}	4.84 ^{c,d}

See sausage preparation. ^{a-g} Means in the same column with different superscripts differ significantly ($p < 0.05$).

The fatty acid profiles of the semi-dry fermented sausages are presented in table 3.

Table 3. Fatty acid profile of different dry fermented sausages

Fatty acid	Dry fermented sausages									
	C1	C2	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
C14:0	2.3 ^c	2.2 ^c	-----	5.9 ^e	6.6 ^g	1.4 ^b	5.9 ^e	4.3 ^d	1.3 ^b	1.5 ^b
C16:0	22.3 ^a	22.2 ^a	8.1 ^b	27.5 ^f	17.8 ^b	15.4 ^d	27.5 ^f	20.6 ^a	23.4 ^a	23.1 ^a
C16:1	2.6 ^c	2.3 ^c	-----	3.2 ^d	7.5 ^e	1.7 ^b	3.2 ^d	4.6 ^e	2.8 ^b	2.5 ^b
C18:0	12.4 ^a	12.2 ^a	5.2 ^b	12.3 ^a	6.0 ^c	11.4 ^d	12.0 ^a	19.2 ^a	12.4 ^a	12.1 ^a
C18:1	38.5 ^e	38.3 ^c	22.0 ^d	27.5 ^e	16.0 ^b	29.9 ^f	27.4 ^e	4.3 ^d	42.1 ^a	42.5 ^a
C18:2	11.1 ^d	11.6 ^d	17.6 ^d	26.4 ^d	4.7 ^c	10.9 ^d	2.7 ^c	25.6 ^b	16.0 ^d	15.6 ^d
C18:3	1.3 ^b	1.7 ^b	46.3 ^a	2.5 ^c	-----	28.6 ^d	1.4 ^b	2.9 ^e	1.4 ^b	1.3 ^b
C20:4n6	-----	-----	-----	1.3 ^b	2.2 ^b	-----	-----	2.1 ^b	1.1 ^a	0.6 ^a
C20:5n3	-----	-----	-----	-----	17.3 ^b	-----	-----	1.6 ^c	-----	-----
C22:5n3	-----	-----	-----	-----	2.5 ^b	-----	5.8 ^b	1.6 ^c	-----	-----
C22:6n3	-----	-----	-----	0.55 ^b	12.5 ^a	-----	14.2 ^a	10.6 ^a	-----	-----
Others	9.5 ^a	9.5 ^a	0.8 ^b	-----	6.9 ^e	0.7 ^b	-----	2.6 ^d	-----	0.8 ^b
Σ SFA	37.0 ^c	36.6 ^c	13.3 ^b	45.7 ^a	30.4 ^d	28.2 ^d	45.4 ^a	44.1 ^a	37.1 ^a	36.7 ^c
Σ MUFA	41.1 ^b	40.6 ^b	22.0 ^c	30.7 ^d	23.5 ^e	31.6 ^d	30.6 ^d	8.9 ^e	44.9 ^a	45.0 ^a
Σ PUFA	12.4 ^b	13.3 ^b	63.9 ^a	23.6 ^d	39.2 ^c	39.5 ^c	24.1 ^d	44.4 ^a	18.5 ^b	17.5 ^b
P/S	0.3 ^a	0.4 ^{b,c}	4.8 ^a	0.5 ^c	1.3 ^c	1.4 ^c	0.5 ^c	1.0 ^d	0.5 ^c	0.5 ^c
n-6/n-3	8.5 ^d	6.8 ^c	0.4 ^b	1.2 ^c	0.2 ^b	0.4 ^b	0.1 ^b	1.7 ^c	12.2 ^a	12.5 ^a

^{a-c} Means in the same row with different superscripts differ significantly ($p < 0.05$).

Differences were found in the control samples prepared with beef and ostrich meat (C1, C2, S7 and S8). All these sausages presented the highest content of C18:1 due to the presence of pork backfat in their formulations, since pork fat is rich in this specific fatty acid. Sausages prepared with ostrich meat presented higher values in C18:2 than those prepared with beef. Sausages S1 and S4 prepared with encapsulated linseed oil showed the highest content of linolenic acid. A main contribution of long chain fatty acids to the products is given by using fish oil and algal oil in the formulation. Sausages S2, S3, S5 and S6 present high amounts of DHA in comparison with the controls and linseed oil sausages. EPA was only found in the sausages S3 and S6 prepared with fish oil. Concerning to saturated fatty acids (SFA), highest contents were found in S2, S5 and S6 probably to the contribution of fat in meat and encapsulated oils used in the formulation of these sausages (see table 1). Enrichment of model products with encapsulated linseed, algal and fish oil increased considerably the amount of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in all of the low fat fermented sausages. According to Valencia et al. [20], the partial or total replacement of pork backfat resulted in improved nutritional properties with regard to conventional sausages by an increased PUFA/MUFA ratio. Differences in ratio P/S were found in the samples, but all the sausages, including the controls, are within the recommended range [4]. The modified products showed better n-6/n-3 ratios than the control products from a nutritional point of view, satisfying the current recommendation for this ratio (< 4).

Table 4 shows the results in firmness and color (CIE L* a* b* system) of sausages at the beginning and after 60 days of storage. The modified sausages showed highest values in comparison to both controls with 30 % of pork back fat. This fact could be due to the increase in the amount of protein used during the preparation as a strategy to decrease the total fat content of the final product to 10 %. During the period of storage, no significantly differences ($p > 0.05$) in firmness were observed in the formulations.

The controls, prepared with 30 % pork backfat, presented the lowest values of instrumental firmness.

Most of the sausages showed slightly lower values for Lightness (L*) than the controls prepared with beef and pork backfat at the beginning of measurements, with

exception of S3, which contained encapsulated fish oil, but these differences were not statistically significant. Valencia et al. [20] also found slightly lower values for lightness in fermented sausages. No significant differences were found in the sausages in the L^* value during storage. C1 results in the highest L^* value in comparison to the other formulations, probably due the content of pork backfat that contributes to a white color to the final product. In most of the cases redness (a^*) decreased with storage time. This result can be a signal of color deterioration and lipid oxidation of the products. Values found for yellowness (b^*) were consistent with Valencia et al. [20]. The higher values of b^* results in a lower perceived color intensity, and higher values in fish oil containing sausages led to a more saturated red color (higher Chroma). No significant differences were found in the sausages during storage.

Table 4. Firmness and color (CIE $L^* a^* b^*$ system) of sausages during storage

Samples	Firmness (N*)		Color					
			Lightness (L^*)		Redness (a^*)		Yellowness (b^*)	
	Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final
C1	72.8	92.8	44.6	53.4	4.7	1.5	10.7	13.5
C2	111.3	56.0	44.1	43.3	3.2	0.6	6.7	6.7
S1	137.8	65.3	39.5	46.0	6.3	5.6	9.8	20.0
S2	153.6	86.9	40.5	42.9	10.2	4.1	11.1	11.5
S3	117.6	103.6	47.2	43.7	4.9	10.1	16.7	20.1
S4	119.2	149.2	43.5	51.1	6.8	2.8	9.3	15.2
S5	123.8	134.8	37.9	40.5	5.1	3.9	10.4	12.2
S6	122.5	106.7	39.3	43.3	9.1	9.7	8.5	20.5
S7	129.8	84.3	39.3	38.8	3.3	1.4	7.6	7.5
S8	48.2	49.6	40.7	45.7	2.8	2.9	10.6	16.6

Figure 1 shows the peroxide values measured (meq active O_2 kg^{-1} sausage) of the different semi-dry fermented sausages at the start and after 60 days of storage at 7 °C in the dark and in 63 % O_2 atmosphere. Differences were found in all of the sausages at the beginning of the period of storage, highest values of peroxides (8.3 and 8.2 meq active O_2 kg^{-1} sausage) were found in the controls C1, C2 (30 % and 10 % pork back fat respectively), followed by control S8 (30 % pork back fat), showing a value of 5.1 meq active O_2 kg^{-1} sausage and S4 (10 % linseed oil), showing a value 3.7 meq active O_2 kg^{-1} sausage. These sausages presented a higher degree of primary oxidation in comparison to the other samples. This fact could be

due to autooxidation reactions occurring in the raw materials and the presences of prooxidant substances in the food system, which cause or accelerate lipid oxidation [21]. Beef meat is rich in myoglobin that as well is a photosensitizer and can absorb energy from light to form an excited singlet state of oxygen. Singlet oxygen is considered as a prooxidant that promotes the formation of lipid hydroperoxides by matching the spin direction of the electron in the double bond, reacting with an unsaturated fatty acid directly to form lipid hydroperoxides. The samples containing mainly pork backfat in their formulation (C1, C2, and S8) showed the highest values, in comparison to the modified ones (possibly the encapsulated oil forms were protected by the presence of antioxidants, but this fact was not reported in the information data supplied by the company). After storage of 60 days the PV's decreased in most of the cases except in S2 and S5 (in this cases a slight increase in PV was shown).

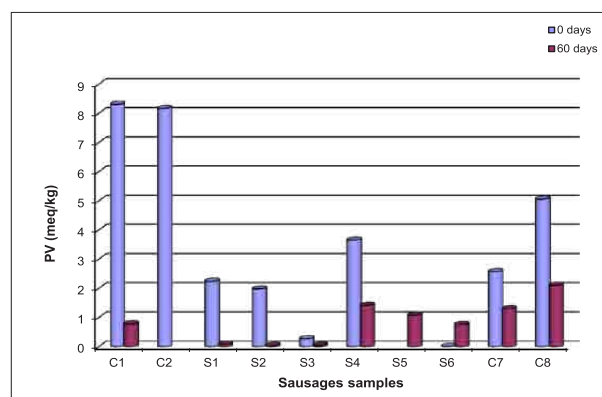


Figure 1. Peroxide value (meq active O_2/kg^{-1} sausage) of different dry fermented sausages during storage at 7 °C in the dark.

TBARS values (μg of malonaldehyde per kg of sausage), determining secondary lipid oxidation products, are presented in figure 2.

Figure 2 (section a) shows the results of TBARS obtained from sausages prepared with beef meat, pork back fat (control sausages C1 and C2, 30 and 10 % pork back fat respectively), and encapsulated oils (S4, S5, S6). An increase in TBARS numbers can be observed in all the sausages after storage of 60 days. At the beginning of storage period most of the sausages have lower TBARS values except C1 (control 30 % pork back fat) that showed the highest value in comparison to the modified ones and control S8 containing 30 % of pork back fat.

Nevertheless, these values are lower than 1 ppm (1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$), which is considered to be the limit to detect rancidity [22]. At the end of the storage period sausages S4 and S6 showed the highest values. This fact could be due to cause by the presence of polyunsaturated fatty acids in the formulation. Especially S6 (prepared with encapsulated fish oil) showed the highest TBARS due to its contents of C18:2, C18:3, C20:4n6, C20:5n3, C22:5n3, C22:6n3. The fact that the processes of mixing and stuffing are not

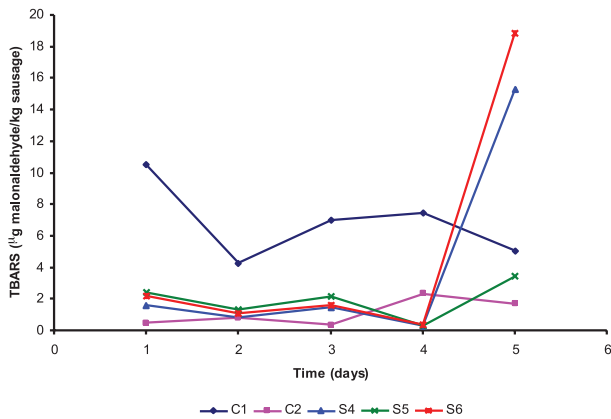


Figure 2a. TBARS values of different fermented sausages elaborated with beef meat during storage at 7 °C in the dark.

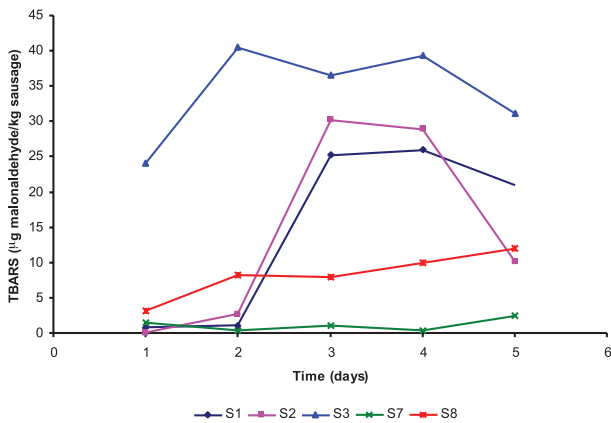


Figure 2b. TBARS values of different fermented sausages elaborated with ostrich meat during storage at 7 °C in the dark.

carried out under vacuum conditions, are decisive factors for the presence of oxygen in high concentration inside the sausage, which favors the development of autooxidation reactions generating a wide range of secondary oxidation products, as unsaturated aldehydes or malonaldehyde [22, 23]. An increase of TBARS during storage was also observed in the group of sausages prepared with ostrich

meat and different fats. At the beginning sausage S3 showed the highest value of TBARS in comparison to the other formulations. This behavior could be due to contribution of ostrich meat and encapsulated fish oil, rich in n-3 fatty acids and susceptible to lipid oxidation, especially C20:5n3 and C22:6n3. Sausages S1 and S3 show the highest TBARS value at 30 days of storage and a decrease at 60 days. Lee et al. [25] reported for ground turkey patties and fresh pork sausages enriched with n-3, that TBARS values increase significantly with storage when no antioxidants are present in the formulations. One of the reasons could be the presence of salts in these products, which plays a role as prooxidant accelerating oxidation in sausages. Samples S7 and S8 showed the lowest TBARS values. In general it could be observed that the sausages manufactured with ostrich meat showed higher TBARS values than those prepared with beef. This fact could be due to the more unsaturated fatty acid profile of ostrich meat.

Hexanal values of the semi-dry fermented sausages are shown in figure 3.

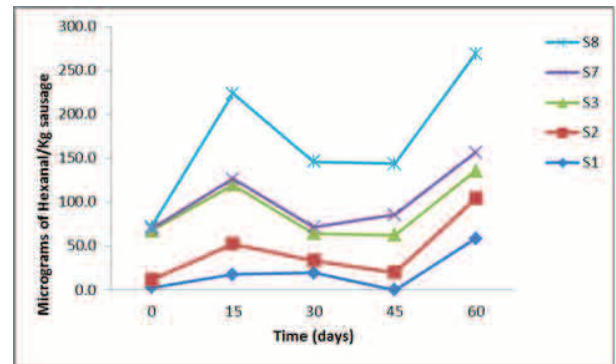


Figure 3a. Hexanal values of different fermented sausages elaborated with ostrich meat during storage at 7 °C in the dark.

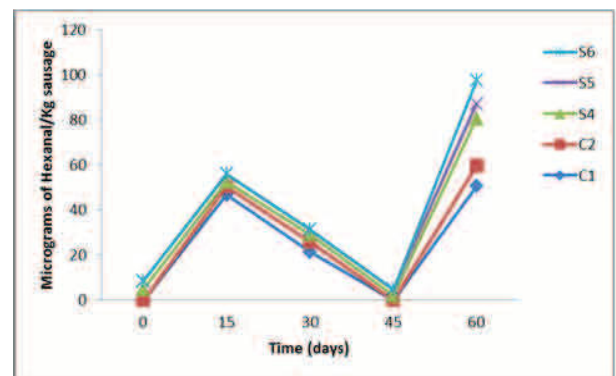


Figure 3b. Hexanal values of different fermented sausages elaborated with beef meat during storage at 7 °C in the dark.

Hexanal is often used as a marker for lipid oxidation in meats as a result of C18:2 n-6 oxidation [26]. At the beginning of the storage period most of the sausages prepared with ostrich meat, low hexanal values were found, with exception of S3 which showed the highest value at the starting point and decreased during storage. Sausages S8 and S1 underwent a similar behavior during storage, increasing their hexanal values reaching a maximum. According to Valencia et al. [23], hexanal increased during storage when emulsions with linseed oil were used to produce dry-cured meat sausages. The increase was dependent on the efficiency in excluding air during the process of manufacture and later in storage. Sausage S7 showed an increase of hexanal during storage reaching its maximum value at 45 days after, and then slightly decreasing at 60 days. In S2 hexanal was only found after 60 days of storage at the lowest value of the entire group, in spite of its fatty acid profile which contained more C18:2 (n-6), than the rest of the sausages.

According to the fatty acid profile S6 showed a high value in linoleic acid, which explains the presence of hexanal, due it is the principal precursor. If both groups are compared (ostrich meat and beef meat), sausages prepared with ostrich meat showed higher hexanal values than those prepared with beef meat. This could be due to the contribution of linoleic acid from ostrich meat and also due to the fact that poultry species appeared as the second most important factor, influencing the oxidative stability of the sausages due to their the fatty acid profile rich in polyunsaturated fatty acids in comparison to other animal species [28].

The results of the sensory evaluation after 60 days of storage are shown in the spider web diagrams of figure 4.

No differences were found by the panelists in relation to firmness in comparison to a commercial brand sample (CB) used as a control. On the other hand, controls C1 and C2 prepared with 30 % and 10 % pork backfat maintained relation with instrumental results for firmness. Both controls presented the lowest values in the end of the storage period at 60 days. In case of the texture quality, only S4 was evaluated by the panelist as moderately comparable as the commercial brand used as a reference sausage, the rest of the modified sausages were scored with lowest values in comparison to the reference. As reported by other authors, an increase in the content of PUFA may lead to “soft” meat and meat products of inferior quality [29]. The storage of meat and meat products reduced shelf life when

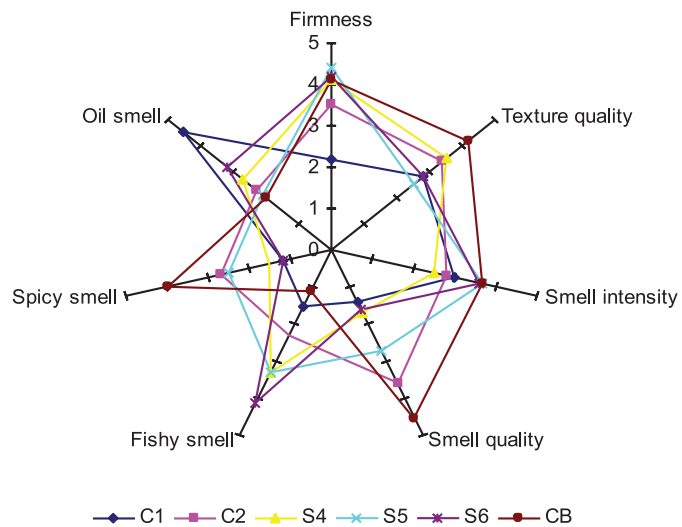


Figure 4a. Sensory evaluation of Dutch style fermented sausages manufactured with beef (scales from 1 to 5).

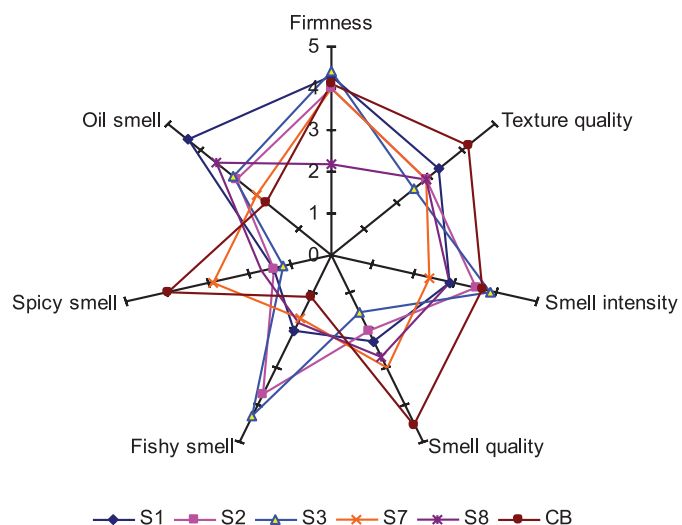


Figure 4b. Sensory evaluation of Dutch style fermented sausages manufactured with ostrich meat (1: minimum value, 5: maximum value).

unsaturated fatty acids are present in large amounts due to their high susceptibility to oxidation [30, 31, 32]. In case of smell intensity, assessors scored the samples S5 and S6 higher in comparison to the other samples after 60 days of storage. This observation is in agreement with the TBARS and Hexanal values. At this point the sensory panel could detect certain deterioration of the products, especially in those products with high n-3 PUFA concentrations, which produced higher concentrations of lipid degradation products.

Smell quality of all of the modified sausages obtained low scores in this parameter. As Murgueza et al. [17] have been reported; one of the limiting factors for introducing fish oil or derivatives into foodstuffs is the fishy smell that negatively affects sensory characteristics. Park et al. [33] detected undesirable flavor from fish oil when chicken frankfurters were prepared with 5 % fish oil. Murgueza et al. [34] concluded that sausages with a concentrated fish oil extract rich in n-3 fatty acids were not acceptable from the sensory point of view due to off odors. According to the panel, sausages S4, S5 and S6 obtained highest values in this parameter in comparison to controls C1 and C2 and the commercial brand. This fact could be due mainly to the oxidation of n-3 fatty acids. Oxidation of vegetable oils that have predominantly n-6 fatty acids will produce “grassy” and “beany” odors while oxidation of the long chain n-3 fatty acids in marine oils will produce ‘fishy’ odors.

As reported by Pelser et al. [8], no major differences were found in spicy intensity between the different samples, C1, S4 and S6, and C2 and S5, respectively. This was expected because the additions of salt and spices were equal for all the formulations; C1 showed the highest value of oily smell of all including the commercial brand. In general, the assessors did not find differences in texture between ostrich sausages and the commercial brand used as a standard. Comparing the sausages prepared with beef meat and ostrich meat, no matter the type of oil or fat used in the formulation, sausages prepared with ostrich meat can be resembled better in texture to the brands in the actual market than those prepared with beef meat. Only S7 differed in smell intensity. Nevertheless, the smell quality of all of the sausages was scored lower than the commercial standard. This confirms that all of the samples were in certain stage of oxidation.

After 60 days of storage, all the sausages had a lower score in their hedonic nature than the commercial brand. In comparison to the commercial brand, sausage C1 was ranged with the highest score in texture and color (9 points), that means that was no preferred for the sensory panel. These results can be compared with the instrumental measurement of color, which shows a loss of the color during storage, especially, in redness. The highest scores in odor were found in sausages S2 and S3 (10 and 9 points), panelists punctuated these sausages as none preferred

due to the odor produced by lipid oxidation products. According to Fernández-López et al. [36], pigment and lipid oxidation are the major deteriorative reactions in meat and meat products during storage. The development of lipid oxidation products is responsible for a significant loss in quality characteristics such as color, flavor, texture and nutritive value [37].

5. Conclusions

Sausages prepared with ostrich meat instead of beef meat reduced the total fat content. Substitution of pork backfat by encapsulated oils as linseed, algal and fish oil, rich in n-3, reached important nutritional benefits. Sample S1 prepared with ostrich meat and encapsulated linseed oil, showed a fatty acid profile in which the P/S ratio was increased and at the same time the n-6/n-3 ratio was decreased. According to the results obtained the incorporation of ostrich meat and encapsulated linseed oil to this kind of product presents great advantages due to the increase in PUFAs and decrease the saturated fatty acid. However, this increase in PUFAs and the type of meat using in the preparation of Dutch style semi-dry fermented sausages adversely affected the preservation of the product during storage period due to the susceptibility of PUFAs to the lipid oxidation reactions, causing deterioration and a loss of quality. Despite, the new strategies needs to be developed in order to preserve the healthy advantages of these types of sausages, while at the same time avoiding reduced quality during storage and prolonging the shelf life.

6. Acknowledgements

The authors thank Instituto para la Formación y Aprovechamiento de Recursos Humanos (IFARHU) and Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT), from the Government of the Republic of Panama, for their financial contribution in this research. We are also grateful to Mr. G. Keizer for preparing the Dutch style semi-dry fermented sausages, Mr. Frans Letting for his contribution in the laboratory, and to the companies Meester-Stegeman B. V. and Hanskamp Vers Vlees for drying and packaging the sausages.

7. References

- [1] A. P. Simopoulos, “ ω -3 fatty acids in the prevention management of cardiovascular disease”, *Canadian Journal of Physiological Pharmacology*, vol75, pp. 234-239, 1997.

- [2] I. Valencia, M. N. O'Grady, D. Ansorena, I. Astiasarán and J. P. Kerry, "Enhancement of the nutritional status and quality of fresh pork sausages following the addition of linseed oil, fish oil and natural antioxidants", *Meat Science*, vol80, pp. 1046-1054, 2008.
- [3] D. Ansorena and I. Astiasarán, "The use of linseed oil improves nutritional quality of the lipid fraction of dry fermented sausages", *Food Chemistry*, vol87, pp. 69-74, 2004.
- [4] J. D. Wood, R. I. Richardson, G. R. Nute A. V. Fisher, M. M. Campo, E. Kasapidou, P. R. Sheard and M. Enser, "Effects of fatty acids on meat quality: a review", *Meat Science* vol66, pp. 21-32, 2003.
- [5] J. W. Alexander, "Immunonutrition: The role of omega- 3 fatty acids", *Nutrition*, vol14, pp. 627-633, 1998.
- [6] U. N. Das, "Interaction(s) between Essentials fatty acids, eicosanoids, cytokines, growth factors and free radicals: relevance to therapeutic strategies in rheumatoid arthritis and other collagen vascular diseases", *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, vol44, pp. 201-210, 1991.
- [7] O. P. Ward and A. Singh, "Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production", *Process Biochemistry*, vol40, pp. 3267-3652, 2005.
- [8] W. M. Pelsler, J. P. H. Linssen, A. Legger and J. H. Houben, "Lipid oxidation in n- 3 fatty acid enriched Dutch style fermented sausage", *Meat Science*, vol75, pp. 1-11, 2007.
- [9] J. I. Gray, E. A. Gomma and D. J. Buckley, "Oxidative quality and shelf life of meats", *Meat Science*, vol43, pp. 111-123, 1996.
- [10] W. Visessanguan, S. Benjakul, S. Riebroy, M. Yarchai and W. Tapingkae, "Changes in lipid composition and fatty acid profile of Nham, a Thai fermented pork sausage, during fermentation", *Food Chemistry*, vol94, pp. 580-588, 2006.
- [11] Presidencia del Gobierno, Métodos de análisis de productos cármicos, Legislación española. B. O. E. 207, de 29 de agosto de 1979.
- [12] ISO. R-1443-1973, International Standard Meat & Meat Products, Geneva, Switzerland, 1973 b.
- [13] E. G. Bligh and W. J. Dyer, "A rapid method of total lipid extraction and purification", *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, vol37, pp. 911-917, 1959.
- [14] T. Asakawa and S. Matsushita, "A colorimetric microdetermination of peroxides values utilizing aluminum chloride as the catalyst", *Lipids*, vol15(11), pp. 965-967, 1980.
- [15] C. Alasnier, A. Meynier, M. Viau and G. Gandemer, "Hydrolytic and oxidative changes in the lipids of chicken breast and thigh muscles during refrigerated storage", *Journal of Food Science*, vol65(1), pp. 9-14, 2000.
- [16] F. Shahidi and R. B. Pegg, "Hexanal as an indicator of the flavor deterioration of meat and meat products", *Lipids in Food Flavors*, vol558, pp. 256-279, 1994.
- [17] E. Murgueza, O. Gimeno, D. Ansorena and I. Astiasarán, "Functional dry fermented sausages manufactured with high levels of n-3 fatty acids: nutritional benefits and evaluation of oxidation", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol84, pp. 1061-1068, 2004.
- [18] N. M. Josquin, J. P. H. Linssen and J. H. Houben, "Quality characteristics of Dutch-style fermented sausages manufactured with partial replacement of pork back fat with pure, pre-emulsified or encapsulated fish oil", *Meat Science*, vol90, pp. 81-86, 2012.
- [19] H. Mora-Gallego, X. Serra, M. D. Guàrdia and J. Arnau, "Effect of reducing and replacing pork fat on the physicochemical, instrumental and sensory characteristics throughout storage time of small caliber non-acid fermented sausages with reduced sodium content", *Meat Science*, vol9, pp. 62-68, 2014.
- [20] I. Valencia, D. Ansorena and I. Astiasarán, "Nutritional and sensory properties of dry fermented sausages enriched with n-3 PUFAs". *Meat Science*, vol72, pp. 727-733, 2006a.
- [21] D. J. Mc Clements and E. A. Decker, *Lipids*, in Fennema's. *Food Chemistry*, ed. by CRC Press: Great Britain, 2008, pp. 155-217.
- [22] E. A. Kusmider, J. G. Sebranek, S. M. Lonergan and M. S. Honeymanhttp, "Effect of carbon monoxide packaging on color and lipid stability of irradiated ground beef", *Journal of Food Science* vol67(9), pp. 3463-3468, 2002.
- [23] M. Kinter and R. J. Roberts, "Glutathione consumption and glutathione peroxidase inactivation in fibroblast cell time lines by 4-hydroxy-2-nonenal", *Free Radical Biology and Medicine*, vol21, pp. 457-462, 1996.
- [24] T. Sanders, "Toxicological considerations in oxidative rancidity of animal fats", *Food Science and Technology Today*, vol1, pp. 162-164, 1987.
- [25] S. Lee, C. Faustman, D. Djordjevic, H. Faraji and E. A. Decker, "Effect of antioxidants on stabilization of meat products fortified with n-3 fatty acids", *Meat Science*, vol72, pp. 18-24 2006.
- [26] B. Nordvi, Ø. Langsrud, B. Egelanddal, E. Slinde, G. Vogt, M. Gutierrez and E. Olsen, "Characterization of volatile compounds in a fermented and dried fish product during cold storage". *Journal of Food Science*, vol72(6), pp. S373-S380, 2007.
- [27] I. Valencia, D. Ansorena and I. Astiasarán, "Stability of linseed oil and antioxidants containing dry fermented sausages: a study of lipid fraction during different storage conditions", *Meat Science*, vol73, pp. 269-277, 2006b.
- [28] MB. Mielnik, K. Aaby, K. Rolfsen, M. R. Ellekjær and A. Nilsson, "Quality of comminuted sausages formulated from mechanically deboned poultry meat". *Meat Science*, vol61, pp. 73-84, 2002.
- [29] H. Jorgensen, S. K. Jensen and B. O. Eggum, "The influence of rapeseed oil on digestibility, energy metabolism and tissue fatty acid composition in pigs", *Acta Agriculturae Scandinavica A-An*, vol46, pp. 65-75, 1996.

- [30] J. Mourot and D. Hermier, "Lipids in monogastric animal meat", *Reproduction Nutrition Development*, vol41, pp. 109-118, 2001.
- [31] C. E. Allen and E. A. Foegeding, "Some lipid characteristics and interactions in muscle Foods-a review", *Food Technology*, vol35, pp. 253-257, 1981.
- [32] R. M. L. De Campo, E. Hierro, J. A. Ordóñez, T. M. Bertol, N. N. Terra and L. de la Hoz, "Fatty acid and volatile compounds from salami manufactured with yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract and pork backfat and meat from pigs on diets with partial replacement of maize with rice bran". *Food Chemistry*, vol103, pp. 1159-1167, 2007.
- [33] J. Park, K. S. Rhee, J. T. Keaton and K. C. Rhee, "Properties of low fat frankfurters containing monounsaturated and omega-3 polyunsaturated oils", *Journal of Food Science*, vol54(3), pp. 500-504, 1989.
- [34] E. Murgueza, O. Gimeno, D. Ansorena, J. G. Bloukas and I. Astiasarán, "Effect of replacing pork backfat with preemulsified olive oil on lipid fraction and sensory quality of Chorizo de Pamplona-a traditional Spanish fermented sausage", *Meat Science*, vol59, pp. 251-258, 2001.
- [35] A. Soriano, A. García Ruíz, E. Gómez, R. Pardo, F. A. Galán and M. A. González Viñas, "Lipolysis, proteolysis, physicochemical and sensory characteristics of different types of Spanish ostrich salchichon", *Meat Science*, vol75, pp. 661-668, 2007.
- [36] J. Fernández-López, E. Sayas-Barberá, Muñoz T, Sendra E, C. Navarro C and J. A. Pérez-Álvarez, "Effect of packaging conditions on shelf-life of ostrich steaks", *Meat Science*, vol78, pp.143-152, 2008.
- [37] J. G. Akkamittah, C. J. Brekke and E. G. Schanus, "Lipid peroxidation and color stability in restructured meat systems during frozen storage", *Journal of Food Science*, vol55, pp. 1507-1513, 1990.
- [38] K. T. Broce, "Desarrollo de un nuevo producto: Elaboración de salchichas cocidas de pollo con grasa nutricionalmente equilibrada", Tesis doctoral, Universidad de Burgos, España, pp. 92, 2003.

Diseño de rodilla policéntrica, simulación y evaluación de la resistencia a la fatiga

A polycentric knee design, simulation and evaluation of fatigue resistance

Domingo Vega M.¹, Eduardo Escobar²

¹Facultad de Ingeniería Mecánica, Centro Regional de Azuero, Universidad Tecnológica de Panamá,

²Facultad de Ingeniería Mecánica, Universidad Tecnológica de Panamá

¹domingo.vega@utp.ac.pa, ²eduardo.escobar@utp.ac.pa

Resumen— En este trabajo se diseñan los componentes de una rodilla policéntrica y se simula su comportamiento, sometiendo la estructura a cargas estáticas y dinámicas. Este proceso se realiza en tres fases, mediante software: una de síntesis y dimensionamiento, con el "SAM6"; otra de diseño y simulación del comportamiento estático, mediante el "Autodesk Inventor" y finalmente de simulación del comportamiento de resistencia a fatiga, con el "Autodesk Inventor Simulation Mechanics".

En el diseño se emplearon e integraron dos materiales, el acero A36 y el Aluminio 6061-T6, que ofrecen propiedades físicas y mecánicas que se consideran adecuadas para el desempeño y/o funcionalidad de la articulación.

Uno de los mayores aportes de este trabajo consistió en el análisis a fatiga de la estructura, para lo cual se emplearon los criterios de Goodman modificado y Gerber. Los resultados reflejaron una reducción en el peso de la rodilla policéntrica a valores inferiores a los pesos convencionales y una vida útil superior a los nueve años, esto abre las posibilidades de la fabricación de este tipo de rodillas en países en vías de desarrollo.

Palabras claves— Articulaciones, biomecánica, diseño, elementos finitos, prótesis transfemoral, rodilla policéntrica, simulación.

Abstract— In this paper the components of a polycentric knee are designed, and their behavior is simulated by subjecting the structure to static and dynamic loads. This process is done by using software in three phases: a synthesis and sizing test using the "SAM6", a test aimed to the design and simulation of the static behavior using "Autodesk Inventor" and a simulation of fatigue resistance test with the "Autodesk Inventor Simulation Mechanics". Two materials were used and integrated in the design, Steel A36 and Aluminum 6061-T6, both displaying appropriate properties for the physical and mechanical performance and / or functionality of the joint.

One of the main contributions of this work was to analyze fatigue of structure, for which the modified Goodman and Gerber criteria were used. The results show a reduction in the weight of the polycentric knee below conventional weight levels and over nine years of increased lifespan, this opens the possibility of producing this kind of knees in developing countries.

Keywords— Joints, biomechanics, design, finite element, polycentric knee, transfemoral prosthesis, simulation.

Tipo de artículo: Original

Fecha de recepción: 15 de septiembre de 2015

Fecha de aceptación: 30 de octubre de 2015

1. Introducción

El diseño y/o simulación de articulaciones policéntricas lleva años de desarrollo y existen varios modelos que en la actualidad se comercializan.

Tradicionalmente, para su confección se utilizan aleaciones de acero inoxidable, titanio o duraluminio, salvo contadas excepciones, se utilizan otros materiales diferentes a los tradicionales.

Por otra parte, existen algunos documentos donde se sugieren procedimientos para el dimensionamiento

y síntesis de las rodillas policéntricas (R.P.), los cuales permiten definir una zona de estabilidad durante la marcha, así como otros requerimientos biomecánicos [1, 2, 3]; la complejidad de la rodilla humana plantea un problema de final abierto; por tanto los resultados son aproximados.

En el mercado podemos encontrar R.P. que van desde las más sencillas con eje de fricción e impulsión mediante resorte, hasta las operadas por fluidos y microcontroladores, su estructura puede estar conformada por 4 o 6 barras y a pesar de que las de 6 barras ofrecen mayores variables de diseño, éstas son de mayor costo y mantenimiento.

Existen algunas características de las personas amputadas (P.A) que sirven de referente para el diseño

de las R.P., entre estos, el peso, grado de movilidad, ergonomía, altura, aspectos muy importantes en las características del diseño de la R.P. para garantizar la seguridad y estabilidad durante la marcha.

Para el diseño y simulación desarrollada se ha considerado adecuado trabajar con un promedio de 1.8 m de altura, un máximo de 100 kg y un grado de movilidad 2, según el sistema mobis de Otto Bock.

En este trabajo se propone diseñar una R. P. compuesta por acero y aluminio y simular el comportamiento de éstos a cargas estáticas y dinámicas para valorar su respuesta a esfuerzo de fatiga, con la intención de aportar nuevas alternativas de diseño y fabricación para este tipo de componentes protésicos, cubriendo las necesidades básicas en la marcha y la seguridad de la P.A.

La simulación desarrollada, busca emular el comportamiento de los componentes de la R.P., sometidos a diferentes consideraciones para evaluar los resultados y brindar parámetros que delimiten la vida útil de la misma.

Un valor añadido al diseño del mecanismo ha sido la incorporación de componentes de adquisición local y fácil reemplazo, potenciando de esta forma las posibilidades de la fabricación de R.P. en regiones en vías de desarrollo.

El artículo se ha realizado en cuatro fases, inicialmente se hace una revisión bibliográfica del estado del arte referente a la biomecánica de la rodilla humana [4, 5, 6, 7], a fin de comprender las restricciones y alcance en los diseños de las articulaciones desarrolladas y de las simulaciones realizadas hasta la fecha en R.P. Posteriormente, se desarrolla la síntesis y el análisis de los eslabones de la articulación, intentando mantener características sugeridas a partir de las referencias bibliográficas.

Se presenta el proceso de diseño de los componentes de la rodilla y la simulación de su comportamiento estático y dinámico, siendo de especial interés evaluar el fallo a fatiga de los componentes diseñados en aluminio, a fin de garantizar una limitada cantidad de ciclos operativos del mecanismo; de esa forma, dar una aproximación del tiempo de vida útil de la rodilla.

Finalmente se presentan las conclusiones del trabajo realizado.

2. Materiales y métodos

Para la realización de esta investigación se recolectaron y analizaron documentos que van desde datos estadísticos

y encuestas que abordan la biomecánica de la rodilla y de la marcha humana, hasta las diversas configuraciones de mecanismos utilizados en prótesis transfemorales (figura 1) para las P.A., sus limitaciones biomecánicas y su alcance funcional.

Se empezó por la aproximación a la síntesis y dimensionamiento de la rodilla, mediante el SAM 6, se ubicó el centro instantáneo de rotación (C.I.R.) a partir de una zona de estabilidad, en función de la línea de carga durante la marcha y otros requerimientos biomecánicos angulares para una flexión adecuada, a partir de las sugerencias bibliográficas [1, 2, 3, 8, 9, 10, 11].

Posteriormente, se diseñaron con el Autodesk Inventor 14 -versión estudiantil-, los eslabones en Al 6063T6 y los conectores o pirámides invertidas en acero A36. Se incluyeron en el conjunto diseñado, pernos A2-70 y bujes en aleación de bronce.

Durante esta etapa prestó interés la masa de los componentes, en especial el espesor de los eslabones 2 y 4, así como el de las pirámides invertidas, ya que el peso total de la articulación es un factor determinante en el diseño; sin embargo, no se quería comprometer la seguridad de la P.A.

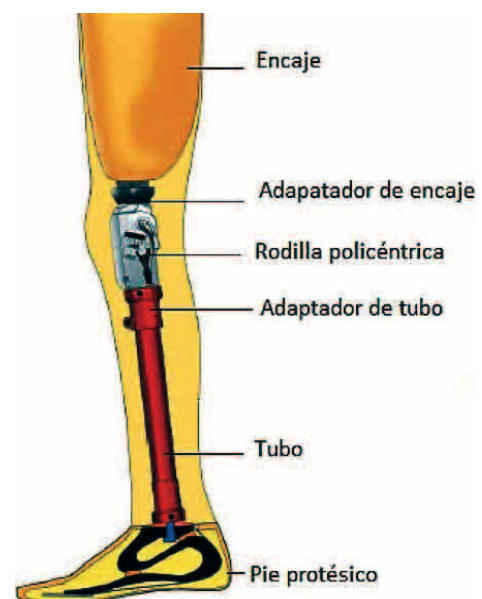


Figura 1. Partes básicas de una prótesis transfemoral.

Otro aspecto relevante fue la mantenibilidad y funcionalidad de la articulación, para ello se pensó en un mecanismo robusto y de fácil ensamblaje. Así se planteó el desarrollo de las pirámides invertidas, atornilladas a

los eslabones fémur y tibia, a fin de que estas pudieran ser reemplazadas con facilidad cuando fuese necesario por desgaste natural. Posteriormente se realizaron las simulaciones estáticas y dinámicas mediante el *SimulationMechanics de Autodesk*.

Para la simulación se supone que existe una carga máxima de 100 kg, restringiendo el movimiento de la parte correspondiente a la tibia y delimitando el análisis al plano sagital.

Dado que el aluminio posee una resistencia muy baja a la tracción y dureza escasa, se hizo la simulación del esfuerzo a fatiga de la articulación y la determinación del período de vida útil de la misma mediante el método de esfuerzo vida (S-N). Se utilizaron los criterios de falla por fatiga de Gerber y Goodman modificado mediante el paquete de elementos finitos del *SimulationMechanics*. Como se aprecia en la figura 2, se definió el perfil multiplicador de carga de las fuerzas externas que perciben las rodillas, debido al contacto del pie con el suelo cuya magnitud se ve reflejada en el pico FZ1 y tiene una magnitud próxima al 110 % del peso corporal [12].

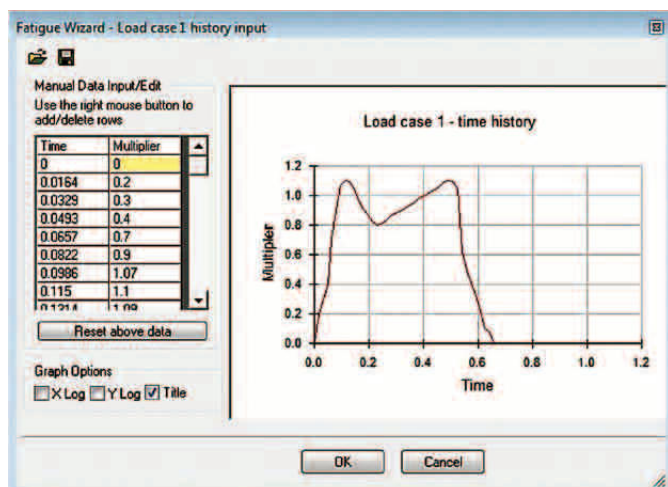


Figura 2. Perfil multiplicador de carga.

3. Resultados

A partir de las tres configuraciones desarrolladas, se realizó la simulación de la articulación en el SAM 6 y el resultado fue un arreglo favorecedor, dado que la tercera configuración generada ofreció un C.I.R. situado en una posición próxima y posterior a la articulación, esto genera mayor estabilidad y crea un momento de extensión, además de ventaja mecánica al requerir menos fuerza para mantenerla en extensión y para iniciar la flexión. En otras

palabras, con esta configuración se consigue que la fase de apoyo sea asegurada y la fase de impulsión controlada.

Al pisar con el talón, la rodilla no debe doblarse, pero el paciente tiene que ser capaz de flexionarla al finalizar la fase de apoyo. Si se observa en la figura 3, los primeros 5° de la trayectoria del C.I.R. se mantiene alto, evitando tropiezos y manteniendo la estabilidad de la rodilla [1].

Por otra parte esta configuración ofreció un ángulo de flexión máximo de 120° entre el eslabón 1 (tibia) y el eslabón 3 (fémur), permitiendo que una persona pueda ponerse de cuclillas.

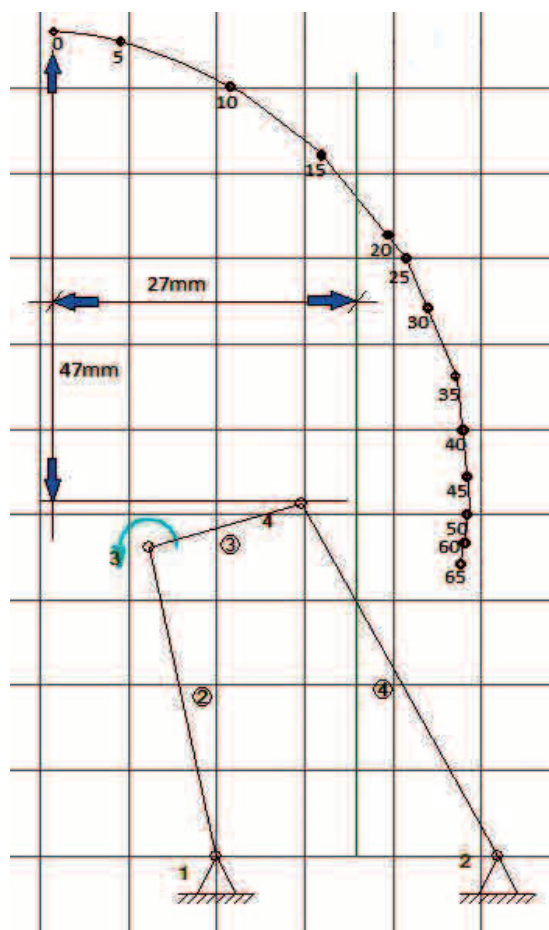


Figura 3. Cambio del C.I.R. durante el ciclo de la marcha.

Posteriormente, se tomaron los valores obtenidos en el SAM 6 y se continuó con el proceso de diseño. Para ello, se aplicaron las restricciones de movimiento, se colocaron las cargas, se establecieron los materiales, lo que generó el mallado para realizar las simulaciones estáticas y dinámicas mediante el Autodesk Inventor 14, tal como se observa en la figura 4.

Los resultados fueron los estados de esfuerzos de Von Mises, desplazamientos, y factores de seguridad.

Los mayores valores de estados de esfuerzos se reflejaron en el casquillo separador superior con 67.28 MPa (figura 5) y también el mínimo valor del factor de seguridad con 3.08 (figura 6). Además, los mayores desplazamientos se dieron en la pirámide invertida superior, tal como se observa en la figura 7. En ninguno de los casos se compromete la funcionalidad de la articulación y la seguridad de la P.A [1].

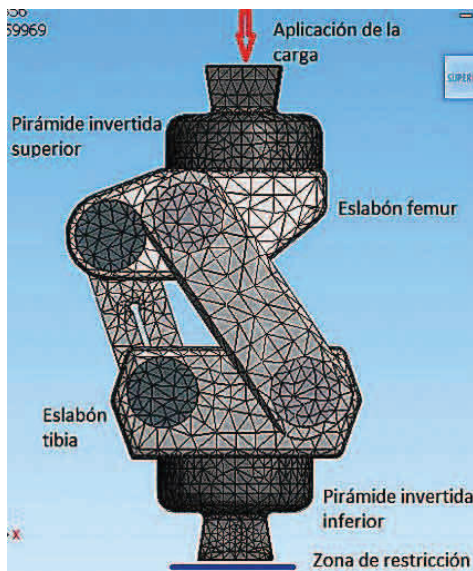


Figura 4. Mallado resultante, zona de aplicación de cargas y restricciones.

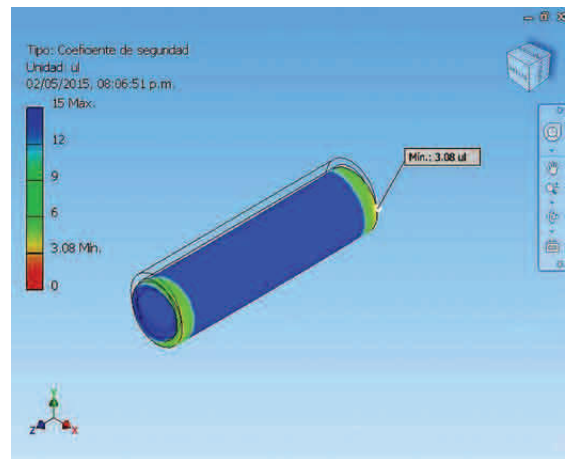


Figura 6. Mínimo valor del factor de seguridad.

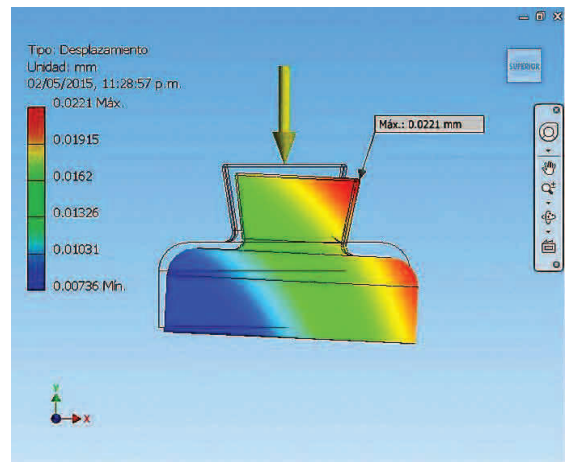


Figura 7. Desplazamiento de la pirámide invertida superior 0.0221mm.

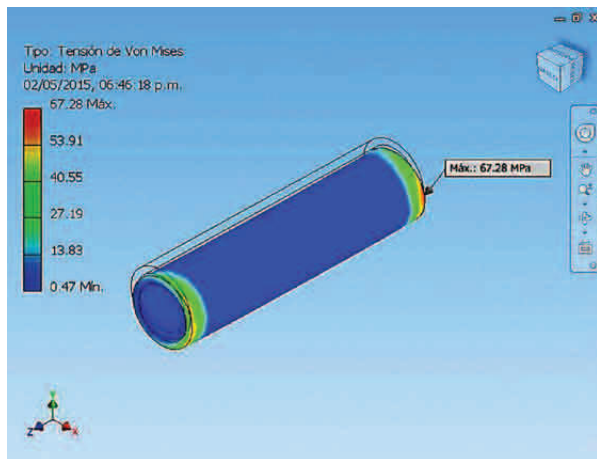


Figura 5. Estados de esfuerzos del casquillo separador superior.

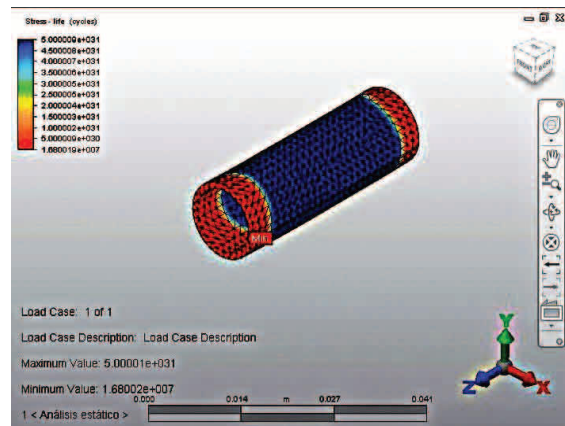


Figura 8. Menores ciclos de vida en el cojinete de fricción largo superior.

En el análisis a fatiga, la investigación reflejó que los menores ciclos de vida soportados (figura 8) se dieron en el cojinete de fricción largo superior y en el casquillo separador superior, ambos con $1.68002e+007$ mediante el criterio de Gerber y el de Goodman modificado.

Para los cálculos posteriores se consideró que una persona promedio realiza de 8000 a 10000 pasos diarios [10], esto conlleva de 4000 a 5000 ciclos de marcha completos por día. Dividiendo los $1.68002e+007$ ciclos de vida obtenidos en el análisis, entre los $5e+3$ del promedio de pasos diarios, es posible estimar los ciclos de marcha en años y obtener una aproximación de la vida útil de la rodilla. De esta forma se obtiene que la rodilla tiene un período de vida útil de 9.2 años.

Los cálculos de masas permitieron definir un peso de 0.68Kg para la rodilla, lo cual es significativamente más liviano que varias de las rodillas comerciales ofrecidas en el mercado internacional, ver tabla 1.

Tabla 1. Comparativa de pesos de rodillas

Prótesis de Rodilla	Peso
Rodilla diseñada	0.68 Kg (1.50 lbs)
Total Knee 2000	0.90 Kg (1.98 lbs)
C-Leg	1.20 Kg (2.64 lbs)
Orion	1.36 Kg (3.00 lbs)

4. Conclusiones

Se ha logrado diseñar y simular el comportamiento de una R.P. con materiales no integrados hasta la fecha, con buenos resultados en el análisis estático y dinámico, manteniendo la condición de funcionalidad dentro de parámetros aceptables de seguridad para la P.A. En ese sentido, la incorporación del A36 en las pirámides invertidas ofrece una alternativa de fabricación más económica y de fácil reposición

Algunas publicaciones [2, 4, 13, 14] plantean metodologías para el análisis estructural de sus componentes, sin embargo no responden al total de las consideraciones tomadas en cuenta en este trabajo, en especial, al análisis a fatiga desarrollado.

Los resultados a fatiga, según el criterio de Goodman modificado y Gerber (en ambos casos) sugieren que el período de vida útil de la rodilla corresponde a un dispositivo robusto, ya que la mayoría de las ofertadas

en el mercado alcanzan su máxima utilidad al llegar a los 5 años.

Si a esto le incorporamos que la configuración desarrollada es de fácil mantenimiento y de componentes asequibles en comercios de la localidad, entonces se considera que puede existir la posibilidad de fabricar una R.P. a menor costo de sus similares del mercado internacional.

Se obtuvo una configuración adecuada del C.I.R., lo que favorece la seguridad en la marcha de la P.A., dado que la estabilidad es un factor determinante para un adecuado desempeño de la R.P. Además, se logró obtener 120° de flexión máxima, lo cual no pone límites funcionales a la P.A. en el desempeño de sus actividades diarias.

Resultaría interesante plantear la fabricación del diseño de rodilla propuesta a fin de evaluar el desempeño de la misma en una P.A. y así contrastar los resultados obtenidos en la simulación.

Evidentemente los datos de la simulación deberán ser revisados en la práctica, sin embargo nos sentimos optimistas con los resultados obtenidos.

5. Agradecimiento

Agradecemos a la Ing. Celinda Pérez, docente de la Facultad de Ingeniería Industrial del Centro Regional de la Universidad Tecnológica en Azuero, y al Ing. Rubén D. Espítia, Vicerrector Académico de la Universidad Tecnológica de Panamá, por su acertada colaboración en la revisión de este documento.

6. Referencias

- [1] Radcliffe Charles W. Biomechanics of Knee Stability Control with Four-Bar Prosthetic Knees [en línea]. <http://rehabtech.com.au/techguide/pdf/kneeControl.pdf>
- [2] Amador, B., Torrealba, R., y Rojas, M. "Metodología para dimensionamiento de mecanismo policéntrico de rodilla utilizando análisis de la marcha y algoritmos genéticos". Revista Ingeniería Biomédica, Volúmen (6), 30-45. Enero-junio 2012.
- [3] TKR: Biomechanics&ProstheticDesignConsiderations. [en línea]. http://www.wheelsonline.com/ortho/tkr_biomechanics_prosthetic_design_considerations
- [4] Sánchez, J., Hernández, J. Torres, E. The mechanical design of a transfemoral prosthesis using computational tools and design methodology. Ingeniería e investigación. Volúmen 32, pp14-18, diciembre 2012.

- [5] Mendieta I, Articulación de la rodilla [en línea]. http://www.telmeds.org/wp-content/uploads/2012/01/Articulacion_de_la_rodilla2.pdf
- [6] Enríquez J., Alonso E., Méndez A. “Diseño y construcción de una prótesis de rodilla con pistón magnetológico”. Presentado en la conf. Intercambios de cuidado médico panamericanos. Miami, USA, 2007.
- [7] A. Furse and R. D’Sa. “Design and Analysis of A Prosthetic Knee Joint”. Bachelor of applied science. Department of Mechanical and Industrial Engineering. University of Toronto. March 20th, 2008.
- [8] Norton, R. Diseño de maquinaria. México: McGraw Hill. (2009), pp. 185.
- [9] Hernández, F. “Diseño y construcción de un prototipo neumático de prótesis inteligente de pierna humana”. (Tesis de pregrado). Universidad de las Américas Puebla. México. 2008.
- [10] Pandey, S y Pandey, A.K. Diagnóstico en Ortopedia Clínica. Jaypee Highlights Medical Publishers. 3rd edición. Panamá. 2011. Capítulo 15, página 466.
- [11] Rehabtech. Four-Bar Knee Prosthesis Simulation Results For the Mechanical Linkage Configuration. [en línea].<http://www.rehabtech.com.au/techguide/4barwebpages/OB3r36etallMain.htm>
- [12] kOVAC, i., Medved, V. y Ostojic, L. Ground Reaction Force Analysis in Traumatic Transtibial Amputees’ Gait [en línea]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20120527>
- [13] Correal S., Palacio L. y Salazar I. “Análisis FEA de Prótesis de Rodilla Policéntrica”. Avances en sistema e informática. Volúmen 3-1, 2006.
- [14] Castro L., Camacho F. “Diseño y Modelado Virtual del Mecanismo Policéntrico de una Prótesis de Rodilla”. [en línea]. <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/24546/1/Dise%C3%B1o%20y%20%20modelado%20virtual%20de%20mecanismo%20poli%C3%A9ntrico%20de%20una%20pr%C3%B3tesis%20de%20rodilla.pdf>

Producción de hidrocarburos biológicos utilizando un subproducto agroalimentario como sustrato

Production of biological hydrocarbons using an agrifood product as a substrate

Kesia M. Barrows¹, Ubaldo Ábrego-Delgado¹, Grimaldo Ureña-Matos^{1,2}, Indira Franco^{1,3}

¹Grupo de Investigación de Biotecnología, Bioinformática y Biología de Sistemas; Centro de Producción e Investigaciones Agroindustriales, Universidad Tecnológica de Panamá, ² Dirección de Investigación, Universidad Tecnológica de Panamá,

³ Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad Tecnológica de Panamá
kesiabarrows@gmail.com, indira.franco@utp.ac.pa

Resumen— La melaza es el residuo agroindustrial que no cristaliza resultante del procesamiento de la caña en la obtención de azúcar refinada. Tiene una amplia gama de usos destacándose, en el país, el dado en la alimentación bovina. Sin embargo, actualmente con el problema de la sostenibilidad energética, el hombre debe encontrar alternativas de fuentes que sean renovables, principalmente el área de combustibles líquidos para el sector transporte y se podría encontrar una alternativa en la melaza como fuente primaria para la obtención de biocombustibles. La Biología Sintética consiste en la síntesis de sistemas complejos de base biológica que realizan funciones que no existen normalmente en la naturaleza. Actualmente es uno de los campos de investigación más vanguardistas en el que se combinan la biología y la ingeniería. El objetivo de esta investigación consistió en utilizar la melaza como sustrato principal en el cultivo bacteriano M9 para obtener alcanos de origen biológico. Las bacterias utilizadas fueron *Escherichia coli* K12 que se modificaron genéticamente para que expresaran la enzima Acyl-ACP Reductasa (AAR) y la Aldehído Descarboxilasa (ADC) de *Synechococcus elongatus* PCC7942, modificación realizada con métodos desarrolladas por la biología sintética.

Palabras claves— Alcanos, biobricks, biología sintética, melaza, residuo agroindustrial.

Abstract— Molasses is the agro-industrial waste that does not crystallize resulting from the processing of sugarcane in the production of refined sugar. It has a wide range of applications standing in the country, as in cattle food. However, today with the problem of energy sustainability, men must find alternative sources that are renewable, mainly in the area of liquid fuels for the transportation sector and we could find an alternative molasses as a primary source for obtaining biofuel. Synthetic biology is the synthesis of complex biologically based systems that perform functions that don't exist in nature normally. Today is one of the most advanced research fields in which biology and engineering are combined. The objective of this research was to use molasses as the main substrate in M9 medium for alkanes of biological origin. The bacteria used were *Escherichia coli* K12 that are genetically modified to express the Acyl-ACP reductase (AAR) and the Aldehyde Decarboxilase (ADC) *Synechococcus elongatus* PCC7942, modification made with methods developed by synthetic biology.

Keywords— Alkanes, BioBricks, synthetic biology, molasses, agroindustrial residue.

Tipo de artículo: Original

Fecha de recepción: 15 de septiembre de 2015

Fecha de aceptación: 13 de diciembre de 2015

1. Introducción

Los residuos agroindustriales se han convertido desde hace unos años en foco de investigación, debido a los muchos nutrientes que se encuentran en los mismos y los cuales pueden ser aprovechados, desde el punto de vista nutricional o como fuente de energía [1]. En Panamá la producción media anual es de 13 millones de galones de melaza, residuo resultante del proceso de refinación de azúcar de caña en los centrales azucareros [2]. En el país son cuatro los centrales

dedicados a la producción de azúcar, y dos que elaboran exclusivamente licores.

La biología sintética es el diseño y construcción de dispositivos, así como de sistemas biológicos con fines útiles [3]. Ésta combina la biología y la ingeniería para diseñar sistemas biológicos con funciones nuevas que no se encuentran en la naturaleza [4]. Engloba gran variedad de enfoques, metodologías y disciplinas orientadas a la ingeniería genética y la biotecnología. Busca la creación de nuevos organismos programables, microorganismos que se comporten como pequeños ordenadores que el ser humano sea capaz de programar.

Al utilizar la biología sintética se podría lograr que una cepa particular de una bacteria como *E. coli* (*Escherichia*

coli) K12 competente produzca hidrocarburos de cadena larga partiendo de residuos agroindustriales con alto contenido de sacáridos, como por ejemplo la melaza, siguiendo una ruta metabólica que se ha observado en plantas y cianobacterias. Estos hidrocarburos pueden ser utilizados como combustibles líquidos. El experimento de Cheesbrough y Koattukudy (1984) utilizando *Pisum sativum*, siguiendo los resultados de los trabajos de Kolattukudy en 1967 y 1980, fue uno de los primeros en demostrar que la descarbonilación de aldehídos grasos para la producción de alcanos era la ruta para la formación de los mismos en los sistemas biológicos. El alcano más abundante reportado en esta bacteria fotoautótrofa es el heptadecano. Estas cadenas de alcanos son consistentes con la regla de contener “n-1” átomos de carbono que el aldehído graso descarbonilado del cual procede (generalmente de cadena par n) [5].

El objetivo de esta investigación consiste en utilizar la melaza como única fuente de carbono en el medio de cultivo M9 para obtener alcanos de origen biológico. Se inocularon bacterias de la cepa *E.coli* K12 que fueron previamente modificadas genéticamente para que expresaran la enzima Acyl-ACP Reductasa (AAR) y la Aldehído Descarbonilasa (ADC) de *Synechococcus elongatus* PCC7942.

2. Materiales y Métodos

En la realización de esta investigación se utilizó el plásmido BBa_K590025, secuencia de ADN con promotor constitutivo para la expresión de proteínas, *backbone* pSB1C3 que posee resistencia al *cloranfenicol* (Kit de iGEM Spring 2012 DNA Distribution. Ver figura 1 y figura 2).

2.1 Medios de cultivo

- LB (*Lysogeny Broth*). Se preparó 1l de medio LB con 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de Cloruro de Sodio (NaCl).
- SOC (*Super Optimal Broth*). Se preparó 500 mL de medio SOC utilizando 10 g de triptona, 2.5 g de extracto de levadura, 0.25 g de Cloruro de Sodio (NaCl), 0.1 g de Cloruro de Potasio (KCl). Se almacenó a temperatura de refrigeración y al momento de usar el medio SOC se le agregó por cada 100 mL de medio, 2 mL de glucosa 1M (18 %) y 1 mL de dicloruro de magnesio (MgCl₂) 1M, previamente filtrados con filtros de 0.2 μm para que estuvieran estériles.

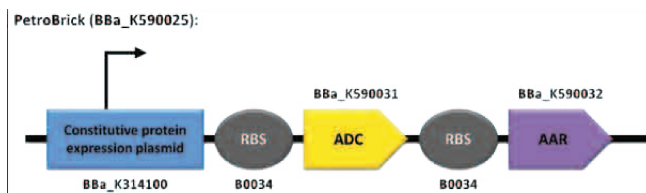


Figura 1. Contenido genético del *BioBrick* K590025, del *Kit* iGEM *Spring* 2012 DNA Distribution. Codifica para la expresión de las enzimas Aldehído Descarbonilasa (ADC) y Acyl-ACP Reductasa (AAR). Imagen adaptada de iGEM 2011, grupo Washington [6].

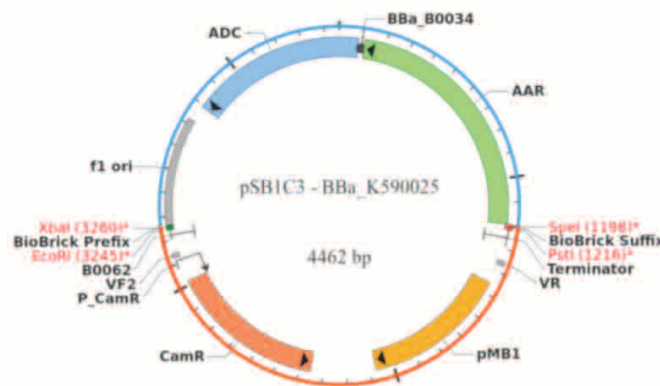


Figura 2. Estructura de un plásmido. “*Biobrick*” BBa_K590025 en el “*backbone*” pSB1C3 (resistencia *cloranfenicol*). Fuente: *Part registry*, part: Bba_K590025 [7].

- M9-Modificado. Se preparó de la siguiente manera: a 75 mL de agua desionizada, 3 g de melaza se le adicionan 0.6 g de hidrógeno fosfato de sodio (Na₂HPO₄), 0.3 g de hidrógeno fosfato de potasio (KHPO₄), 0.05 g de cloruro de sodio (NaCl), 0.2 g de cloruro de amonio (NH₄Cl), 10 mL de bis-tris 1 M (pH 7.25), 1 mL de triptona 10 %, 100 μL de tiamina 1mg / mL, 100 μl de tricloruro de hierro hexa-hidratado (FeCl₃•6H₂O) y 100 μL de sulfato de magnesio (MgSO₄).
- Medio sólido con y sin antibiótico. Se mezcló 100 mL de medio con 1.5 g de agar. Las placas con antibiótico tenían una concentración final de 25 μg / mL de antibiótico.

2.2 Caracterización de la melaza utilizada

Todas las determinaciones analíticas se realizaron en triplicado. Los valores de los distintos parámetros fueron expresados como la media ± desviación estándar.

La melaza de caña de azúcar fue donada por una industria dedicada al procesamiento del azúcar. Se mantuvo bajo refrigeración (<10 °C). Su contenido de humedad, cenizas y proteína fue determinado de acuerdo a la metodología establecida por la *Association of Analytical Communities* (AOAC) [8]. La determinación de humedad se realizó en una balanza de humedad Mettler Toledo HB43 Halogen, colocando 0.75 g de muestra en el equipo. La medición de las cenizas se realizó mediante el secado previo de las muestras a 75 °C, luego se incineraron a 550 °C durante 2 horas. El valor del nitrógeno total fue obtenido utilizando el protocolo “ASN_3438 Kjeldahl *nitrogen in molasses*” (AOAC 969.37). Como titulante se utilizó ácido clorhídrico estandarizado (HCl) 0.01 N. Para la determinación de los grados *Brix*, se utilizó el índice de refracción utilizando un refractómetro digital Atago con un rango de 45-93 %.

2.3 Transformación bacteriana

Se transformaron 220 µL de la bacteria *E. coli* K12 competentes (cortesía de INDICASAT) añadiéndole 2 µL del plásmido que contiene la secuencia de ADN del *biobrick* BBa_K590025 en el backbone pSB1C3 con resistencia al *cloranfenicol* (Kit de iGEM Spring 2012 DNA Distribution) utilizando el protocolo de transformación facilitado por el iGEM HQ en su página de soporte: *Registry of Standard Biological Parts, Transformation Protocols* [9].

2.4 Selección celular.

Se realizó en 2 placas Petri con agar LB al que se le agregó cloranfenicol con una concentración final de 25 µg/mL. De esta forma solo las células exitosamente transformadas tenían la capacidad de crecer en la placa. En una de las placas se sembró 20 µL de cultivo obtenido de la transformación para calcular el rendimiento de la misma.

2.5 Producción y extracción de alcanos biológicos

Medio de producción de alcanos. Se hizo una siembra de las bacterias transformadas con el plásmido de interés en medio LB con antibiótico de un día para otro (*overnight*), al día siguiente, por centrifugación y decantado se obtuvo un *pellet* de bacterias que se resuspendió en el medio de cultivo M9 modificado (con la melaza como única fuente de carbono), se dejaron crecer las bacterias en este medio

durante 48 horas y luego se hizo la extracción de los alcanos con Acetato de Etilo, se centrifugó, se tomó la capa superior de la centrifugación (que es el Acetato de Etilo con los alcanos disueltos en el) y se hizo el análisis de este extracto en el cromatógrafo de gases.

2.6 Determinación de alcanos por GC-MS

Los alcanos extraídos se analizaron mediante GC-MS para determinar su producción efectiva y consecuente identificación. Se utilizó un cromatógrafo de gases – espectrometría de masas (GC-MS) Agilent 6890N, equipado con un detector selectivo de masa (MSD) 5975C inerte con detector de triple eje (Agilent Technologie, Palo Alto, CA, USA). La separación se llevó a cabo en una columna capilar DB5-MS (30 m longitud, 0,25 mm d.i., 0,25 espesor de la película, Agilent Technologie, Palo Alto, CA, USA). El horno de cromatografía de gases tenía una temperatura inicial de 50 °C durante 2 min, luego se incrementó a 240 °C a una tasa de 6 °C / min mantenida por 5 min. La temperatura del inyector se mantuvo a 250 °C, usando modo *splitless injection*. El gas transportador utilizado fue el Helio, con un flujo de 1 mL / min. El espectrómetro de masa estuvo funcionando en el modo *scan* desde 30-550 m / z, la temperatura de fuente de ion se estableció a 250 °C, la ionización se llevó a cabo en el modo *impact ionization* (EI) con el voltaje de ionización establecido en 70 e V.

3. Resultados y discusión

Luego de haber realizado los ensayos pertinentes se obtuvieron los siguientes resultados:

3.1 Melaza caracterizada

Los resultados obtenidos de los análisis fisicoquímicos realizados para la caracterización de la melaza utilizada se encuentran en la tabla 1.

Tabla 1. Porcentaje de humedad, ceniza, proteína y grados *Brix* en melaza

Muestra	Humedad	Cenizas	Proteína	° <i>Brix</i>
Melaza	16.9 ± 0.6	13.6±0.9	2.49 ± 0.14	82.3±0.3

*Los valores corresponden al promedio ± DE

En Vega-Baudrit et al. (2007) respecto a la caracterización de melazas usadas en la síntesis de espumas de poliuretano (ver tabla 2), se reportan valores

similares a los que fueron obtenidos en este trabajo. Los componentes principales de la melaza son los carbohidratos y el contenido acuoso.

Tabla 2. Composición de melaza [10]

Componente	Composición (%)
Agua	20
Sacarosa	35
Glucosa	7
Cenizas	12
Compuesto nitrogenados	4.5

Fuente: Vega-Baudrit et al. (2007)

La medición del contenido de azúcares por grados Brix representa la cantidad de sólidos disueltos expresados como sacarosa. En el trabajo de Vega-Braduit et al. [10], obtuvieron un valor de 79.3°Bx.

3.2 Rendimiento de la transformación bacteriana

El rendimiento de la transformación fue de $7,6 \times 10^5 \text{ ufc} / \mu\text{g}$ valor que se calculó, primero, buscando el valor de las unidades formadoras de colonias (UFC) transformadas, valor que se obtuvo de la siguiente manera:

$$\text{UFC transf} = \frac{(14)(50)(1000)}{20} \quad (1)$$

En donde 14 corresponde al número de colonias obtenidas luego de 24 hr, 50 es el volumen de células competentes que se usó para la transformación (está en μL), 1000 es el factor de dilución obtenido al agregar 200 μL de medio LB; y 20 es el volumen de medio que se utilizó en la placa (también en μL). Luego de esto se determina la eficiencia de transformación como sigue:

$$\text{Ef. de transf.} = \frac{3,5 \times 10^4 \text{ ufc}}{0,046 \mu\text{g}} = 7,6 \times 10^5 \text{ ufc} / \mu\text{g} \quad (2)$$

El valor de $3,5 \times 10^4 \text{ ufc}$ son las ufc's transformadas que se obtuvieron, y 0,046 μg fue la cantidad de plásmido empleado para la transformación (1 μL con una concentración de $4,6 \times 10^{-2} \mu\text{g} / \mu\text{L}$ de plásmido Bba_K490025). Como plásmido de control se utilizó el Bba_J04450 (plásmido que le otorga una fluorescencia roja a las colonias transformadas), cuya eficiencia fue de $2,57 \times 10^5 \text{ ufc} / \mu\text{g}$.

3.3 Alcanos determinados por GC-MS

Como se observa en la tabla 3, los principales alcanos identificados fueron undecano, tetradecano, pentadecano y hexadecano, pero además también se pudieron identificar otros hidrocarburos de cadena corta como el octano. En los trabajos realizados como parte del proyecto de la Universidad de Washington para el *International Genetically Engineered Machines* del 2011 [11], obtuvieron alcanos de cadenas C13, C15 y C17 utilizando el medio M9 con glucosa como fuente de carbono; mientras que en el trabajo de Schirmer et al. (2010) [5] fue demostrada la producción de tridecano (C13), pentadecano (C15) y heptadecano (C17) en *E.coli* a través de la expresión de los genes *aar* y *adc*.

Tabla 3. Tiempos de retención observados en el cromatograma para los picos identificados

	Tiempo de retención	Deconvolución	Porcentaje (%)
Octano	4.036	4.65	0.06
Undecano	17.662	18.51	0.03
Tetradecano	41.268	20.43	0.06
Pentadecano	45.525	22.84	0.07
Hexadecano	49.366	25.27	0.03

En la figura 3 se muestra el cromatograma obtenido de hidrocarburos extraídos con acetato de etilo de una muestra del medio M9 con melaza luego de 48 h de incubación con las bacterias modificadas.

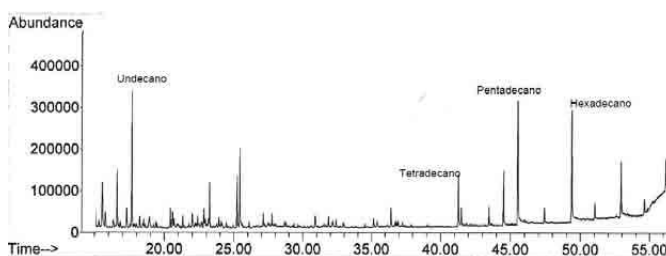


Figura 3. Picos señalados en el cromatograma obtenido del análisis de la extracción con acetato de etilo de una muestra de medio M9 con melaza.

4. Conclusiones

En esta investigación se pudo corroborar que la *E.coli* transformada puede utilizar la melaza como fuente de carbono y producir hidrocarburos entre 11 y 15 carbonos. Queda por determinar el grado o la eficiencia de producción. Se esperaba que fueran alcanos de cadena

larga, que pudieran ser utilizados como biocombustibles, y como se observó, sí fue posible.

Utilizando la biología sintética, se puede no solo obtener biocombustibles, sino también nuevas moléculas, las bacterias podrán inclusive sustituir procesos de la industria química que son agresivos para el medio ambiente. Esto es una solución factible al problema de contaminación ambiental.

5. Agradecimiento

Se agradece al Dr. Javier Sánchez-Galán por su invaluable apoyo; al Centro de Producción e Investigaciones Agroindustriales (CEPIA) y al grupo de investigaciones en biotecnología, bioinformática y biología de sistemas (GIBBS) por la gestación y apoyo en la ejecución de este proyecto.

A su vez, a los investigadores y laboratorios del Instituto de Investigaciones Científicas y de Servicios de Alta Tecnología (INDICASAT AIP).

El presente trabajo de investigación fue financiado bajo el programa UTP Investiga, de la Universidad Tecnológica de Panamá.

6. Referencias

- [1] S. Saval. Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. *Biotecnología*, vol. 16, pp. 14-46, 2012.
- [2] Producción de azúcar y melaza y caña utilizada en la República: Años 2011 y 2012. Instituto General de Estadística y Censo (INEC). Contraloría General de la República de Panamá.
- [3] M. Schmidt. *Synthetic Biology: Industrial and Environmental Applications* (3rd ed.). Weinheim, Germany: Wiley-Blackwell. pp. 1-67, 2012.
- [4] L. Serrano. Synthetic biology: promises and challenges. *Molecular Systems Biology*, vol 6. pp 1-5, 2007.
- [5] A. Schirmer, M. Rude, X. Li, E. Popova, S. Del Cardayre. Microbial Biosynthesis of Alkanes. *Science*, vol. 329, pp. 559-562, 2010.
- [6] UW iGEM Make it or break it. Diesel Production: Methods. Dirección web: <http://2011.igem.org/Team:Washington/Alkanes/Methods>
- [7] REGISTRY OF STANDARD BIOLOGICAL PARTS. PART: BBa_K590025 designed by Lei Sheng, Group iGEM11_Washington (2011-9-15). Website http://parts.igem.org/Part:BBa_K590025?title=Part:BBa_K590025. Página de información. Consultado: Septiembre 10, 2014.
- [8] AOAC Official Methods of Analyses. Washington, DC: s.n. 1997.
- [9] Transformation protocol. Registry of standard biological parts. I-Gem. Webpage: http://parts.igem.org/Help:Transformation_Protocol
- [10] J. Vega-Baudrit, K. Delgado-Montero, M. Sibaja-Ballesteros, P. Alvarado-Aguilar. Uso alternativo de la melaza de la caña de azúcar residual para la síntesis de espuma rígida de poliuretano (erp) de uso industrial. *Tecnología, Ciencia, Educación*, vol. 22. pp. 101-107, 2007.
- [11] UW iGEM Make it or break it. Diesel Production: Results Summary. Dirección web: <http://2011.igem.org/Team:Washington/Alkanes/Results>

Determinación de metales pesados mediante el uso del *Artificial Mussel* bajo condiciones controladas de pH, salinidad y temperatura: Estudio de validación

Determination of heavy metals using the *Artificial Mussel* under controlled conditions of pH, salinity and temperature: Validation study

Alma Chen¹, Kathia Broce²

¹Centro Regional de Veraguas de la Universidad Tecnológica de Panamá, ²Centro de Investigaciones Hidráulicas e Hidrotécnicas de la Universidad Tecnológica de Panamá

¹alma.chen@utp.ac.pa, ²kathia.broce@utp.ac.pa

Resumen— Tradicionalmente, se han empleado organismos bivalvos para el monitoreo de la contaminación marino-costera debido a su notable capacidad para bioacumular metales pesados. Sin embargo, la concentración de éstos puede ser afectada significativamente por factores biológicos y físicos. Debido a las limitantes antes descritas, los investigadores Wu y Lau de la Universidad de Hong Kong, desarrollaron un dispositivo al que denominaron: “Artificial Mussel (AM)”. Este consiste en un polímero ligando capaz de acumular y liberar metales en respuesta a la concentración de éstos disueltos en el agua marina, permitiendo así su evaluación y comparación directa en diversos ecosistemas acuáticos.

Este dispositivo ha sido probado en el monitoreo de zonas costeras de Australia, Escocia, Sur África, Islandia y China, con bastante éxito; sin embargo, no ha sido utilizado aún en costas de zonas tropicales.

El presente estudio contempla la construcción y validación de la eficiencia de captura de los metales cadmio, cobre y cromo por parte del AM, bajo condiciones controladas de pH, salinidad y temperatura en el laboratorio, con la finalidad de obtener un dispositivo que pueda ser utilizado para el monitoreo de metales pesados en ambientes acuáticos tropicales, que genere datos confiables. Los resultados obtenidos muestran que a mayor tiempo de exposición y a mayor salinidad, la afinidad por los metales varía, encontrándose que el AM presenta una mayor afinidad por el Cu que por el Cd, con un máximo de captación a los 35 días de exposición y 20 días en estudios de corto plazo.

Palabras claves— Artificial mussel, bioindicadores, condiciones controladas, contaminación marina, metales pesados, selectividad, zonas costeras.

Abstract— Traditionally, bivalves' organisms have been employed to monitor marine-coastal contamination due to their remarkable ability to bioaccumulate heavy metals. However, the concentration of metals in the bivalves can be affected significantly by biological and physical factors. Due to this limitation, researchers Wu and Lau from the University of Hong Kong developed a device called: “Artificial mussel”. This device consists in a ligand polymer capable of accumulating and releasing metals in response to their concentration dissolved in marine water, allowing the evaluation and direct comparison in diverse ecosystems.

This device has been proved successfully in the monitoring of coastal zones in Australia, Scotland, South Africa, Iceland China, nevertheless, it has not been proved in tropical coastal zones.

This study includes the construction and validation of the capture efficiency of the metals cadmium, copper and chromium from the AM, under controlled conditions of pH, salinity and temperature in the laboratory, in order to obtain a device that can be used for the monitoring of heavy metals in tropical aquatic environments, generating reliable data. The results show that the greater the exposure time and higher salinity, affinity for metals varies, finding that the AM has a greater affinity for Cu than Cd uptake with a maximum of 35 days of exposure and 20 day in short-term studies.

Keywords— Artificial mussel, bioindicators, controlled conditions, marine contamination, heavy metals, selectivity, coastal zones.

Tipo de artículo: Original

Fecha de recepción: 12 de noviembre de 2015

Fecha de aceptación: 14 de diciembre de 2015

1. Introducción

Los metales pesados constituyen uno de los grupos de xenobióticos que afectan más negativamente a las zonas costeras, hábitat de la mitad de recursos pesqueros del planeta.

La creciente densidad de población y la rápida industrialización de las zonas costeras están afectando en gran

medida la calidad del medio marino. La contaminación, la sobreexplotación y la baja protección amenazan con dañar aún más los ecosistemas marinos, lo que lleva a grandes problemas de salud pública y pérdidas económicas (Tayeb et al., 2015).

En el campo de la contaminación ambiental del ecosistema marino y estuarino se emplean distintas especies de organismos vivos como bioindicadores, los moluscos y otros organismos filtradores, han sido empleados por los ecologistas debido a su capacidad de absorber y liberar metales a lo largo del tiempo, dando

de esta forma una idea acerca de los efectos cualitativos y cuantitativos provocados por los diversos agentes químicos que provocan cambios en la calidad del agua. Sin embargo, estos organismos son afectados por factores ambientales como la salinidad, la temperatura y biológicos como el tamaño, la edad reproductiva, y el sexo, así como por la disponibilidad de sitios de anclaje, limitándose de este modo su uso como biomonitor de contaminación (Wu & Lau, 1996).

Por lo tanto, los estudios de contaminación marina se benefician con la adopción y aplicación de tecnologías que proporcionen uniformidad en los resultados de bioacumulación de metal (Degger et al., 2011).

El *Artificial Mussel* (AM, por sus siglas en inglés) es un dispositivo de muestreo desarrollado por Wu & Lau (1996) con el objeto de proporcionar una metodología que superara las limitaciones presentadas por los indicadores biológicos, como lo son las estrategias de acumulación de contaminantes según la especie y la distribución biogeográfica de cada una de ellas. El AM es una herramienta alternativa para el monitoreo de la contaminación por metales o elementos traza en zonas costeras, debido a su capacidad de captación de metales en agua y liberación en soluciones ácidas, para posterior determinación.

Estudios han demostrado que los *Artificial Mussels* (AM) o moluscos artificiales no solo dan el tiempo aproximado de la concentración de metales, sino que también permiten la comparación de los niveles de metales en diferentes áreas geográficas más allá de los límites de distribución de los biomonitores (Wu y Lau, 1996).

En el presente trabajo, se ha desarrollado en el Laboratorio de Química del Centro Regional de Veraguas en colaboración con el Centro de Investigaciones Hidráulicas e Hidrotécnicas (CIHH), ambos de la Universidad Tecnológica de Panamá, un prototipo de dispositivo para el monitoreo de elementos traza, basado en el diseño original de Wu y Lau (1996), para dar seguimiento al estudio en ambientes marino costeros y de agua dulce del Humedal de Importancia Internacional Golfo de Montijo.

Este dispositivo consiste en una resina de intercambio iónico (en este caso fue empleada la Chelex 100®), suspendida en agua marina artificial dentro de un tubo semipermeable. La membrana semipermeable, permite el paso de iones de los metales trazas (Cr, Cd, Cu), antes de ser quelados por la resina. Esta resina de intercambio

catiónico tiene alta preferencia para el cobre y otros metales pesados.

Para poder determinar los niveles de contaminación por metales o elementos traza, empleando estos dispositivos, en sitios como el Golfo de Montijo; se hizo necesario primeramente evaluar bajo condiciones controladas de salinidad, temperatura y pH, la capacidad de captación de metales y realizar un estudio de validación en el laboratorio. Los resultados de las pruebas analíticas realizadas son presentados en este trabajo.

2. Materiales y métodos

2.1 Pruebas de captación de metales por parte de los *Artificial mussels* bajo condiciones de laboratorio

Las metodologías empleadas en este estudio, fueron las empleadas por Wu y Lau (1996) con algunas pequeñas variantes.

2.1.1 Preparación de los *Artificial mussels*

Cien (100) *Artificial Mussels* (AM) fueron construidos a partir de tubos plásticos de aproximadamente 2.5 cm de diámetro, 6 cm de alto y abierto en ambos extremos; uno de los extremos fue cubierto con una película plástica, de aproximadamente 5 cm x 5 cm en tamaño, y fijada con una liga (banda de caucho).

Cien (100) ml de una solución que contenía 15 g de acrilamida y 0.5 g de N, N'-metilen-bis-acrilamida fue preparada utilizando un matraz volumétrico de 100 ml. Esta solución constituye el gel polimerizado que forma parte de la estructura de soporte del AM. A cada tubo plástico se le adicionaron 4 ml de la solución preparada de poliacrilamida, 160 µl de una solución al 10 % de peroxidisulfato de amonio (Esta solución actúa como iniciadora del proceso de polimerización) y 40 µl de TMEDA (N, N, N', N'-tetrametiletildiamina), la cual actúa como catalizador de la polimerización.

Añadidos estos dos últimos reactivos la polimerización se completaba dando una textura de gel en aproximadamente 5 minutos.

Después de terminada la polimerización, los tubos fueron colados en un contenedor con agua tridestilada (3-D) durante toda la noche. El propósito de colocar el tubo en agua 3-D es para permitir que el gel se hinche y se fije en el mismo.

Una vez fijado el gel en el tubo, se colocó un anillo plástico, de aproximadamente 2 cm de diámetro y 1 cm

de alto, dentro del mismo y fueron adicionados 0.2 ± 0.05 g de la resina Chelex® 100.

Se adicionó suficiente agua 3-D hasta que el anillo quedó totalmente inmerso.

Cada tubo fue sellado empleando una capa de gel de otro tubo, por el extremo descubierto. Ambos geles contenidos dentro del tubo fueron empujados desde los extremos hacia el centro del anillo plástico, asegurándose de que tocasen a este último.

Finalizado el paso anterior, la fabricación del AM ha sido completada encontrándose la resina Chelex® 100 encerrada dentro el tubo plástico con ambos extremos sellados por el gel permeable.

2.1.2 Experimento I

Estudio para investigar la captación de metales por parte del AM bajo diferentes concentraciones.

La determinación del potencial de captación de los metales cadmio, cobre y cromo por parte del AM (molusco artificial), fue realizada bajo condiciones controladas de pH, temperatura y salinidad, y a distintas concentraciones, dentro del laboratorio.

Los AM fueron distribuidos en diversos cubos que contenían diferentes concentraciones de los metales en estudio (Ver tabla 1). Cada cubo contenía 10 litros de agua con la siguiente concentración de metales:

Tabla 1. Concentración de elementos traza (metales) en mg/L, para ensayo de captación

Recipientes	Elementos traza (mg/L)		
	Cd	Cr	Cu
Cubo 1	0.10	0.05	0.05
Cubo 2	1.00	2.00	2.00
Cubo 3	5.00	10.00	10.00

Diez (10) AM fueron colocados sobre una rejilla plástica la cual fue sumergida dentro del cubo que contenía agua y distintas concentraciones de sales. Fue necesario airear cada cubo mediante una bomba para aumentar la circulación del aire dentro de los mismos. Todos los cubos fueron cubiertos para evitar la contaminación.

La afinidad de la resina Chelex® 100 hacia ciertos metales, está sujeta a la estructura de la misma, la cual podría verse afectada por variaciones en el pH,

en particular si el pH está por debajo de 4, la tasa de intercambio de la resina podría ser muy baja. Por consiguiente, el pH del agua en cada uno de los cubos fue monitoreado semanalmente durante el curso del experimento.

La concentración de metales fue monitoreada semanalmente también, adicionándose una cantidad apropiada de sales metálicas para mantener la concentración de estos.

Para fines de control de calidad, otros 10 AM fueron colocados en un cubo como los anteriormente descritos (Cubo control). El propósito de este control fue evaluar cualquier contaminación durante el experimento, manejo, preparación, almacenamiento y análisis químico de los AM.

Los AM de cada cubo fueron muestreados aleatoriamente y por duplicado (cubos 1-3 y control), en un intervalo de siete días.

2.2 Experimento II

Estudio para evaluar el efecto a corto plazo de la variación en la concentración de metales sobre la acumulación de metales por los *Artificial mussels* (AM).

Para esta fase de laboratorio, los AM fueron distribuidos en diversos cubos que contenían diferentes concentraciones de los metales en estudio (Ver tabla 2). Cada cubo contenía 10 litros de agua con la siguiente concentración de metales:

Tabla 2. Concentraciones de elementos traza (metales) en mg/L, para prueba de validación

Recipientes	Elementos traza (mg/L)		
	Cd	Cr	Cu
Cubo 4a	0.50	1.00	1.00
Cubo 4b	5.00	10.00	10.00
Cubo 5a	0.50	1.00	1.00
Cubo 5b	5.00	10.00	10.00

Diez (10) AM fueron colocados sobre una rejilla plástica la cual fue sumergida dentro del cubo que contenía agua y distintas concentraciones de sales. Fue necesario airear cada cubo mediante una bomba para aumentar la circulación del aire dentro de los mismos. Todos los cubos fueron cubiertos para evitar la contaminación.

Los AM fueron colocados en los cubos 4a y 4b alternativamente. Los AM fueron colocados en el cubo 4a la mayor parte del tiempo y transferidos al cubo 4b

por un período de 1 día en el día 2, día 9, día 16 y día 20.

De igual forma, 10 AM fueron colocados en los cubos 5a y 5b alternativamente. Los AM se mantuvieron en el cubo 5a la mayor parte del tiempo y transferidos al cubo 5b por un período de 1 día en el día 6, día 9, día 20 y día 23.

La concentración de los metales en los cubos 4a, 4b, 5a y 5b fue monitoreada semanalmente y se añadió una cantidad adecuada de sales para mantener la concentración a lo largo del período de experimento. El pH del agua fue monitoreado semanalmente para verificar la variación del mismo durante el curso del estudio.

Los AM fueron muestreados aleatoriamente por triplicado desde el cubo 4a/4b y 5a/5b en intervalos de 7 días hasta que el equilibrio fue alcanzado. Los metales fueron analizados por AAs.

2.3 Preparación de muestras para análisis espectrométricos

Una vez tomadas las muestras de forma aleatoria, el contenido del AM fue vaciado y eluido para el análisis de elementos traza (metales pesados) mediante la técnica de Espectrometría de Absorción Atómica (AAs).

Cada muestra de AM fue lavada con agua destilada para posteriormente proceder a expulsar el gel de poliacrilamida por uno de los extremos del tubo plástico. El contenido del tubo fue vaciado sobre un tamiz de plástico y enjuagado con suficiente agua destilada para garantizar que toda la resina saliera del mismo.

La resina fue filtrada y colectada sobre un vaso plástico de 100 ml de capacidad; una vez hecho esto, la resina fue trasvasada hacia un tubo plástico de 50 ml procurando que tuviera la menor cantidad de agua posible.

A cada tubo que contenía la resina, se le añadieron 30 ml de HNO_3 , 6M y se almacenó por espacio de 24 horas para que se completara el proceso de digestión de la muestra. Una vez completado el período de digestión, se procedió a diluir las muestras y se guardaron en refrigeración ($4\text{ }^\circ\text{C}$) hasta posterior análisis.

2.4 Análisis de muestras por Espectrometría de Absorción Atómica (AAs)

Cada muestra de la etapa de captación fue analizada utilizando un espectrómetro de absorción atómica, modelo Shimadzu A 7000.

El equipo cuenta con una fuente de luz que emite la línea espectral de un elemento (lámpara de cátodo hueco

o lámpara de descarga sin electrodos), un dispositivo para vaporizar la muestra (usualmente una llama), un medio para aislar una línea de absorción (monocromador o filtro y una abertura ajustable), y un detector fotoeléctrico el cual está asociado a un amplificador electrónico y un equipo de medida.

Un rayo de luz es dirigido a través de la llama a un monocromador y sobre un detector, que mide la cantidad de luz absorbida por el elemento atomizado en la llama.

3. Resultados

3.1 Experimento I

Estudio para investigar la captación de metales por parte del “molusco artificial” bajo diferentes concentraciones

En este estudio pudo observarse que a mayor concentración de sales y a mayor tiempo de exposición, la captación de metales por parte del AM es mayor.

También se observa que la afinidad del AM por los metales varía.

Los resultados de esta etapa son presentados a continuación.

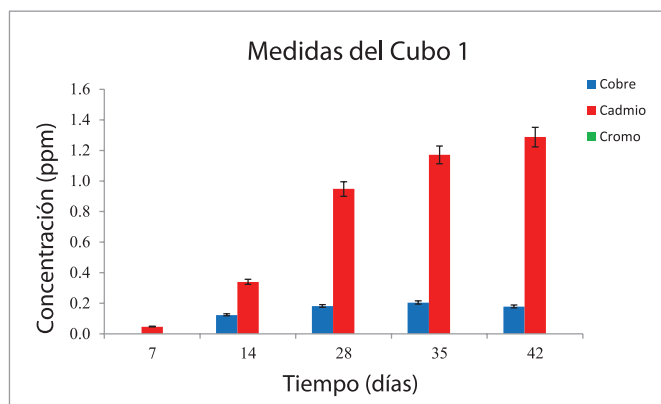


Figura 1. Captación de cobre, cadmio y cromo por parte de los AM en función del tiempo. Cubo 1 ($T=25.3\text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH}=6.04$, salinidad=30 psu).

La figura 1 muestra la concentración de Cu, Cd, Cr, acumulada en el AM, expuesto a distintas concentraciones del metal durante un período de 42 días en el cubo 1. Puede observarse que la captación de cobre se va incrementando a medida que aumenta el tiempo de exposición, alcanzando su máxima captación en el día 42; en cuanto al cadmio, se mantienen muy próximas y en cuanto al cromo no hay medición.

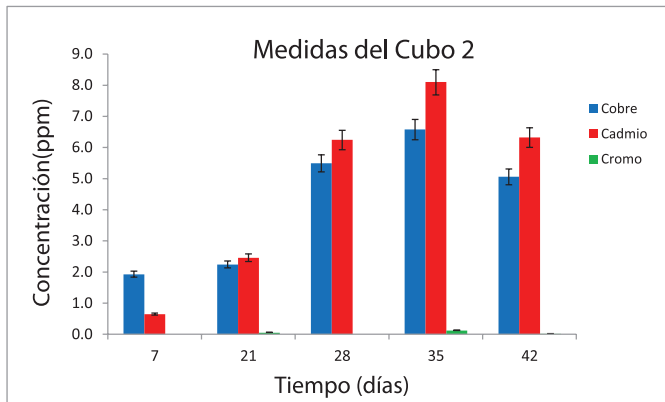


Figura 2. Captación de cobre, cadmio y cromo por parte de los AM en función del tiempo. Cubo 2 (T=25.4 °C, pH=6.55, salinidad=30 psu).

La figura 2 muestra la concentración de Cu, Cd, Cr, acumulada en el AM, expuesto a distintas concentraciones del metal durante un periodo de 42 días en el cubo 2. Puede observarse que la concentración de Cu acumulada en el AM durante el monitoreo alcanzó su máximo en el día 35 y luego disminuye. El Cd acumulado alcanza su máximo el día 35 y luego disminuye en el día 42. La captación de Cr no hay valores.

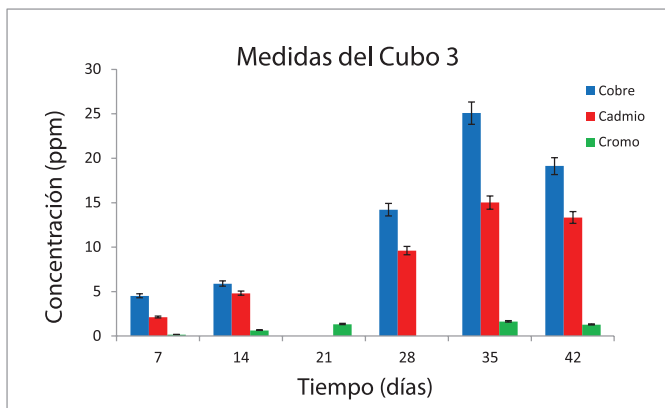


Figura 3. Captación de cobre, cadmio y cromo por parte de los AM en función del tiempo. Cubo 3 (T=25.2 °C, pH=5.54, salinidad=40 psu).

La figura 3 muestra la concentración de Cu, Cd, Cr, acumulada en el AM, expuesto a distintas concentraciones del metal durante un periodo de 42 días en el cubo 3. Se observa que la concentración de Cu acumulada en el AM durante el monitoreo se incrementa y alcanzó su máximo en el día 35 y luego disminuye. La concentración de cadmio, se incrementa y alcanza su máximo el día 35 y

luego disminuye en el día 42. En la captación de Cr se observan valores muy bajos y próximos.

3.2 Experimento II

Estudio para evaluar el efecto a corto plazo de la variación en la concentración de metales sobre la acumulación de metales por los *Artificial mussels* (AM).

Los resultados para la evaluación del efecto a corto plazo en la variación de la concentración son presentados a continuación. Cubos 4a/4b y 5a/5b.

La figura 4 muestra la concentración de Cu, Cd, Cr, acumulada en el AM durante el monitoreo en los cubos 4a/4b. Puede apreciarse que la afinidad del AM es mayor hacia el Cu, seguida por el Cd, siendo el Cr el que presenta la menor afinidad de todos los metales en estudio. Ambos metales alcanzan su máxima captación el día 20; sin embargo, al ser evaluado el comportamiento del Cr, puede observarse que su máxima captación fue durante la primera semana de exposición en el tanque 4a, decreciendo su concentración a medida que se iba desarrollando el experimento.

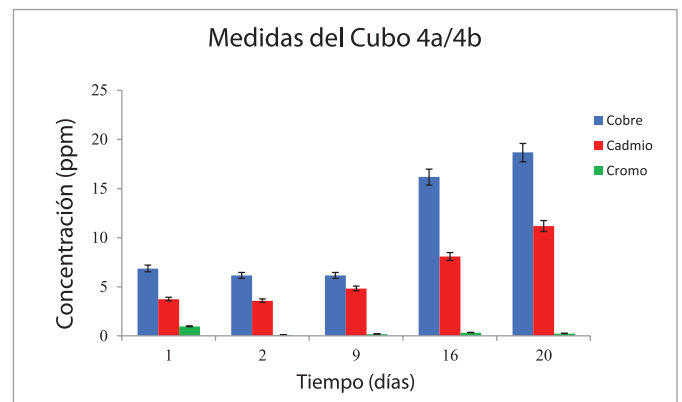


Figura 4. Captación de cobre, cadmio y cromo por parte de los AM en función del tiempo. Cubos 4a (T=25.1 °C, pH=6.42, salinidad=25 psu), 4b (T=25.2 °C, pH=5.37, salinidad=30 psu).

La figura 5 muestra la concentración de Cu, Cd, Cr, acumulada en el AM, expuesto a distintas concentraciones del metal durante un periodo de 23 días en los cubos 5a/5b. Puede observarse que la concentración de Cu acumulada en el AM durante el monitoreo va incrementándose en el tiempo y alcanzando su máximo nivel de captación en el día 20, para posteriormente disminuir hacia el día 23. En cuanto a la captación de Cd por parte del AM, puede apreciarse un aumento gradual de ésta a medida que transcurría el experimento, encontrándose también un

máximo en el día 20 y manteniendo esta concentración hasta el día 23. Por otro lado, de todos los elementos bajo estudio, el Cr fue el que se adhirió en menor proporción al AM, manteniendo sus niveles a bajas concentraciones y contantes a lo largo de los 23 días de experimentación.

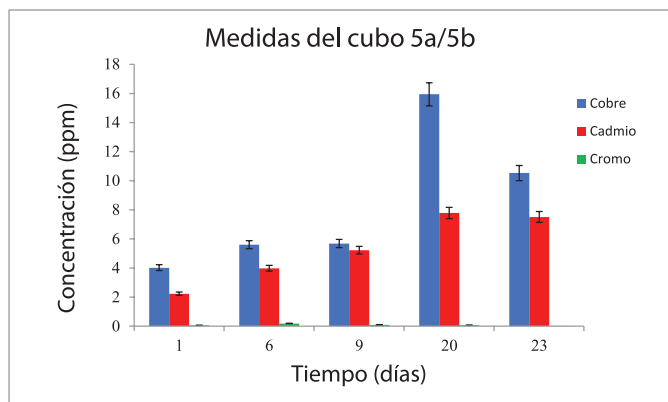


Figura 5. Captación de cobre, cadmio y cromo por parte de los AM en función del tiempo. Cubos 5a (T=25.2 °C, pH=6.33, salinidad=30 psu), 5b (T=25.2 °C, pH=5.44, salinidad=20 psu).

4. Discusión

Debido a la gran relevancia que tiene para Panamá el Humedal de Importancia Internacional Golfo de Montijo, inscrito en la red mundial de Humedales del Convenio RAMSAR en noviembre de 1990, y declarado área protegida en 1994 por la legislación panameña (ANAM, 2014), por la gran diversidad biológica que alberga; a pesar de esto, no escapa a la presión ejercida por la creciente explosión demográfica y el aumento de las necesidades básicas, que a su vez han llevado a un aumento en las actividades humanas realizadas para la supervivencia a su alrededor. Actividades antropogénicas como la agricultura, curtiembre y pesquerías (por el uso de combustibles fósiles) llevadas a cabo en las inmediaciones del Sitio RAMSAR-Golfo de Montijo, pueden aportar metales pesados al cuerpo de agua, ya sea de forma directa o indirecta a través de la escorrentía (Elkady, Sweet, Wade, & Klein, 2015).

Para poder determinar los criterios de conservación, protección y manejo de este humedal costero, al igual que de otros cuerpos de agua, se hace necesario conocer los principales agentes de impacto ambiental (Entre estos, los metales pesados) en este ecosistema, mediante el monitoreo periódico del área bajo observación, y la selección de matrices analíticas o dispositivos (*Artificial*

mussel) que permitan realizar un análisis confiable de la situación del sitio en cuestión. Para este efecto, en este estudio se seleccionó el uso del *Artificial mussel*, como dispositivo para el monitoreo de metales pesados; sin embargo, esta técnica de muestreo y análisis exigió una serie de pruebas de validación en el laboratorio, bajo condiciones controladas de pH, salinidad y temperatura, previas a su utilización en campo, las cuales serán expuestas en el presente trabajo.

Estudios similares de validación sobre *Artificial mussels* realizados por Wu et al., 2007, muestran un incremento en los niveles de Cd, Cu y Cr durante un periodo de exposición de 14 días; encontrándose un orden de afinidad $Cd > Cu > Cr$, independientemente de la salinidad y temperatura. Al observarse las figuras 1 y 2, se aprecia la misma afinidad por parte del AM reportada por Wu et al., 2007. Sin embargo, los resultados obtenidos, muestran que a mayor tiempo de exposición y a mayor salinidad la afinidad por los metales varía, encontrándose que el AM presenta una mayor afinidad por el Cu que por el Cd. La figura 3, muestra que a una salinidad de 40 psu la mayor afinidad es por el cobre, apreciándose su máxima unión a los 35 días de exposición. A este nivel de salinidad, se observa por primera vez la presencia de Cr, según los hallazgos de Wu et al., 2007, la captura tanto de Cr como de Cu es afectada significativamente por este parámetro.

Al comparar las figuras 1, 2 y 3, se observa que la afinidad del AM por ciertos metales, cambia al aumentar la salinidad. La captación de estos metales se hace más eficiente a los 35 días de exposición y al cambiar la salinidad la mayor afinidad del dispositivo es hacia el Cu.

El AM, brinda información complementaria sobre la disponibilidad de los metales disueltos en el medio acuático (Degger et al., 2011), ya que su componente principal la resina Chelex® 100 (Resina de intercambio catiónico), empleada para su fabricación, actúa como grupo quelante en la unión de iones metálicos polivalentes (Herrin et al., 2001), alcanzando su equilibrio entre 30-40 días de exposición al medio. Puede decirse además, que los resultados aquí expuestos (Los cuales van en un rango de 35 a 42 días) guardan relación en cierta manera con estudios realizados previamente.

La figura 4 muestra la evaluación de la variación de la concentración de los metales (captación) a corto plazo, en los cubos 4a/4b. Se aprecia una creciente captación

de Cu, seguida de Cd a partir del día 9, encontrándose un máximo para el día 20 para ambos metales, y con diferencias en concentración entre estos. No hubo diferencias estadísticamente significativas, en cuanto a la captación de Cu, durante los días 1, 2 y 9, y para el Cd los días 1 y 2. En cuanto al Cr, el nivel de captación se mantuvo bajo, disminuyendo levemente del día 1 al 2 y manteniéndose constante hasta el día 20.

De acuerdo con los fabricantes (Bio-Rad, 1994) el orden de selectividad de la resina Chelex® 100 (componente importante del AM) para cationes en soluciones de nitrato o de cloruro es aproximadamente el siguiente $\text{Cu}^{+2} \gg \text{Pd}^{+2} > \text{Cr}^{+3} > \text{Zn}^{+2} > \text{Cd}^{+2}$; no obstante, los resultados obtenidos demuestran una mayor afinidad hacia el Cu, seguido de Cd y finalmente hacia el Cr, discrepando ligeramente de los reportados por Bio-Rad. Se pudo comprobar que el AM tiene una fuerte afinidad hacia el Cu y no hacia el Cd, como aparece reportado en la literatura.

En la figura 5 (Cubos 5a/5b) se observa un comportamiento bastante parecido a los hallados en los cubos 4a/4b, presentándose la máxima captación para el Cu el día 20 de exposición, para luego descender el día 23. El Cd presenta un incremento a partir del día 6 de exposición a este metal, siendo su punto máximo de captación el día 20 y permaneciendo sin mayores cambios hasta el día 23 del experimento.

Comparando los experimentos llevados a cabo durante la exposición a los metales por parte del AM, en los cubos 4a/4b y 5a/5b, podría decirse que, éste presenta su máximo punto de captación para los metales Cu y Cd el día 20 para ambos ensayos, con concentraciones notoriamente más bajas de Cr. El AM es capaz de captar estos metales de una forma rápida y eficiente aún en salinidades de 20-30 psu.

5. Conclusiones

Del presente trabajo puede concluirse:

- Los estudios de validación realizados indican que los AM pueden ser implementados como herramienta complementaria en los estudios de contaminación por metales pesados en ambientes acuáticos, debido a que son unos dispositivos para el monitoreo de metales *in situ* de bajo costo, que permiten la reproducibilidad de los datos.
- El AM presentó una unión más fuerte hacia Cd que a los otros dos metales a salinidades de 30 psu. Sin embargo,

a una salinidad de 40 psu, el comportamiento varía y la afinidad es mayor hacia el Cu.

- Para la mayor parte de los metales estudiados, los AMs presentaron un punto máximo de captación a los 35 días de exposición.
- Es importante destacar que, la captura del metal durante el estudio para investigar la captación de metales por parte del AM bajo diferentes concentraciones, se presentó el siguiente orden de selectividad: $\text{Cd}^{+2} \gg \text{Cu}^{+2}$ a salinidades bajas y $\text{Cu}^{+2} \gg \text{Cd}^{+2}$ a mayor salinidad. Encontrándose Cr^{+3} solamente en el cubo 3, el cual tenía mayores concentraciones de metales.
- Durante el estudio para evaluar el efecto a corto plazo de la variación en la concentración de metales sobre la acumulación de metales por los AM, las concentraciones en los AM expuestos en los tanques 4a y 4b, 5a y 5b presentaron el siguiente orden de selectividad: $\text{Cu}^{+2} \gg \text{Cd}^{+2} \gg \text{Cr}^{+3}$, encontrándose además un máximo de captación el día 20.

6. Recomendaciones

Con base en las experiencias obtenidas y la información bibliográfica compilada, recomendamos el uso del dispositivo AM para el monitoreo de metales pesados en ambientes acuáticos, en un periodo no menor de los 35 días de exposición, ya que, es en este momento que el dispositivo alcanza su nivel máximo de captación.

En cuanto a estudios de corto plazo que se tengan a bien realizar, es recomendable monitorear en un periodo no menor a los 20 días de exposición.

7. Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Cecilio Hernández, Jefe del Laboratorio de Análisis Industrial y Ciencias Ambientales (LABAICA) del Centro Experimental de Ingeniería (CEI), de la Universidad Tecnológica de Panamá, así como a su personal técnico y científico, por todo el apoyo brindado para la realización del presente estudio.

8. Referencias

- [1] A. Tayeb, M. R. Chellali, A. Hamore and S. Debbah, "Impact of urban and industrial effluents on coastal marine environment in Oran, Algeria", *Marine Pollution Bulletin*, Article in Press, 2015.
- [2] R. S. S. Wu and T. C. Lau, "Polymer-ligands: a novel chemical devise for monitoring heavy metals in the aquatic environment", *Marine Pollution Bulletin*, vol32, pp. 391-396, May. 1996.

- [3] N. Degger, V. Wepener, B. J. Richardson and R. S. S. Wu, "Application of artificial mussel (AMs) under South African marine conditions: A validation study", *Marine Pollution Bulletin*, vol63, pp. 108-118, 2011.
- [4] ANAM, "Humedal de Importancia Internacional Golfo de Montijo", [En línea], <http://www.anam.gob.pa/index.php/content-component/parque-internacional-la-amistad/89-parques-nacionales/256-humedal-de-importancia-internacional-golfo-de-montijo> [Consulta: 21 abril 2014].
- [5] A. El Kady, S. T. Sweet, T. L. Wade, A. G. Kleen, "Distribution and assessment of heavy metal in the aquatic environment of Lable Manzala, Egypt", *Ecological Indicators*, vol58, pp 445-457, Nov. 2015.
- [6] R. S. S. Wu, T. C. Lau, W. K. M. Fung, P. H. Ko, K. M. Y. Leung, An 'artificial mussel' for monitoring heavy metals in marine environment. *Environmental Pollution Bulletin*, vol145:1, pp. 104-110, 2007.
- [7] Bio-Rad, "Guide to Ion Exchange. BioRad, Hercules, CA. 1994.
- [8] R. T. Herrin, A. W. Andren, D. E. Armstrong, "Determination of silver speciation in natural waters. I. Laboratory tests of Chelex-100 chelating resin as competing ligand", *Environmental Science and Technology*, vol 35, pp. 1953-1958, 2001.