



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**PROYECTO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**“Caracterización molecular de las accesiones de achiote (*Bixa orellana* L.) de la colección de la Estación Experimental Tropical Pichilingue INIAP”**

**Elaborado por:**  
**VÉLEZ DE LA CRUZ, MARÍA BELÉN**

**Directora Tesis:**  
**SEGOVIA SALCEDO, MARÍA CLAUDIA Ph. D**

**SANGOLQUÍ, 29 DE AGOSTO DE 2023**





## 1. Introducción



## 2. Objetivos e Hipótesis



## 3. Materiales y Métodos



## 4. Resultados y Discusión



## 5. Conclusiones y Recomendaciones



# Achiote (*Bixa orellana* L.)



## Introducción



<https://www.pinterest.com/Etesban/achiote/>



[https://www.bbc.co.uk/spanish/specials/1330\\_amazon/page3.shtml](https://www.bbc.co.uk/spanish/specials/1330_amazon/page3.shtml)



Planta hermafrodita alógama  
(2-10 m)

Familia Bixaceae  
Género: *Bixa*  
Especie: *Bixa orellana* L.

Originaria de la Amazonía de  
Brasil

Crece y se desarrolla en climas  
cálidos-húmedos, semicálidos  
y templados

Florece en estaciones  
húmedas o invernales: 3-4  
meses

Produce varios frutos en  
racimo: 20-55 semillas



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



<https://www.eluniverso.com/noticias/2019/07/21/nota/7434564/mu-o-achiote-su-uso-ancestral-tsachilas/>



<https://www.eldiario.ec/noticias-manabi-ecuador/500693-los-tsachilas-destacan-el-achiote/>



<https://blogs.unitec.mx/vida-universitaria/el-achiote-a-que-sabe-y-como-se-usa/>

**APLICACIONES:** condimento, colorante para textiles, cosméticos o pinturas

Pueblos nativos de Perú: Asheninka, Awajún, Caral; Ecuador: Tsáchilas, Waorani, Sarayaku; Colombia: Guambianos; Brasil: Arikapu, Kokama

Hojas y raíces útiles para aliviar diferentes tipos de malestares e inflamaciones

Toda la planta está compuesta por carotenoides, apocarotenoides, terpenos, terpenoides, esteroides y compuestos alifáticos

Área biotecnológica: gran impacto en investigaciones nuevas, novedosas e innovadoras para tratar diferentes enfermedades.

A nivel nacional, la planta solo sirve para industrias de producción de aceite de achiote





## DIVERSIDAD GENÉTICA

¡Componente vital de la diversidad que debe ser conservado!

Diferencia existente en el material hereditario entre organismos y abarca toda la variabilidad que ocurre entre genotipos

Control de erosión genética: estudios de diversidad genética y la creación de cultivares con mayor potencial

## VARIABILIDAD GENÉTICA

Variación de alelos de los genes y se expresa de formas diferentes en el fenotipo

Preservación de la variabilidad genética: bancos de germoplasma





## MARCADORES MOLECULARES

Gen o secuencia de ADN de tamaño o peso molecular conocido

Relacionan un gen en particular que contiene variaciones, con el fin de revelar polimorfismos a nivel de ADN

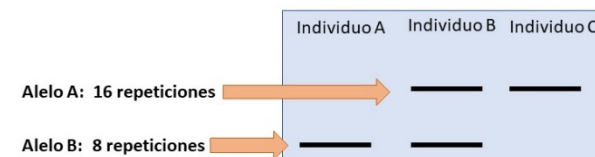
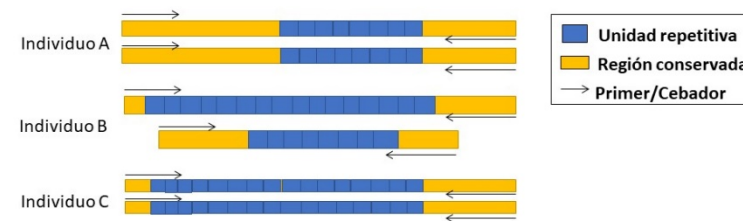
### SSR

Marcador molecular codominante y son repeticiones de secuencia simple

### VENTAJAS

Fácilmente detectables mediante PCR

Se pueden diseñar primers específicos para producir resultados altamente reproducibles



<http://dgcystoseira.blogspot.com/2017/10/diversidad-genetica-concepto-estimacion.html>





## Genotipaje

Técnica mediante la cual se pueden detectar variaciones de ADN entre individuos de la misma especie

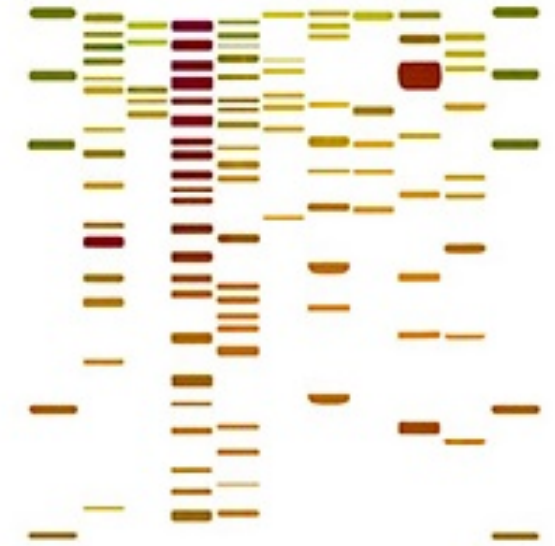
Revelan alelos específicos heredados por el individuo

Ayuda a identificar características genéticas de un organismo para poder diferenciarlo de otros individuos de la misma especie

## Con marcadores genéticos

Primer marcado con fluorescencia (M-13): se acopla a la cola complementaria (5') de los primers SSR forward para que se ejecute la hibridación

## M13-tailing



<https://www.biogenetixlab.com/genotipado-adn>

Desarrollo de una planificación correcta e integral de conservación, así como al conocimiento sobre la riqueza de la planta.





## *Objetivo general*

Caracterizar molecularmente 191 accesiones de Achiote (*Bixa orellana* L.) de la colección de la Estación Experimental Tropical Pichilingue INIAP.







## *Objetivos específicos*

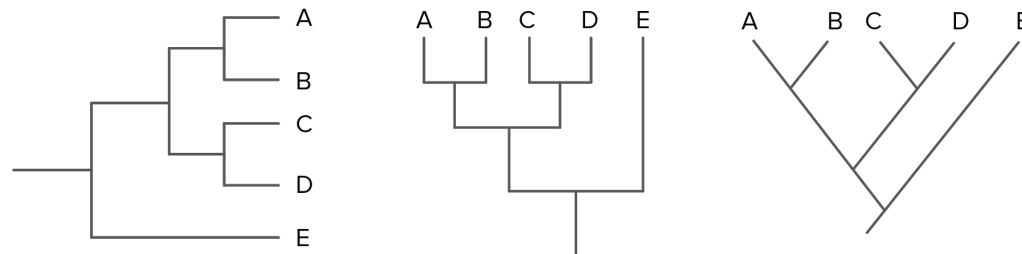
- Genotipar 191 accesiones de achiote (*Bixa orellana* L.) mediante la tecnología SSR-M13 *tailing*.
- Realizar un análisis de diversidad y estructura genética del material en estudio.
- Determinar la relación genética y el parentesco de los individuos de la colección del banco de germoplasma de la Estación Experimental Tropical Pichilingue INIAP mediante un árbol filogenético.





La colección de *Bixa orellana* L. del banco de germoplasma de la Estación Experimental Tropical

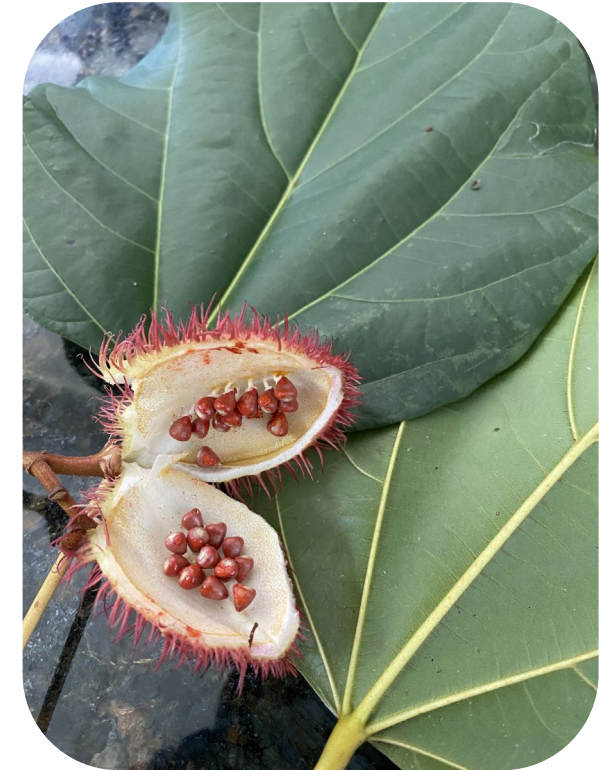
Pichilingue INIAP presenta diversidad genética suficiente para estructurar los taxones en clados.

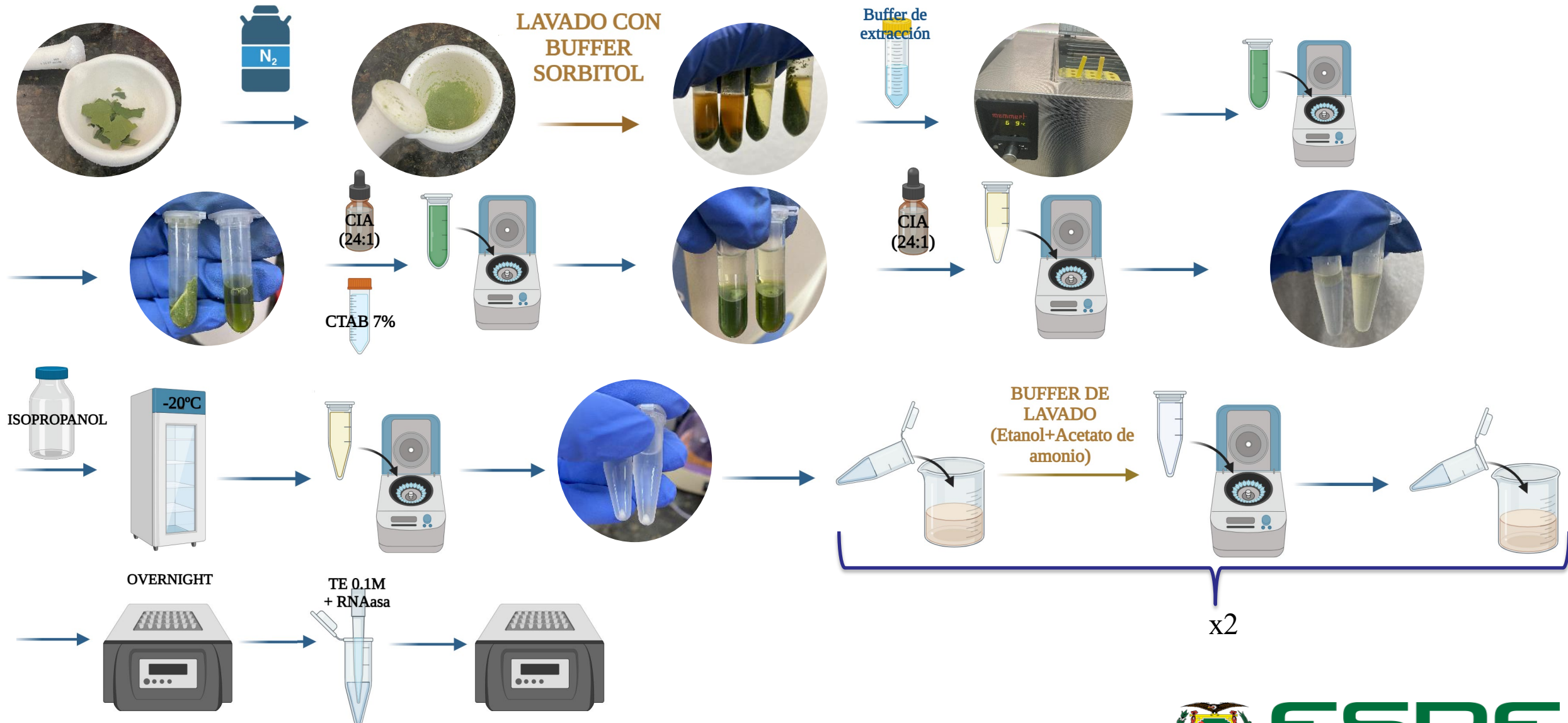




## Fase de campo

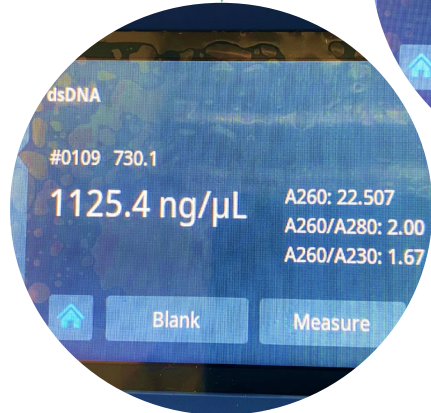
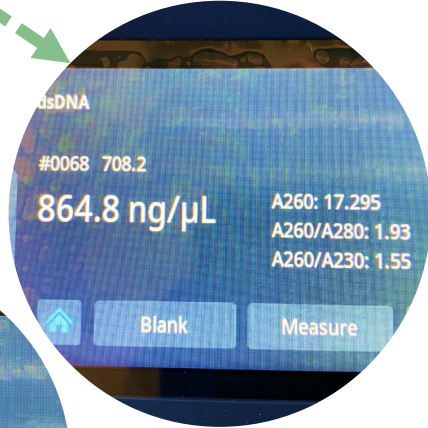
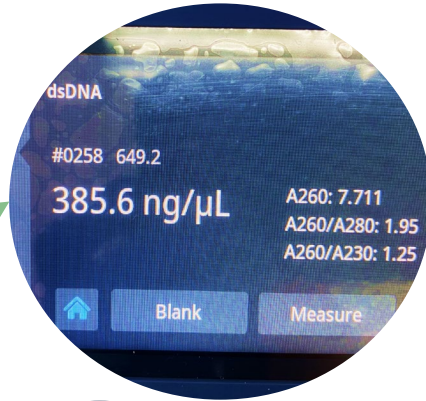
Recolección de muestras







## Cuantificación ADN



## Validación SSR y prueba de amplificación de ADN

**Tabla 1**

*Microsatélites (SSRs) utilizados para amplificación y genotipaje de Bixa orellana L.*

SSRs	Repeat motif	Primer sequence (5'-3')	Ta (°C)	Allele size (bp)
BorA2	(AC) <sub>7</sub>	F: CGAGGGGATGTGAAATTAGG R: CTGTTAGGGGACATTTTCATTG	65-55	228
BorB4	(GA) <sub>16</sub>	F: GCATCATCTCTGTGGGATCA R: ACGAGAAAATGAACGAGCTG	60-50	218
BorB10	(AG) <sub>14</sub>	F: CATGCCTCCTCTCGATCTCT R: ATCATTTCCTTGCCCAACTG	56	178
BorB12	(TG) <sub>14</sub> (AG) <sub>19</sub>	F: CACATGCCCTTTGATGGTTA R: TCATGTTCCGATCCTATGTGA	56	172
<b>BorC12</b>	(CAT) <sub>4</sub>	F: GAGATTGTCGTGCATGGGTA R: AGGAGGAAGGAAAGGAGGTG	60-50	194
BorF1	(TG) <sub>6</sub> (CT) <sub>17</sub>	F: CGTTCGTCCTGAAAATCTG R: CATTTCAGTGCAGGAC	60-50	154
BorF9	(TATT) <sub>3</sub>	F: TCAACACACCACCACAATGA R: AGCTATGCCAGAAAAAGGA	55-45	122
BorG4	(CA) <sub>16</sub>	F: TCCCTTTGTTTTCCATTGCT R: TATCCACCAGCAACATTGAC	55-45	209
BorG3	(GT) <sub>7</sub>	F: GTGTCACCACAGAACACAA R: TGTTTCCAAGAAGCTAATGCAG	60-50	175

Nota. Datos recuperados del estudio realizado por Dequigiovanni et al., (2014)





## Prueba múltiple para genotipaje

**Tabla 2**

Master mix MONOPLEX de amplificación PCR con M13-tailing

REACTIVOS	VOLUMEN 1 RX ( $\mu\text{L}$ )
Agua ultrapura	0.32
Buffer PCR colorless (X)	1.00
MgCl <sub>2</sub> (mM)	0.50
dNTP's (mM)	0.20
M13 700/800	0.80
Primer Forward ( $\mu\text{M}$ )	0.05
Primer Reverse ( $\mu\text{M}$ )	0.08
Taq Polymerase (U/uL)	0.05
Muestra ADN (ng/ $\mu\text{L}$ )	2.00
Volumen total	5 $\mu\text{L}$

**Tabla 3**

Combinaciones dúplex para genotipaje

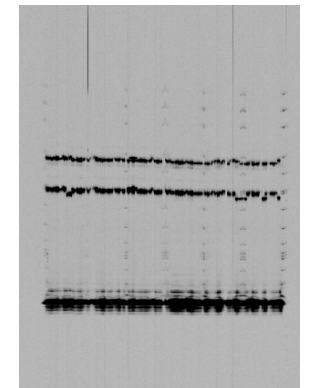
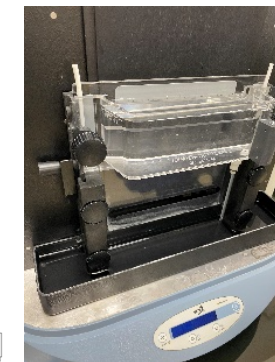
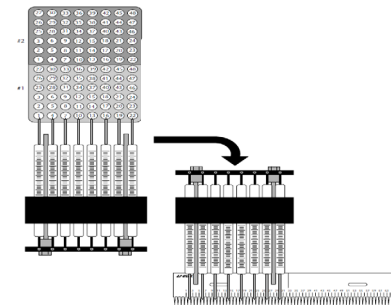
Combinaciones	SSRs	Allele size (bp)
DÚPLEX 1	BorA2	228
	BorB10	178
DÚPLEX 2	BorB4	218
	BorB12	172
DÚPLEX 3	BorC12	194
	BorF9	122
DÚPLEX 4	BorF1	154
	BorG4	209

## Genotipaje de las muestras en LI-COR 4300S Biosciences®

**Tabla 4**

Master mix DÚPLEX de amplificación PCR con M13-tailing

REACTIVOS	VOLUMEN 1 RX ( $\mu\text{L}$ )
Agua ultrapura	0.32
Buffer PCR colorless (X)	1.00
MgCl <sub>2</sub> (mM)	0.50
dNTP's (mM)	0.20
M13 700/800	0.80
Primer Forward 1 ( $\mu\text{M}$ )	0.05
Primer Reverse 1 ( $\mu\text{M}$ )	0.08
Primer Forward 2 ( $\mu\text{M}$ )	0.05
Primer Reverse 2 ( $\mu\text{M}$ )	0.08
Taq Polymerase (U/uL)	0.05
Muestra ADN (ng/ $\mu\text{L}$ )	2.00
Volumen total	5 $\mu\text{L}$



**Tabla 5**

Programa de amplificación PCR con M13-tailing para prueba multiplex de microsatélites de Bixa orellana L.

ETAPA	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO
Desnaturalización inicial	94	2 min
Desnaturalización	95	4 min
Desnaturalización cíclica	95	1 min
Anillamiento	TA	2 min
Elongación	72	2 min
Elongación final	72	10 min
Estabilización	4	10 min

LI-COR Biosciences. (2008). Microsatellite Analysis Manual.





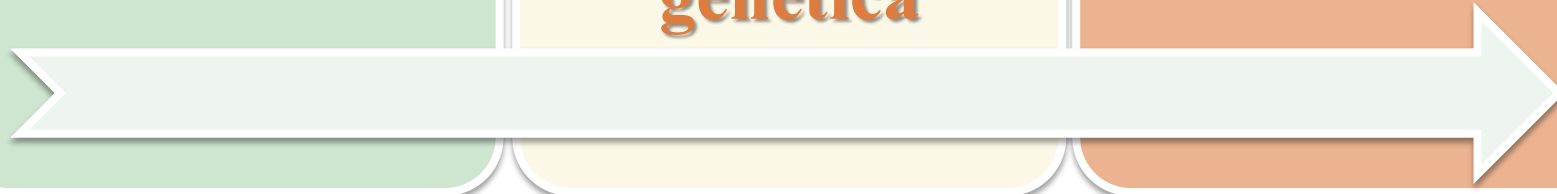
**Análisis de  
diversidad  
genética**



**Análisis de  
estructura  
genética**



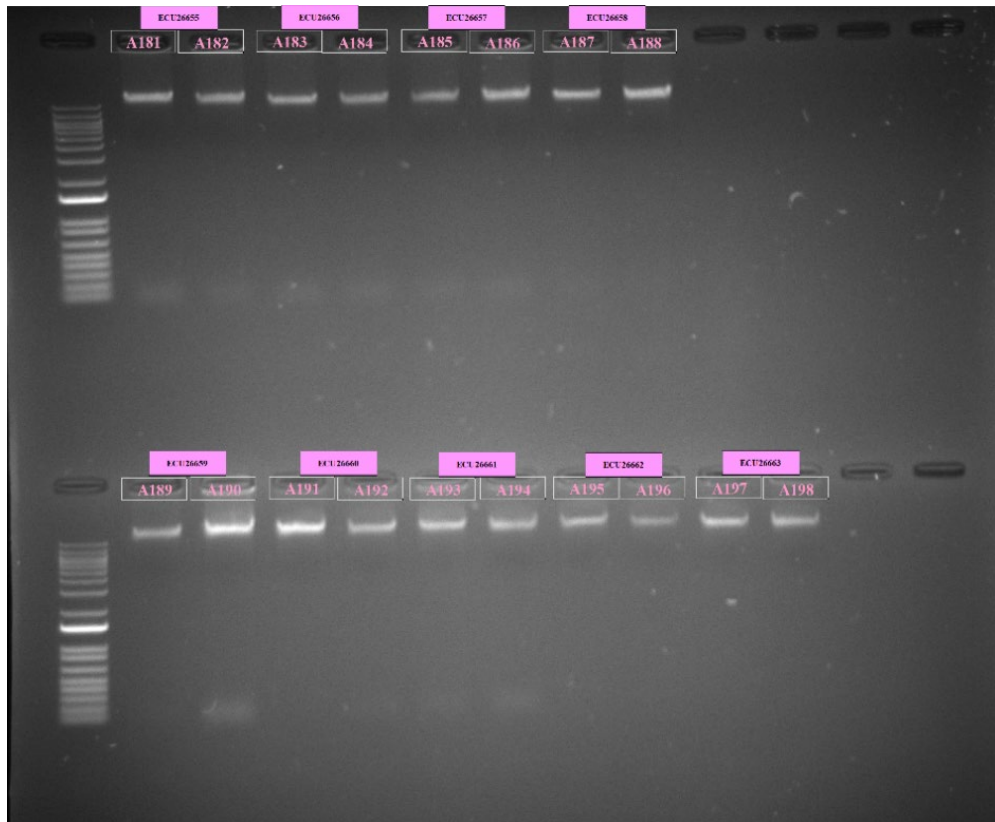
**Análisis  
Molecular de  
Varianza y  
estadísticos F**





## Extracción ADN

**Figura 1**  
Integridad de ADN extraído de muestras de achote (*B. orellana L.*)



## Cuantificación ADN

**Tabla 6**  
Concentraciones de ADN y radio de absorbancia A260/A280 de muestras de achote (*B. orellana L.*)

ID	NOMBRE ACCESIÓN	MUESTRA	CONCENTRACIÓN (ng/μL)	A260/A280
A181	ECU26655	655.1	394.691	2.04
A182		655.2	403.301	2.011
A183	ECU26656	656.1	374.91	2.023
A184		656.2	337.19	2.027
A185	ECU26657	657.1	424.255	2.01
A186		657.2	394.627	2.006
A187	ECU26658	658.1	273.291	2.062
A188		658.2	443.075	1.964
A189	ECU26659	659.1	269.52	1.932
A190		659.2	839.205	1.99
A191	ECU26660	660.2	441.212	1.95
A192		660.3	493.743	1.969
A193	ECU26661	661.1	579.916	1.993
A194		661.2	381.209	2.003
A195	ECU26662	662.1	283.823	1.898
A196		662.2	283.043	1.882
A197	ECU26663	663.1	279.61	1.855
A198		663.2	328.019	1.913

Enfoque eficaz en la eliminación de compuestos como polifenoles y polisacáridos presentes en las hojas de la planta, tal como lo señala Jones (2020).

Así mismo, el buffer de lavado fue de alto rendimiento. Debido a que el acetato de amonio desempeña un rol esencial al precipitar las proteínas que se hallan asociadas al ADN (Tuya et al., 2016).



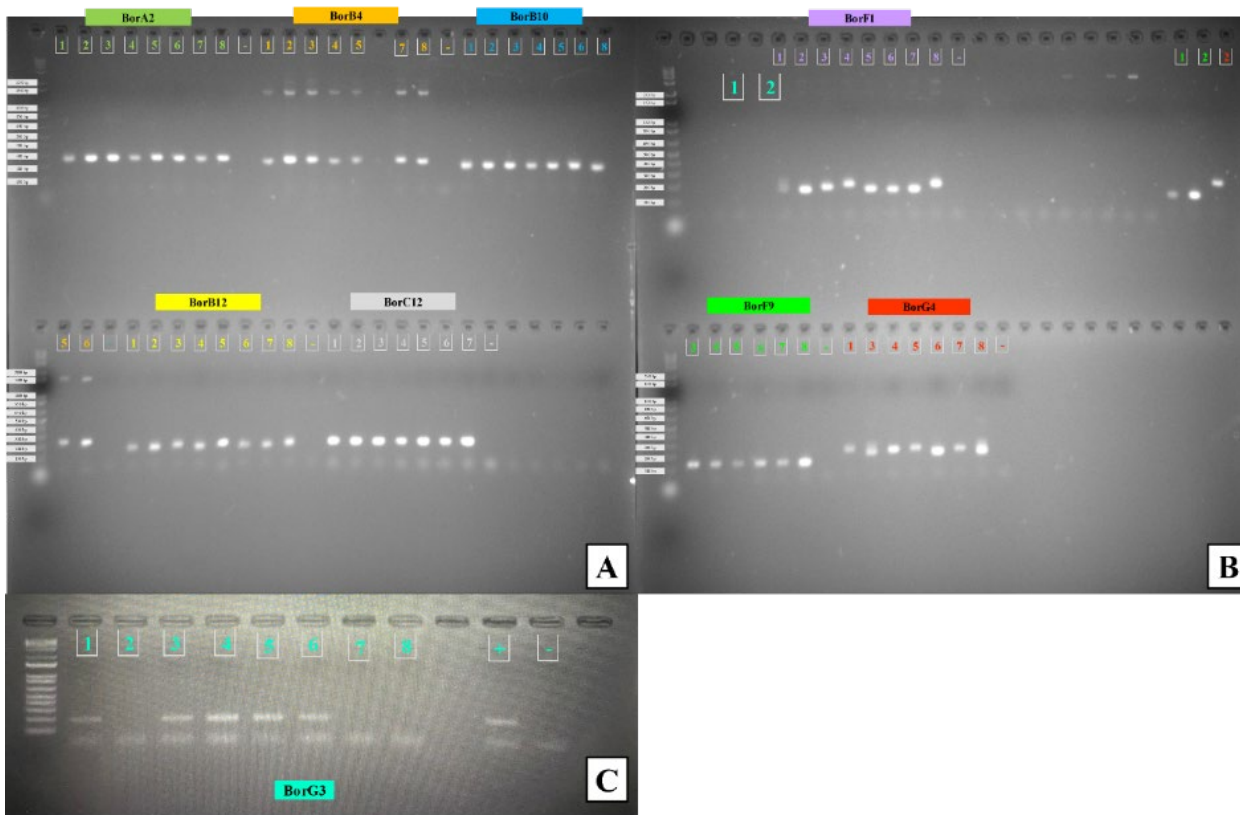




## Validación SSR y prueba de amplificación de ADN

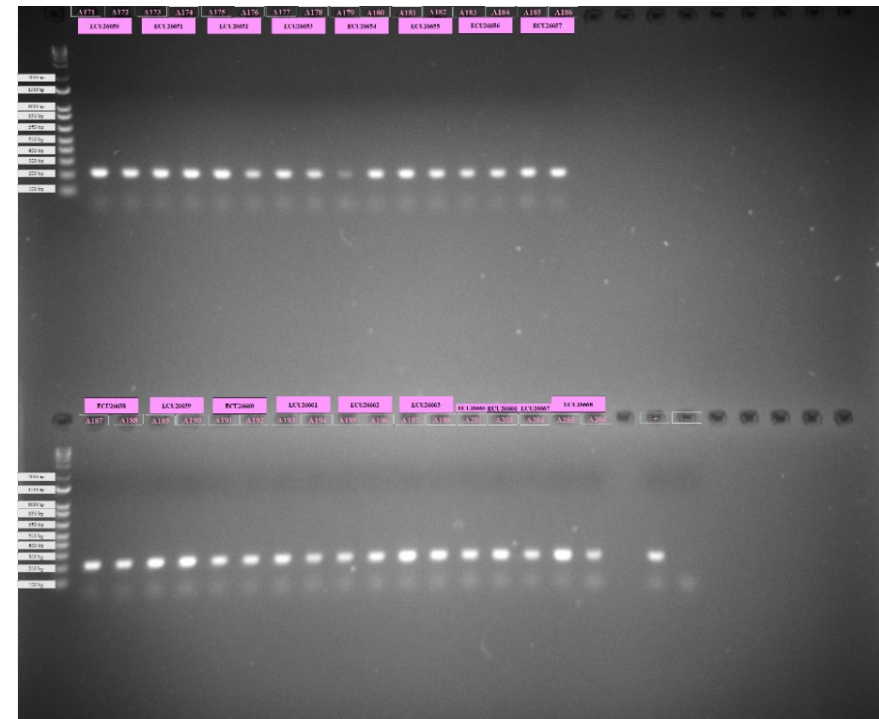
**Figura 2**

Prueba de validación de los 8 microsatélites respectivos para achote (*B. orellana* L.)



**Figura 3**

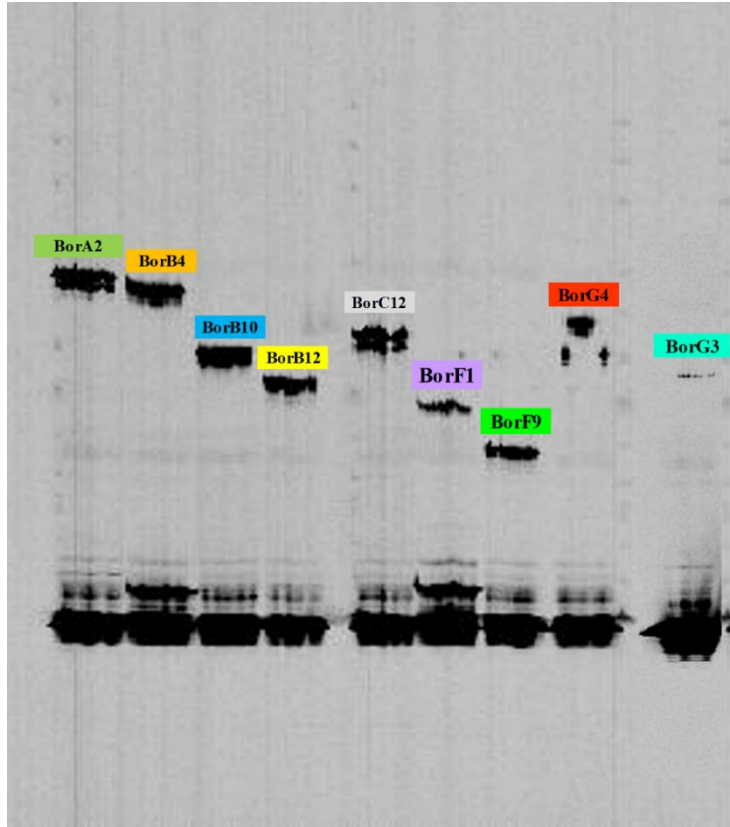
Validación de muestras de ADN de achote con SSR BorC12





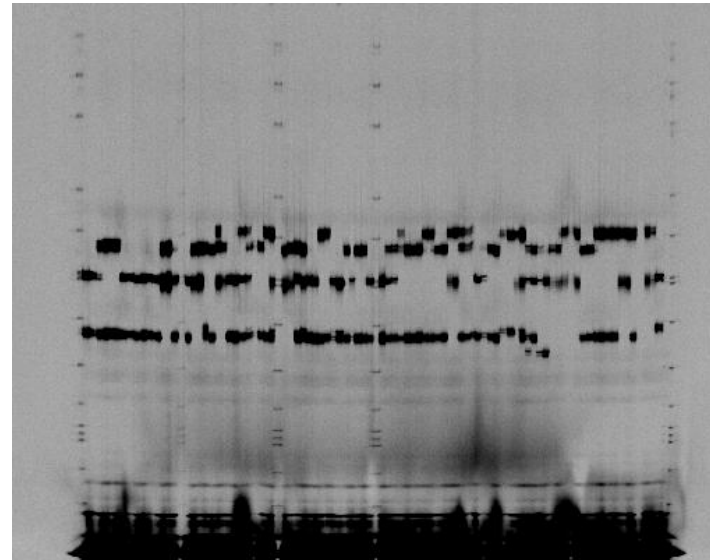
## Prueba múltiple para genotipaje

**Figura 4**  
Prueba múltiple con 8 SSR de achote en LI-COR 4300S

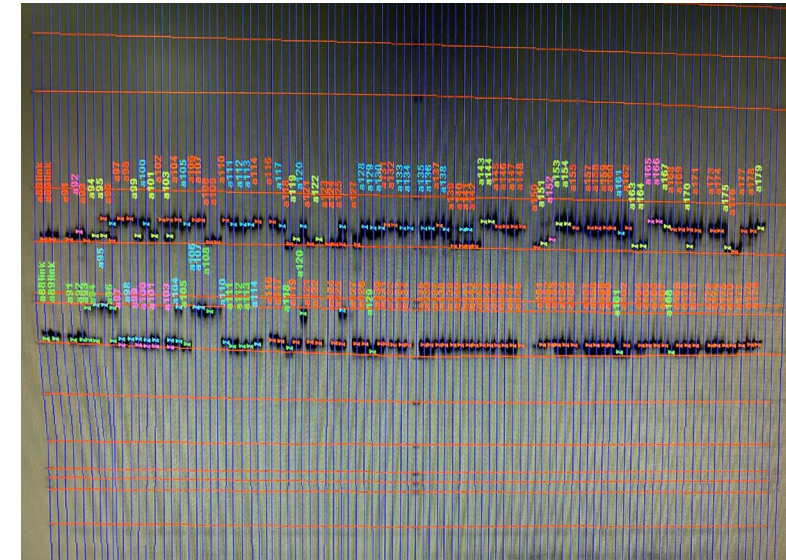


## Genotipaje de las muestras en LI-COR 4300S Biosciences®

**Figura 5**  
Gel de poliacrilamida Placa 1-dúplex 4 corrido en LI-COR 4300S



**Figura 6**  
Gel digital de muestras de achote genotipado en el software SAGA-GT





## Análisis de diversidad genética

**Tabla 7**

Análisis de diversidad genética de 371 individuos de *Bixa orellana* L.

Marcador	Mayor frecuencia alélica	No. de genotipos	No. de observaciones	No. de alelos	He	Ho	PIC
<b>BorA2</b>	0.7008	7.0000	371	5	0.4568	0.0863	0.4051
<b>BorB4</b>	0.4933	8.0000	371	5	0.6438	0.0539	0.5825
<b>BorB10</b>	0.7278	9.0000	371	5	0.4432	0.0997	0.4139
<b>BorB12</b>	0.6779	8.0000	371	4	0.4726	0.0377	0.4098
<b>BorC12</b>	0.5431	8.0000	371	4	0.5447	0.1482	0.4493
<b>BorF1</b>	0.6201	13.0000	333	6	0.5594	0.0390	0.5147
<b>BorF9</b>	0.8706	3.0000	371	3	0.2322	0.0000	0.2173
<b>BorG4</b>	0.3794	19.0000	369	7	0.7500	0.2764	0.7127
<b>BorG3</b>	0.5514	5.0000	185	5	0.5544	0.0000	0.4677
<b>Media</b>	0.6183	8.8889	345.8889	4.8889	0.5175	0.0824	0.4637

Dequigiovanni et al. (2014) en 50 accesiones de un banco de germoplasma en Brasil, con los mismos SSR, encontraron un total de **30 alelos**.

He=0.519 y Ho=0.479 para **BorG4**, He=0.422 y Ho=0.182 para **BorB4**, y He=0.674 y Ho=0.440 para **BorF1**, aunque el valor de PIC no fue calculado.

Dequigiovanni et al. (2017), en un banco de germoplasma con 63 accesiones, con los marcadores BorA2, BorB4, BorB10, BorB12, BorC12, BorF9 y BorG4, revelaron la presencia de un total de **36 alelos**.

**BorG4** de He=0.32, Ho=0.16 y PIC=0.29, y para **BorB4** de He=0.51, Ho=0.17 y PIC=0.39.

### Efecto Wahlund

Esta noción se refiere a la presencia de un exceso de homocigotos y una disminución de heterocigotos en una muestra amplia de individuos.

Lachance (2016), este fenómeno puede ser atribuido a diversas causas. Entre ellas, se destaca la **consanguinidad y el apareamiento positivo**, donde los individuos muestran preferencia por aparearse con aquellos que poseen similitudes fenotípicas y genotípicas aumentando la endogamia.





## Análisis de diversidad genética

**Tabla 8**

Datos de alelos privados por marcador encontrados en el análisis de diversidad genética de **Bixa orellana L.**

Marcador	Alelo	Freq	No. Obsv
BorA2	232	0.005	2
BorA2	214	0.010	3
BorB4	210	0.033	10
BorB4	226	0.050	15
BorB10	168	0.003	1
BorB12	172	0.060	18

**Alelos privados** adquieren una significativa trascendencia, ya que pueden denotar la existencia de distintos ecotipos dentro de una misma especie.

Gracias a que sugieren la capacidad de la planta para prosperar y adaptarse exitosamente a las condiciones específicas de dicho entorno.

En el contexto de un banco de germoplasma, es frecuente encontrar desviaciones en este equilibrio debido a diversas causas, siendo la **domesticación de la planta** una de las principales.

**Tabla 9**

Frecuencias alélicas observadas en cada marcador molecular de los 371 individuos de **Bixa orellana L.**

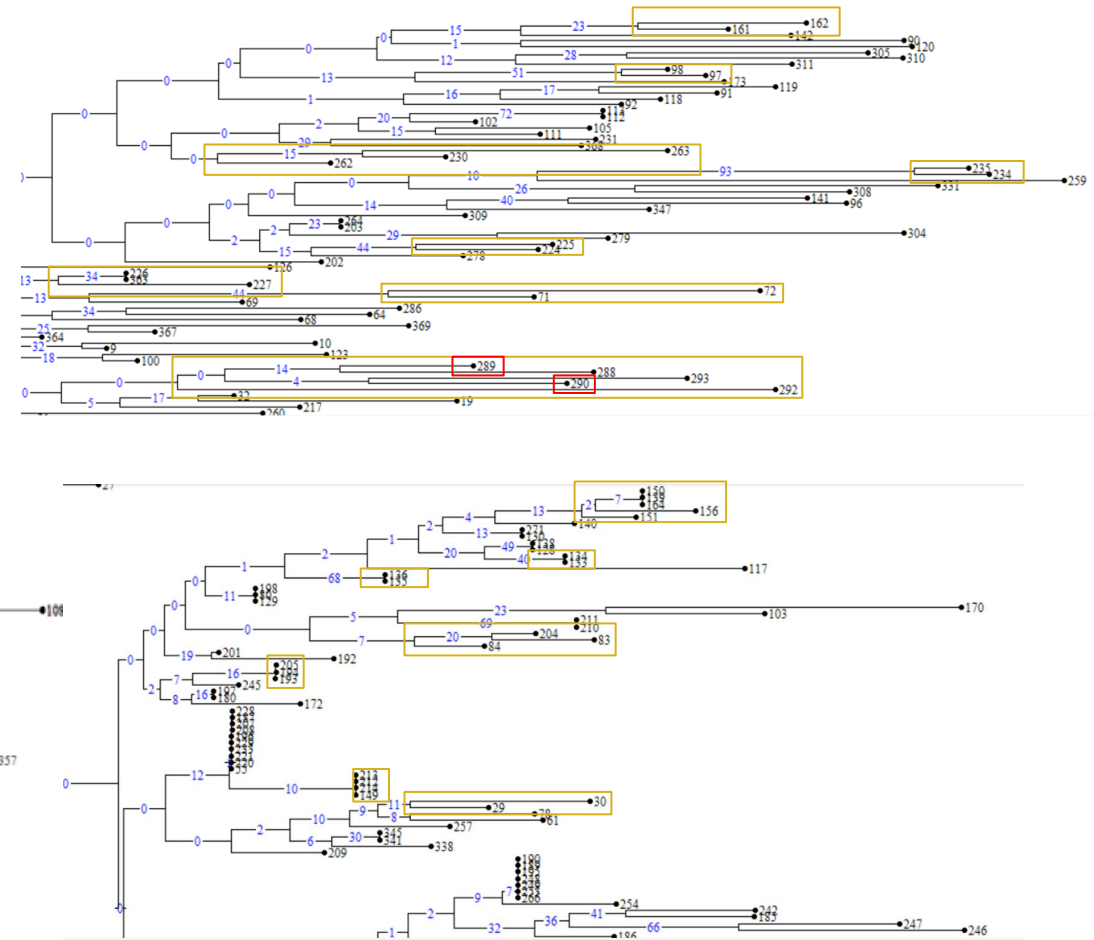
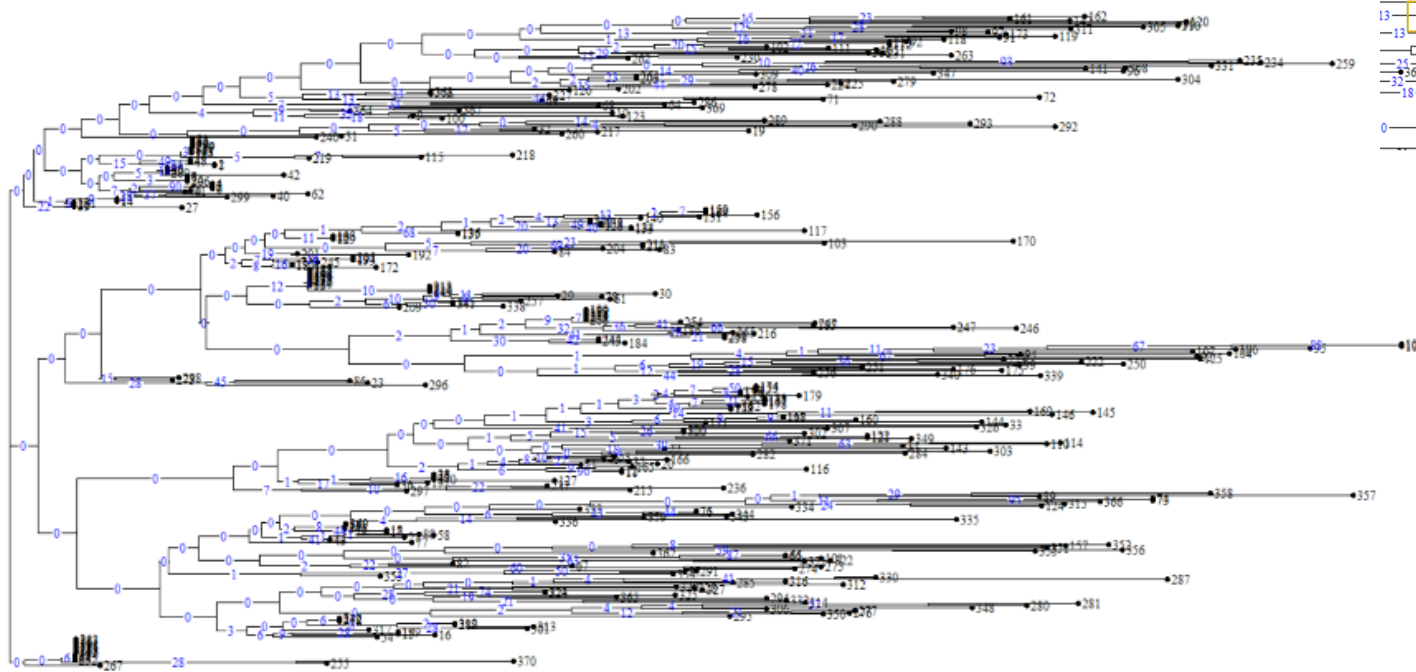
Marcador	Alelo	Freq.		
			168	0.003
			174	0.248
			180	1.420
			184	0.219
			188	0.110
			158	1.378
			162	0.486
			172	0.060
			180	0.077
			176	0.085
			179	0.028
			191	0.775
			194	1.112
			138	0.024
			148	1.202
			152	0.290
			154	0.403
			162	0.017
			164	0.064
			181	0.061
			183	0.340
			187	0.064
			201	0.222
			205	0.831
			209	0.020
			213	0.461





## Análisis de estructura genética

Figura 7  
Árbol filogenético de 371 individuos de *Bixa orellana* L





## Análisis de estructura genética

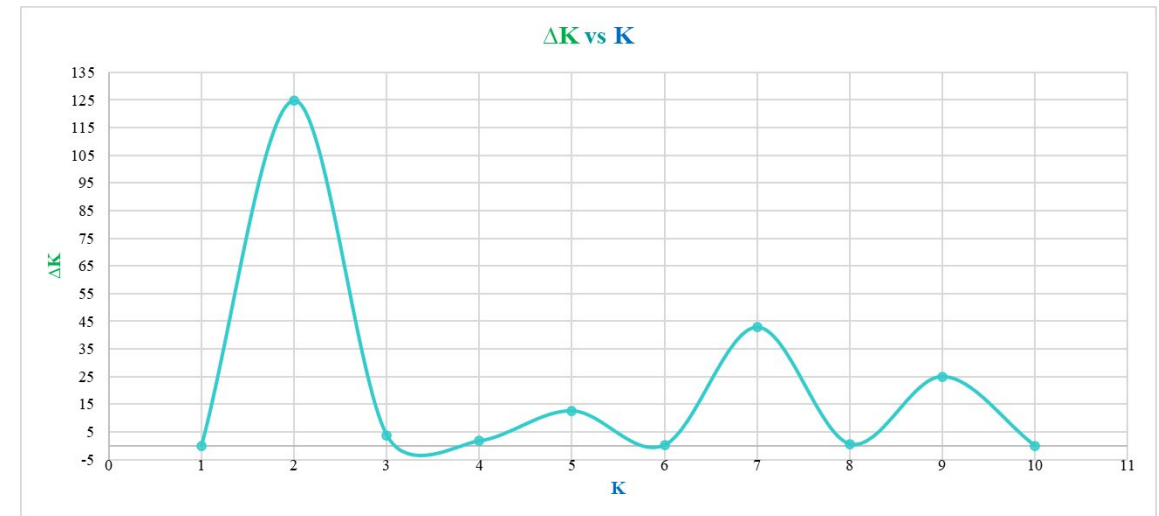
**Tabla 9**

Datos de  $K$  para asignación de poblaciones de *Bixa orellana* L.

# K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
1	10	-5647.74	0.0966	NA	NA	NA
2	10	-5089.53	1.7969	558.21	224.55	124.96231
3	10	-4755.87	8.9256	333.66	34.18	3.829424
4	10	-4456.39	59.0826	299.48	101.73	1.721827
5	10	-4258.64	3.1295	197.75	39.46	12.609038
6	10	-4100.35	1.9501	158.29	0.42	0.215377
7	10	-3942.48	1.9612	157.87	84.09	42.877274
8	10	-3868.7	41.0943	73.78	26.04	0.633665
9	10	-3768.88	2.0986	99.82	52.54	25.036085
10	10	-3721.6	23.3857	47.28	NA	NA

**Figura 8**

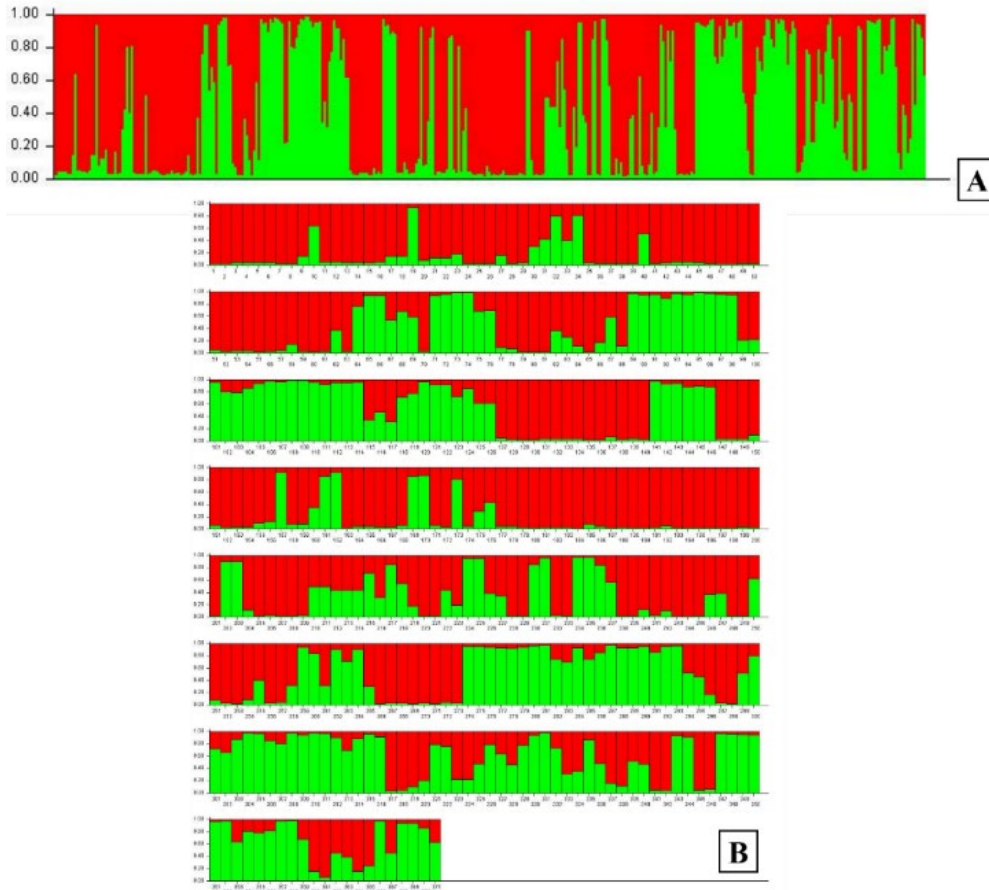
Estimación de poblaciones asignadas para los 371 individuos de *Bixa orellana* L.



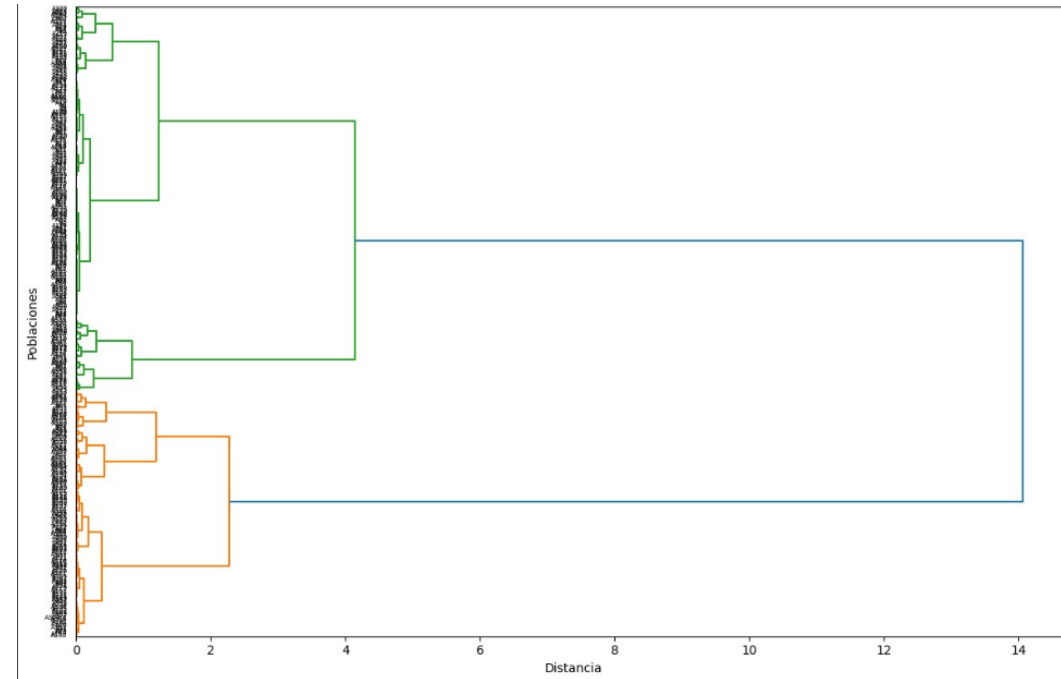


## Análisis de estructura genética

**Figura 9**  
Grupo de poblaciones asignados (K2) para los 371 individuos de *Bixa orellana* L.



**Figura 10**  
Dendrograma UPGMA de los 371 individuos de *Bixa orellana* L.



Dequigiovanni et al., (2018) que ya ha trabajado con distintas muestras de *Bixa orellana* L. de Brasil, recalca que a pesar de que **en diferentes estudios los individuos se agrupan según su ubicación geográfica, hay otras investigaciones en las que no se encuentra correlación entre las distancias geográficas y genéticas.**



## Análisis de estructura genética

**Tabla 10**

Estadísticos estimados de F-Wright para cada SSR

SSR	F <sub>ST</sub>	F <sub>IS</sub>	F <sub>IT</sub>
<b>BorA2</b>	0.032	0.809	0.815
<b>BorB4</b>	0.018	0.916	0.917
<b>BorB10</b>	0.047	0.770	0.781
<b>BorB12</b>	0.035	0.919	0.922
<b>BorC12</b>	0.024	0.725	0.732
<b>BorF1</b>	0.050	0.944	0.946
<b>BorF9</b>	0.057	1.000	1.000
<b>BorG4</b>	0.127	0.610	0.659
<b>Media</b>	0.053	0.820	0.829

Según De Meeûs (2020), **el efecto Wahlund incrementa F<sub>IS</sub> y F<sub>IT</sub> mientras reduce F<sub>ST</sub>.**

Dado que los valores de F<sub>ST</sub> entre marcadores pasan de 0, se evidencia una ligera diferenciación genética, en concordancia con los resultados obtenidos por Dequigiovanni et al. (2018).

**Tabla 11**

Equilibrio de Hardy-Weinberg calculado por poblaciones para cada SSR de *Bixa orellana* L.

Poblaciones	Marcador	Grado de libertad	ChiSq	Signif
Pob1	BorA2	6	511.413	***
Pob1	BorB4	3	343.916	***
Pob1	BorB10	6	328.662	***
Pob1	BorB12	3	300.910	***
Pob1	BorC12	6	415.344	***
Pob1	BorF1	15	629.702	***
Pob1	BorF9	3	440.000	***
Pob1	BorG4	21	695.371	***
Pob2	BorA2	6	231.449	***
Pob2	BorB4	10	547.017	***
Pob2	BorB10	10	341.847	***
Pob2	BorB12	6	418.945	***
Pob2	BorC12	6	228.520	***
Pob2	BorF1	15	546.857	***
Pob2	BorF9	3	302.000	***
Pob2	BorG4	21	249.768	***

Esta estadística calculada desempeña la función de evaluar **si la heterocigosidad observada concuerda con lo esperado** (hipótesis nula).

Debido a que **este valor supera el umbral crítico, la diferencia entre lo observado y lo esperado es significativo**, lo que indica un desajuste del equilibrio y resulta en el rechazo de la hipótesis nula (Simulations Popgen, n.d).







## Análisis Molecular de Varianza

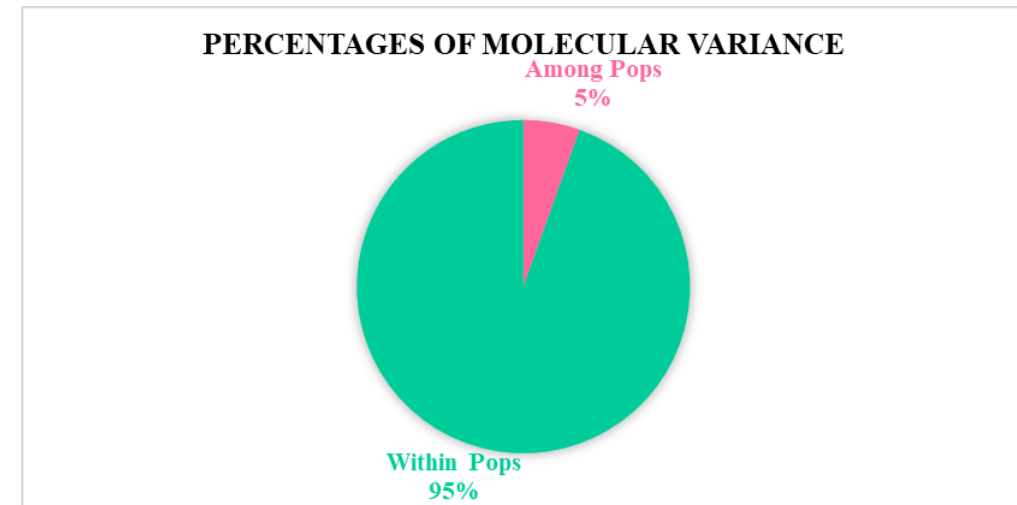
**Tabla 12**

Análisis de varianza molecular (AMOVA) realizado para 371 individuos de *Bixa orellana* L. y 8 SSR

Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	Variación estándar	%
Entre poblaciones	1	44.403	44.403	0.118	5%
Dentro de las poblaciones	740	1506.532	2.036	2.036	95%
Total	741	1550.935		2.154	100%

**Figura 11**

Gráfico de pastel del porcentaje de varianza molecular de poblaciones





## Análisis Molecular de Varianza

**Tabla 13**

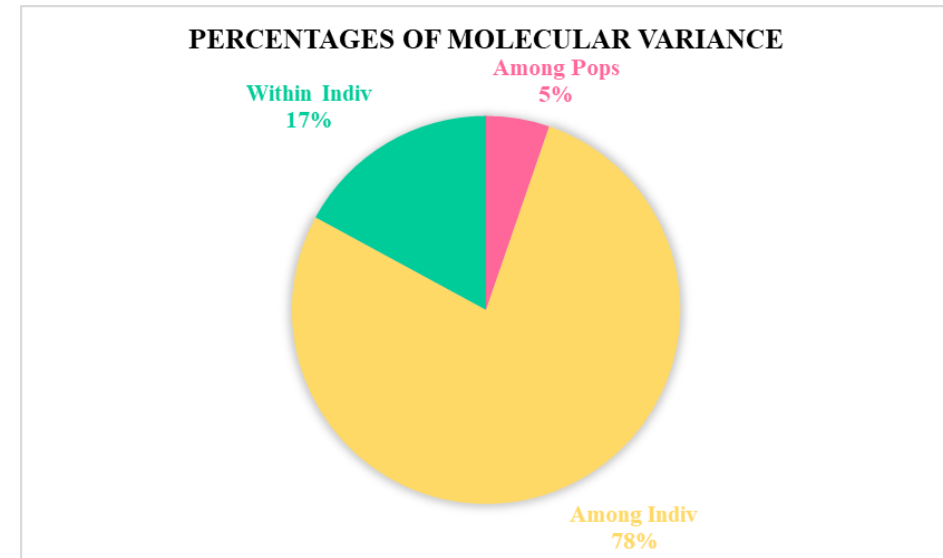
Análisis de varianza molecular (AMOVA) realizado para *Bixa orellana* L. incluyendo análisis de individuos

Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	Variación estándar	%
Entre poblaciones	1	44.403	44.403	0.114	5%
Entre individuos	369	1370.032	3.713	1.672	78%
Dentro de los individuos	371	136.500	0.368	0.368	17%
<b>Total</b>	<b>741</b>	<b>1550.935</b>		<b>2.154</b>	<b>100%</b>

Comparando los resultados de este estudio, con los reportados por **Dequigiovanni et al., (2017; 2018a; 2018b)** en sus tres publicaciones obtuvieron **resultados similares en el análisis AMOVA**, con una variación genética **entre poblaciones** del **11%, 21% y 29%**, y del **89%, 79% y 68%** dentro de las poblaciones.

**Figura 12**

Gráfico de pastel del porcentaje de varianza molecular incluyendo análisis de individuos

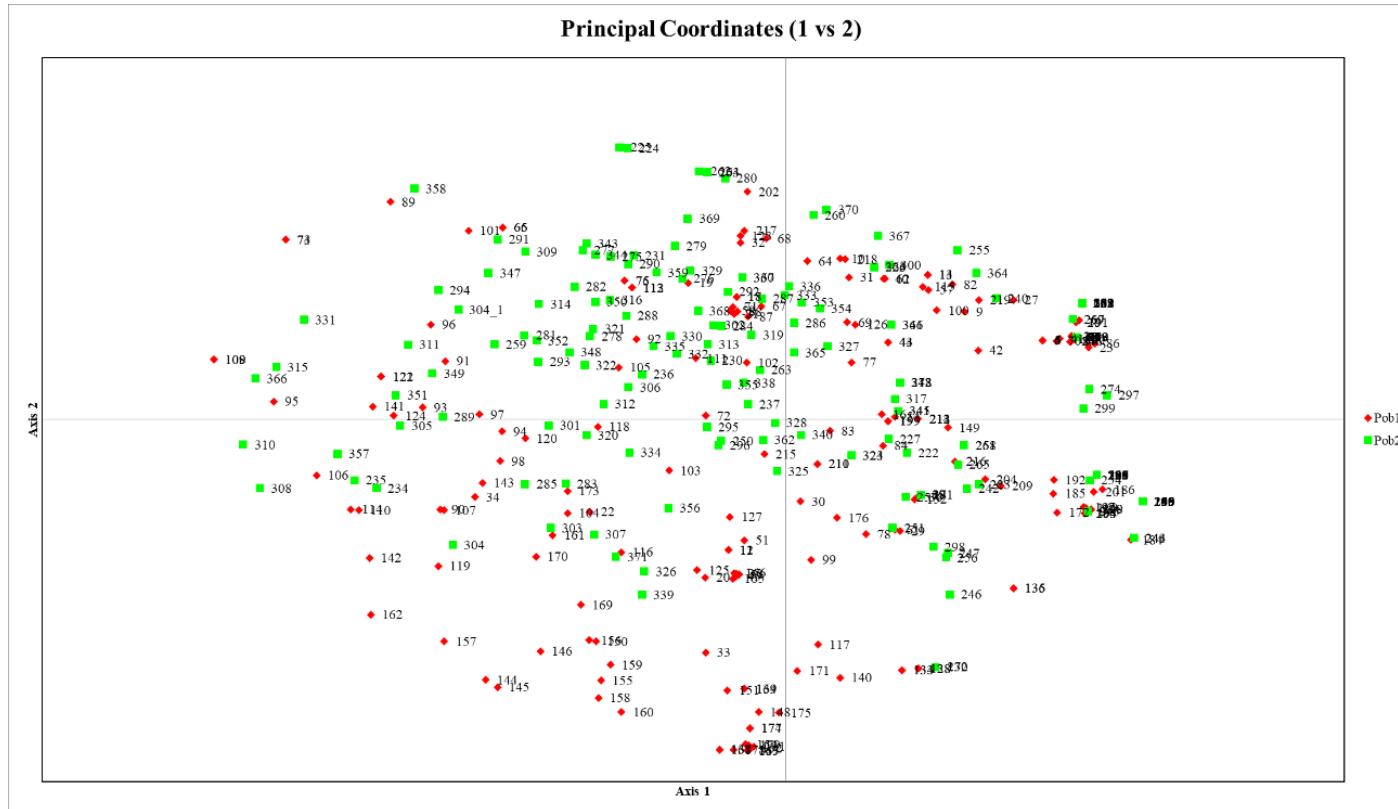




## Análisis Molecular de Varianza

Figura 13

Gráfico de dispersión de coordenadas principales (PCoA) para dos poblaciones de *Bixa orellana* L.



De acuerdo con Jombart et al., (2010), "el análisis de PCoA presenta limitaciones en la exploración de la estructura genética de las poblaciones, proporcionando más un resumen de **la variabilidad general entre individuos** que una visión clara de las diferencias interpoblacionales." A pesar de estas limitaciones, este enfoque pone de manifiesto la semejanza genética existente entre los individuos estudiados.



- ⇒ El genotipaje con los 9 marcadores moleculares SSR reveló un total de 44 alelos confirmando que todos son polimórficos, sin embargo, se evidenció un déficit de heterocigosidad obteniendo un valor promedio de  $H_e = 0.5175$ , y  $H_o = 0.0824$ .
- ⇒ El valor de PIC para cada marcador indicó que tres SSR (BorB4, BorF1, BorG4) presentaban valores  $> 0.5$ , por lo que son altamente informativos. Por otro lado, BorF9 presentó el PIC más bajo, por lo que no es un SSR informativo. Además, se evidenció la presencia de alelos privados en cuatro SSR (BorA2, BorB4, BorB10 y BorB12).
- ⇒ Se pudo realizar el agrupamiento de los individuos en un árbol filogenético mediante el método del vecino más cercano (NJ), obteniendo la agrupación de individuos similares. Pocos individuos de la misma accesión se agruparon en el mismo clado, y otros en el mismo nodo.





- ⇒ El análisis de estructura genética agrupó a los individuos en dos poblaciones conformadas por 220 y 151 en la Población 1 y Población 2 respectivamente, que se evidenció en el dendrograma realizado con el método UPGMA.
- ⇒ El análisis AMOVA identificó una mayor variación genética dentro de las poblaciones (95%) y entre individuos (78%). Se observó un desequilibrio de Hardy-Weinberg lo que se espera al analizar un banco de germoplasma ya que no se reproducen al azar.





- ⇒ Actualmente existen técnicas de genotipado que utilizan una tecnología más exacta para identificar alelos, por lo tanto, se debería contribuir a esta investigación con la utilización de otro método que aporte con datos más puntuales.
- ⇒ Es importante la cantidad de marcadores moleculares con los que se realiza el genotipaje ya que nos permiten obtener una información más precisa sobre la diversidad que existe en la colección de achiote. Se podría completar el trabajo con la extracción de ADN de los individuos faltantes y añadiendo más marcadores polimórficos.
- ⇒ Gracias a la información que se obtuvo en este trabajo sobre la diversidad existente en la colección de achiote que tiene la EETP INIAP, sería importante identificar los individuos de interés y conservarlos de mejor manera para evitar su pérdida total.



# Agradecimientos



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

