

ESPE

CIENCIA Y TECNOLOGÍA

EDITOR

Luis H. Cumbal Flores

Centro de Investigaciones Científicas y Departamento de Ciencias de la Vida
Escuela Politécnica del Ejército
Sangolquí, Ecuador
luis.cumbal@espe.edu.ec

COMITÉ EDITORIAL

Lourdes de la Cruz.

Carrera de Ing. Electrónica

Gonzalo Olmedo

Carrera de Ing. Electrónica

Mónica Jadán

Carrera de Ing. En Biotecnología

Eddy Galarza

Departamento de Eléctrica y Electrónica, ESPE-Latacunga

Impresión : Editorial Escuela Politécnica del Ejército

ISSN 1390-4612

© 2009 ESPE, Sangolqui, Ecuador

ESPE

CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Sumario

Volumen 2, número 2, 2009

A Basic Approach to Quantum Computation and Counterfactuality

Escobar-Moreira, L.

Biofortificación de seis genotipos promisorios y el cultivar INIAP- 450 de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) mediante la aplicación de quelatos de hierro y zinc.

C. Falconí, F. Galvez. & P. Landázuri

Obtención de bioetanol anhidro usando desechos sólidos orgánicos

L. Cumbal, J. Vásquez

Selección de bacterias para la remoción de hidrocarburos de petróleo desde suelos contaminados del Oriente

R. Soria, A. Koch, L. Cumbal & K. Ponce

LiLMOD: Una herramienta matemática para incrementar la competitividad leal en instituciones educativas

J. Mayorga-Zambrano

Evaluación de la sobrevivencia de protocormos de *Oncidium stenotis* en el proceso de encapsulación-deshidratación con miras a desarrollar un sistema de crioconservación

A. Roura, M. Jadán & K. Proaño

Inducción embriogénesis somática de piñon *Jathropa curcas* para la obtención de semilla artificial

D. Freire, P. Jiménez & M. Jadán

Una familia de controladores tipo Exponencial – Hiperbólico

F. Terneus & F. Reyes

Revista semestral de la Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador.

ISSN 1390-4612

© 2009 ESPE, Sangolquí, Ecuador

ESPE, Sangolquí, Ecuador

A Basic Approach to Quantum Computation and Counterfactuality

Escobar-Moreira, L.

Senior Member, Institute of Electrical & Electronics Engineers, Region 2, Baltimore Section, USA

ABSTRACT: Counterfactuality, the quality of being contrary to the fact, appears as an effect of the quantum phenomena with very possible applications in the realm of the Interaction-Free Measurements. The bomb-testing problem proposed by Penrose, Elitzur, and Vaidman is now feasible, after solving some engineering-type problems, thanks to the advance of technology. The mathematical and philosophical implications of the Interaction Free Measurement realizations are analyzed under a not-so-elegant but useful approach to counterfactual computation. This work will propose speculative work based on the conclusions derived from the study of the current quantum technology and theory.

1 INTRODUCTION

The theory of quantum computation and information is increasingly evolving, and there have been several attempts to prove by experimentation that its foundations and theory can be applied. Currently, these efforts to develop the quantum theory not only rely on physicists but also on the contribution of mathematicians who have seen in this phenomenon a way to solve interesting problems that have coined the term “quantum computing” (West 1989).

Yet, since the 1970’s, the power and capability of a quantum computer have been theoretical speculations; the advent of the first fully functional quantum computer will certainly bring many new and exciting applications thanks to the achievements of the physicists in the fields of nano-optics, ion storage, laser cooling and trapping, which undoubtedly have been making big news in the quantum community since 1995 (Monroe et al. 1995).

There is no doubt that all these realizations were boosted after 1994, when Shor set out a method for using quantum computers to help factor large numbers rapidly. The aftermath was a new generation interested in the quantum phenomena, who found very interesting applications in the field of information theory.

The idea of creating a quantum computer modified the classical information theory to fit quantum premises and created a new way to address problems that only quantum computers could solve. This fact generated several contributions by the mathematics and computer science community in the fields of cryptography, error correction coding, and quantum algebraic theory, among the most important.

Despite the fact that a group of physicists doesn’t accept as true what they call an incomplete theory (Einstein et al. 1935), the mysterious nature of the quantum phenomena didn’t stop the theoretical progress that still astonishes the scientific community, even when some of their applications can only be simulated by classic computers. Of course, if the quantum phenomena can be understood under its own terms, and bearing in mind that it is a truly explainable theory, we can paradoxically (from the point of view of the opponents of this theory) physically implement some applications.

The following paper will provide a brief historical background of the quantum theory, quantum information, and the challenges and limitations that we are facing at this time. Furthermore, the idea of what is needed to physically implement (as of today) a quantum system¹ will be given, so it can be inferred that if these experiments are attainable, such realizations can be applied to solve problems that classical systems are not able to answer.

¹ I will define a system as a group of interacting, interrelated, or interdependent elements forming a complex whole based on a comprehensive assemblage of principles in a particular field of knowledge.

2 BACKGROUND

2.1 A Brief Review of Quantum Formulation

The groundwork of quantum theory goes back to 1859 when Gustav Kirchhoff challenged physicists to find the function J (O'Connor et al., 1996) that relates to the energy E emitted by a black body that is a function of the temperature T and the frequency ν , i.e.

$$E = J(T, \nu) \quad (1)$$

In the first attempts, Josef Stefan and Ludwig Boltzmann, based on experimentation, proposed separately in 1879 and 1884 that the total energy emitted by a hot body was proportional to the fourth power of the temperature. This result, known as the Stefan-Boltzmann law, does not fully answer Kirchhoff's challenge because it does not take into account specific wavelengths.

After that, some efforts to prove the existence of the J function were made by Wilhelm, Wien, Kurlbaum, and Rubens; this last showed his work to Plank in 1900, who conjectured a correct formula for the Kirchhoff's statement. Plank made the unprecedented step of assuming that total energy is made up of indistinguishable energy elements called *quanta of energy*.

A matter of interest at this point is that after Plank's theoretical speculations, the quantum phenomena contributions started to be deviated from experimentation and were based on the original hypothesis with no experimental basis. However, thanks to the discovery of covariant differentiation, by Ricci and Levi-Civita, it was possible to extend the theory of tensor analysis to the Riemannian space of n dimensions that helped to represent the quantum physical theory.

Later, the phenomena took different standpoints; on one side, Albert Einstein examined the photoelectric effect in 1905 and proposed a quantum theory that actually matched the Planck's hypothesis. Einstein found that energy changes in jumps which are multiples of $h\nu$, where h is Planck's reduced constant and ν is the frequency.

On the other hand, in 1913, Niels Bohr discovered the major laws of the spectral lines based on his model of the Hydrogen atom and became the leading atom physicist. From 1913 to 1925, he and Sommerfield improved the theory of atoms and included the spin and exclusion principle of Pauli to have a good description of the atomic properties of chemical elements. Also, Bohr, in conjunction with Kramer and Slater, made important theoretical proposals regarding the interaction of light and matter, but addressing certain paradoxes that disturbed Einstein.

In 1923, Compton derived relativistic kinematics for the scattering of a photon (a light quantum) off an electron at rest, and Bose, thanks to the influence of Einstein, published a paper in 1924 where he proposed different states for the photon and conjectured that there is no conservation of the number of photons. About the same time, Louis de Broglie extended the particle-wave duality for light to all particles, especially to electrons, considering Einstein's approaches.

The year 1926 witnessed the most stunning but ideologically opposing contributions of quantum physics. First, Erwin Schrödinger published a paper giving a simpler formulation of the theory in which he introduced a second order differential equation for a wave function while Max Born proposed a consistent statistical interpretation in which the square of the absolute value of this wave function expresses the probability amplitude for the outcome of a measurement.

To generalize the quantum theory, Heisenberg published his uncertainty principle in 1927 while working at Bohr's Physics Institute at Copenhagen. Based on this work, they both discussed several principles to understand the atomic theory as it is represented by quantum formulations. This group of principles was coined through history as the Copenhagen Interpretation (Faye 2002).

The uncertainty principle states that the process of measuring the position " x " of a particle disturbs the particle's momentum " p ", so that if Dx is the uncertainty of the position and Dp is the uncertainty of the momentum we have:

$$Dx.Dp \geq \hbar; \hbar = \frac{h}{2\pi} \quad (2)$$

Heisenberg's work used matrix methods made possible by the contributions of Cayley fifty years earlier². We note that Heisenberg's work³ and wave mechanics of Schrödinger's were not properly shown to be equivalent until Riesz-Nagy set the necessary mathematics⁴ and revisited the representation theorem about 25 years later.

In 1928, Dirac gave the first solution of the problem of expressing quantum theory in a form, which was invariant under the Lorentz group of transformations of special relativity. He expressed d'Alembert's wave equation in terms of operator algebra.

Everyone did not accept the uncertainty principle. Its most forthright opponent was Albert Einstein. At a physics congress in 1930, he devised a challenge based on his relativistic theory that Niels Bohr couldn't answer opportunely the very same moment. However, Niels Bohr had the final victory, for the next day he had the solution by demonstrating that the uncertainty principle holds since there are errors in measuring position that translates to errors in measuring time.

In 1932, von Newman integrated the earlier physics achievements with a rigorous mathematic basis. Years before, he also developed the separable Hilbert space formulation for the Quantum Theory and has worked in the development of ring theory, lattices, and continuous geometries to provide a framework for the quantum theory (Kronz 2004).

Although Einstein was never satisfied with Bohr's explanation and the uncertainty principle, he was forced rather reluctantly to accept it until 1935 at which time he published jointly with Podolsky and Rosen the paper "Can Quantum-Mechanical Description of Physical Reality Be Considered Complete?" which is well known as the EPR paradox.

2.2 Timeline of Quantum Computation

The idea to use a quantum based computer was explored in the early 1970's by physicists and computer scientists, among them the most important being Charles Bennett of IBM, Paul Benioff of the Argonne National Lab and David Deutsch of the University of Oxford (West 1989).

In 1982, the Nobel prize-winning physicist Richard Feynman at Caltech came up with the idea of a 'quantum computer', a device that uses the quantum phenomena to improve its performance dramatically (Deutsch, 1992). He, among others, attempted to provide an abstract model of a quantum system to perform computations and explained how such a machine would be able to act as a simulator for quantum physics.

In 1985, based on the assertions of Feynman, David Deutsch realized that eventually it would be possible to create a general-purpose quantum computer and published a theoretical paper stating that any physical process, in principle, could be modeled perfectly by a quantum computer. Thus, a quantum computer would have capabilities far beyond those of any traditional classical computer (West 1989). This paper encouraged the finding of interesting applications for such quantum machines.

However, the quantum computing phenomena was treated as an academic curiosity among computer scientists and mathematicians until 1994 when Peter Shor (Bell Laboratories) came up with a method to factor large numbers on a quantum computer. His preprint showed how to ensemble mathematical operations in a quantum computer to crack codes much more quickly than any ordinary (or classical) computer could. In fact, Shor's algorithm would be able to break current cryptography techniques in a matter of seconds (Deutsch 1992) which motivated a world race to create a practical quantum computer.

² Arthur Cayley was a mathematician known for his contributions in algebra of matrices and n-dimensional geometry.

³ The Heisenberg principle is an application of the Cauchy-Schwarz inequality.

⁴ Riesz is well known for Functional Analysis and ergodic theory.

2.3 *The Quantum Apparatus*

There is not yet an idea of how practical a quantum computer will be, but several attempts have been made to provide physical results based on the current technology. These experiments were made possible thanks to the advancement of optics, communications, nano-physics, and measurement devices, that have allowed, at least at a “photon level” to mimic what has been proven in theory.

Intuition and experimentation have shown the necessary use of optics in the quantum phenomena, especially when the interferometer comes to play. Despite the fact that there are several types of interferometers that vary according to their mirror complexity setting, beam splitter or light source, few of them have been considered ideal to perform “real life⁵” quantum applications, for example, as a part of the implementation of a solution for the “bomb testing problem” (Penrose 1994), or more generally speaking, as a primordial device in the so-called “interaction free measurements” (Kwiat et al. 1995).

Some realizations in quantum cryptography have also shown the importance of very high-collimated light sources (in the laser case) and very sensitive photon detectors to replicate quantum channels over a medium range setting. Nonetheless, the use of current satellites has also been proposed, including the use of the International Space Station, to triangle a quantum channel communication around the world. Again, for sure the use of more sensitive photon measurement devices and the use of some sort of advanced optics would be necessary to “light up” these projects.

With regard to computers, the quantum version of a classical bit (commonly called qubit) has been implemented under very controlled and sophisticated lab settings by creating “quantum dots” or electrons trapped inside a cage of atoms. This electrons can be excited “up” or “down” by applying a controlled pulse of laser light with the right wavelength.

The fact that it is possible to control the way that this electron behaves has given the notion of building the NOT function as it knocks the qubit from one state to its opposite. More complex logic functions can be modeled using quantum dots arranged in pairs but still there are several limitations.

Other techniques have attempted to use the polarization of laser light as the information medium, the molecular physics of certain liquids to create a way to store information (Vergano 1997) and the nuclear magnetic resonance NMR techniques to detect spin changes and flip their status. In all these techniques though, decoherence⁶ is still a problem.

In general, theoretical propositions and certain experimentations have projected that quantum computers can be built using SQUID⁷, trapped ion boxes, electrons on liquid helium, molecular nano-magnets or SMM⁸, photonic nano-structures or CQED⁹, Fullerene properties, nano-optics, and properties derived from any physical realization of wave-particle duality.

Some of these ideas and claims will be discussed further when showing the current status of the new achievements of quantum computation.

3 QUANTUM APPLICATIONS AND IMPLICATIONS

The quantum theory has been able to satisfactorily explain the characteristics of subatomic particles, which helped develop not only new hypothesis but also created new branches of knowledge like electronics and photonics. To some extent, the quantum effect takes place in some devices, which give us a wide range of applications in biological sciences, industry, communications engineering, and so on. Some examples are the laser, magnetic resonance imaging

⁵ This term means that it has been possible to replicate some theoretical applications that may not be suitable to be used yet, but have shown compelling results.

⁶ Decoherence is a term used to describe the interaction of a quantum system with its environment, which represents a major problem for the practical realization of quantum computers because these rely on the undisturbed evolution of quantum coherences.

⁷ Superconducting Quantum Interference Devices

⁸ Single Molecule Magnets

⁹ Cavity Quantum Electrodynamics

(MRI), and in general all the modern electronics.

However, after the mathematical formulation of quantum mechanics, a lot of speculative applications have arisen, especially regarding quantum computers. The compelling theoretical results in quantum computation and cryptography motivated physicists to create examples of quantum gates, create ways to polarize a photon and improve methods to detect it, of course, in the lab.

The possible applications of the quantum computer are not meant to perform trivial tasks that a classic computer does, but rather help in crypto-analysis, database searches, and as an outstanding physics phenomena analyzer. To some extent, all these capabilities have been simulated using software packages in the classic computer.

Nevertheless, although there are yet things to understand, from an engineering standpoint, the use of the quantum “phenomena” can lead us to very successful applications exploiting actual technology; perfect examples are the interaction-free measurements (IFM) (Elitzur & Vaidman 1993). These “interaction-free” measurements can be regarded as counterfactual computations¹⁰ from a mathematical perception, which is an interesting characteristic in quantum computers. To achieve this effect, a computer embodying the possibility of running the computation must be available, even though the computation is, in fact, not run (Mitchinson & Jozsa 2000).

Perhaps philosophy has also been nurtured by the several interpretations of quantum theory that some philosophers of physics have derived as a way to understand the nature of the universe.

3.1 Interaction Free Measurements

One of the most intriguing applications of the IMF is the solution proposed to the bomb-testing problem described by Penrose in 1997. The bomb testing problem conjectures that there is a way, by using quantum phenomena, to test a pile of bombs equipped with super-sensitive triggers activated by a photon, of which some of them are duds.

Classically, the only way to verify that a bomb is good is by touching the mirror, which means that the bomb will explode. The problem takes place when we want to test a bomb without exploding it, which seems to be logically impossible. Nevertheless, quantum mechanics provides a solution to the problem in a surprisingly simple way.

The method uses the Mach-Zehnder interferometer setting. The photons reach the first beam splitter, which has transmission coefficient $1/2$. The transmitted and reflected parts of their waves are then reflected by two mirrors and finally reunite at another similar beam splitter. Two detectors D1 and D2 collect the photons after they pass through the second beam splitter.

In order to test a bomb, it is necessary to tune the interferometer by arranging the positions of the beam splitters and the mirrors in such a way that, due to destructive interference, no photons are detected by one of the detectors (i.e. D2), and they all are detected by D1. Then, one of its mirrors will be replaced by the mirror-trigger of the bomb. Photons are sent through the system, if the bomb is defective, then only detector D1 clicks.

If the bomb is good then no interference takes place and there are three possible outcomes: the bomb might explode (probability $1/2$), detector D1 might click (probability $1/4$), and detector D2 might click (probability $1/4$). In the latter case the goal has been achieved since we know that the bomb is good (otherwise D2 could not click) without exploding it.

Some modifications have been made to the Penrose problem in view of the fact that the real implementation is very difficult because tuning the interferometer with the bomb inside can cause an explosion. One is called the Elitzur-Vaidman bomb testing problem (Elitzur & Vaidman 1993) which is equivalent to the task of finding an ultra-sensitive mine without exploding it.

The solution is similar since it uses a tuned Mach-Zehnder interferometer to have no photons at detector D2. The mine is placed in such a way that it blocks one of the arms of the interferometer and there is no need to tune the interferometer. The efficiency of this procedure is only 25%, but by modifying the transmission coefficients of the beam splitters and repeating the procedure in case of no explosion, the efficiency can be increased to as much as 50%.

¹⁰ This is a process in which a result can be known without running a program in a quantum computer.

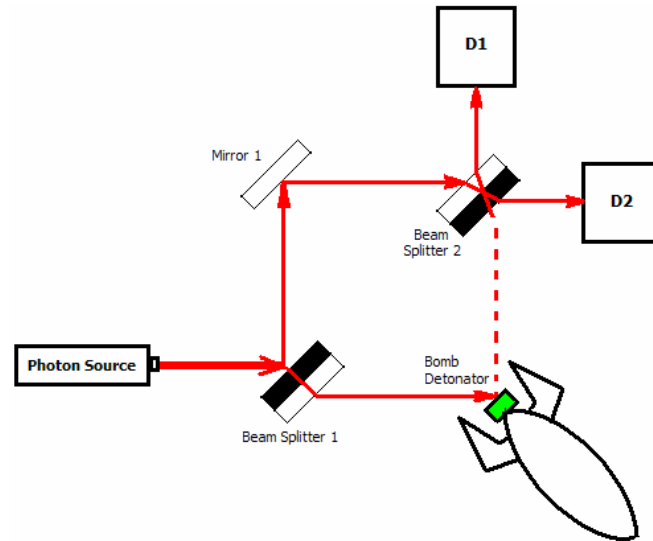


Figure 2 The mirror 2 has been replaced by the detonator of the bomb in the Mach-Zehnder interferometer setting.

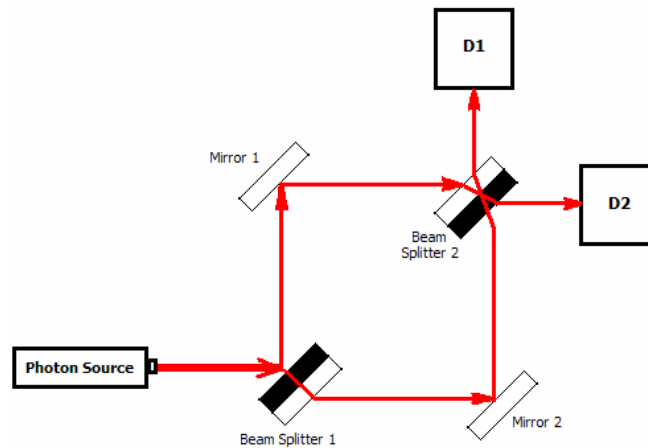


Figure 1. Mach-Zehnder interferometer. For the bomb-testing problem the interferometer needs to be tuned so no photons are detected by D2.

A mathematical formulation can be made by generalizing that the IFM device is in the state $|\psi\rangle$, which causes an explosion when measured. We also consider that any state orthogonal to $|\psi\rangle$ won't cause an explosion. Thus, the problem arises when it is needed to detect $|\psi\rangle$ without destroying it.

So, the system $|\psi\rangle$ will explode when part of the measurement device is in an assumed state $|\phi_1\rangle$. If the system is orthogonal or interacts with the orthogonal part of $|\phi_1\rangle$, which it can be called $|\phi_2\rangle$, the system or the measuring won't change their states.

The following are the possible outcomes:

$$\begin{aligned}
|\Psi\rangle|\Phi_1\rangle &\rightarrow \text{explosion} \\
|\Psi_\perp\rangle|\Phi_1\rangle &\rightarrow |\Psi_\perp\rangle|\Phi_1\rangle \\
|\Psi\rangle|\Phi_2\rangle &\rightarrow |\Psi\rangle|\Phi_2\rangle \\
|\Psi_\perp\rangle|\Phi_2\rangle &\rightarrow |\Psi_\perp\rangle|\Phi_2\rangle
\end{aligned} \tag{3}$$

In order to facilitate the comprehension of this approach, the measurement device is the photon, which can be in the state

$$|\chi\rangle = \alpha|\Phi_1\rangle + \beta|\Phi_2\rangle \tag{4}$$

The interaction of the photon with the system can be expressed as the following:

$$\begin{aligned}
|\Psi\rangle|\chi\rangle &\rightarrow |\Psi\rangle(\alpha|\Phi_1\rangle + \beta|\Phi_2\rangle) \\
|\Psi\rangle|\chi\rangle &\rightarrow \alpha|\Psi\rangle|\Phi_1\rangle + \beta|\Psi\rangle|\Phi_2\rangle \\
|\Psi\rangle|\chi\rangle &\rightarrow \alpha(\text{explosion}) + \beta|\Psi\rangle|\Phi_2\rangle
\end{aligned} \tag{5}$$

By analyzing the Penrose problem, we can deduct that a photon (measuring device) traveling to the inside of the interferometer will encounter the first beam splitter in the following state:

$$|\chi\rangle = \frac{1}{\sqrt{2}}(|\Phi_1\rangle + |\Phi_2\rangle) \tag{6}$$

In this case, $|\Phi_1\rangle$ is the photon traveling in the lower arm of the interferometer and $|\Phi_2\rangle$ is the photon traveling in the upper arm of the interferometer. With the same analogy, the detector D2 with the second beam splitter, tests the state

$$|\chi_\perp\rangle = \frac{1}{\sqrt{2}}(|\Phi_1\rangle - |\Phi_2\rangle) \tag{7}$$

Other potential applications of the IFM are proposed in order to conserve live microorganisms that are killed when being detected (Vaidman 1996), and for obtaining X-ray photographic plates with at least 20 times less radiation than conventional methods.

3.2 Implications

Some propositions of the IFM can be regarded as counterfactual since we can know that a bomb could explode without actually seeing it. This matches the *many-worlds interpretation* of the quantum phenomena¹¹ that, in terms of quantum computing, would be the same as having evolved in a world in which the computer has never been run, but the result of the computation is obtained. The fact that the computer may have run in another world is of no consequence to us. The implication is that there is always a world in which a good bomb will explode, but (with a suitable measurement outcome) we are confined to another world in which the bomb is left unexploded and yet we have the knowledge that it is, in fact, a good bomb (Mitchinson & Jozsa 2000).

3.3 Mathematical Approach of the Counterfactual Computation

Let us first define a quantum computer, which has a switch S and an output register O, where S and O are qubits. The computer is meant to be ready to solve a decision problem as soon as the switch S is turned “on”; where the states of S can be $|0\rangle$ “off” or $|1\rangle$ “on”. Let us also define a state space R of the operation and storage qubits needed to perform the processing in the quantum computer. Then the total state space of the computer is:

$$S \otimes O \otimes R \tag{8}$$

¹¹ Also known as the *theory of the universal wave function*, which was proposed in 1957 by Hugu Everett.

Also, it is considered that the computer operates in a fully reversible way and the initial and final states of R are equal. A binary result, denoted “r”, will be deposited in the output register O as an addition modulo 2.

Based on these definitions, a quantum computer will compute a problem in some finite time T in the following form:

$$|0\rangle |j\rangle |R\rangle \rightarrow |0\rangle |j\rangle |R\rangle ; \text{ where the computer is “off”} \quad (9)$$

$$|1\rangle |j\rangle |R\rangle \rightarrow |1\rangle |j \otimes r\rangle |R\rangle ; \text{ where the computer is “on”} \quad (10)$$

The process to carry out an output “r” involves two unitary operators (Deutsch 1985) denoted U0 and U1 when the computer is turned “on”. U0 is the identity of S and O while U1 is the C-NOT¹² operation on S and O. It is necessary to remember that the C-NOT operation will flip only the second qubit if the first qubit is “one” (Monroe et al. 1995); the Table 1 will explain this in detail.

It is assumed that the original state of S and O is $|0\rangle |0\rangle$. If the switch is turned to $|1\rangle$ then the computer will affect the transformation U0 or U1 that we would like to know “without” having to turn the switch on.

Table 1 C- not operation

Input 1	Input 2	Output 1	Output 2
0	0	0	0
0	1	0	1
1	0	1	1
1	1	1	0

Then, a computational procedure is achieved by selecting a row of qubits, applying them to the unitary operations, performing a measurement, and an insertion of the computer. The measurements are the source of our information and results, while an insertion is swapping two selected qubits into the registers S and O for a finite time T before they are swapped back out into the two selected qubits.

A specific notation is necessary in order to record whether the computer was on or off on the various occasions when it was inserted. In order to do it, the entire state space can be partitioned into two orthogonal subspaces, the “off” and “on” subspaces, corresponding to the switch states $|0\rangle$ and $|1\rangle$, respectively, and we will separate the total state into its two superposition components in these subspaces.

After each insertion of the computer, we carry out a measurement that is projected into these subspaces with outcomes, which we write compactly as f (for off) or n (for on). Then each possible list of “f” or “n” outcomes, together with outcomes of the measurements in the protocol, defines what it is called a *history*. This procedure is depicted as a branching structure with nodes that are different whether U0 or U1 is used. The initial node corresponds to the initial state of the qubits to be processed.

At each node the un-normalized state vector v_n is evaluated, which is the result of the projections occurring at each measurement step of the protocol or at the imaginary measurement following an insertion of the computer. At the final node of the history h , the probability of h is $|v_h|^2$

If we denote m as the sequence of measurement outcomes, m is a CF (counterfactual) outcome of

¹² C-NOT stands for the “controlled NOT” gate in quantum computing.

type r , where $r = \{0,1\}$, if a history h satisfies $v_h \neq 0$ with Ur only if h is all off and the probability of m with $U1-r$ is zero '0'.

The following example is given by Mitchinson & Jozsa (2000) and tends to explain what is has been exposed about counterfactuality.

1) Starting with $|00\rangle$ we apply the universal quantum gate operation

2) The state is rotated¹³ to $\cos\theta |00\rangle + \sin\theta |10\rangle$; $\theta = \pi/2N$

3) The obtained state is $\cos\theta |00\rangle + \sin\theta |1r\rangle$ assuming the operator Ur is used

4) Then, the second qubit is measured and we could have the following outcomes:

If $r=1$,

$|00\rangle$ with probability $\cos^2\theta$

$|11\rangle$ with probability $\sin^2\theta$; computer has run and process halts

If $r=0$, measurement yields to $\cos\theta |00\rangle + \sin\theta |10\rangle$ and all the steps are repeated, allowing the machine to run, then measuring the qubits.

After N iterations, if $r=0$ the state will have rotated to $|10\rangle$ for sure, but if $r=1$, the state will be $|00\rangle$ with probability $\cos(\pi/2N)^{2N}$ and the computer has not run, even if we know that r is "1".

The Figure 3 shows the procedure for obtaining a history and measurements. Note that $\cos\theta$ and $\sin\theta$ are represented as c and s respectively. In order to satisfy the definition of CF, the history $f0f00$ obtained when applied $U1$ is the only one with measurements $m=0$ and $m=00$, meaning that h is all "off."

When $U0$ is applied, there are two histories $f0f00$ and $n0f00$. By definition, the probability of m with $U1-r$ is zero '0', meaning that the sum of the un-normalized state vector should be zero. In this case, the addition of the un-normalized state vectors corresponding to these histories is $(c^2 - s^2) |00\rangle$. Choosing $\theta = \pi/4$, we can achieve the condition to satisfy a CF outcome.

4 ACHIEVEMENTS AND CURRENT LIMITATIONS

4.1 Achievements

One of the most important achievements obtained in the last decade of researching in the quantum phenomena is the development of the single photon detectors by Sae Woo Nan, a NIST physicist, in 2006. This progress helped Xiao Tang and other colleagues at the quantum computation team at NIST in creating a practical way to apply quantum cryptography in solving the QKD problem.

The method produces a continuous binary code at a rate of more than 4 million bits per second (4 million bps) over 1 kilometer (km) of optical fiber with an error rate of only 3.6 percent. This technique was able to generate and transmit secret quantum keys at Los Alamos National Lab over 184.6 kilometers (km) of fiber-optic cable, the longest distance ever recorded for quantum key distribution (QKD). The results are very promising since the distances are large and new ways to avoid decoherence can help in increasing the length of transmission by using alternate technology.

The success of the experiment relies on the NIST detectors, which are far more efficient than the commercial ones. These detectors also recover much faster between detection events, which may increase system speed.

The NIST sensors could be used not only as practical receivers for quantum communications systems, but also for calibration tools for single photon sources, and evaluation tools for testing system security. They also could be used to study the performance of ultra low-light optical systems and to test the principles of quantum physics.

¹³ This is a rotation by θ around \hat{y} . A unitary matrix can be expressed as a product of its rotations.

Also, NIST, among other universities and institutes, is interested in developing a quantum gate capable of performing some basic operations that could finalize in the building of a quantum computer. In fact, since 1995, there have been some defined groups in charge of specific areas of interest, such as ion trap and optics.

Since IBM showed the test tube quantum computer and obtained the factor of the number 15 by using the Shor's algorithm in 2001, research continues to fully develop a commercial quantum computer. Currently, physicists believe that the hardware design of a quantum computer would involve ion traps, QED¹⁴, and NMR since under lab experiments these devices have shown some success in performing certain operations, but each have serious limitations. Some physicists believe that QED could be more promising.

However, a Canadian based company, D-Wave, raised a lot of expectations when they

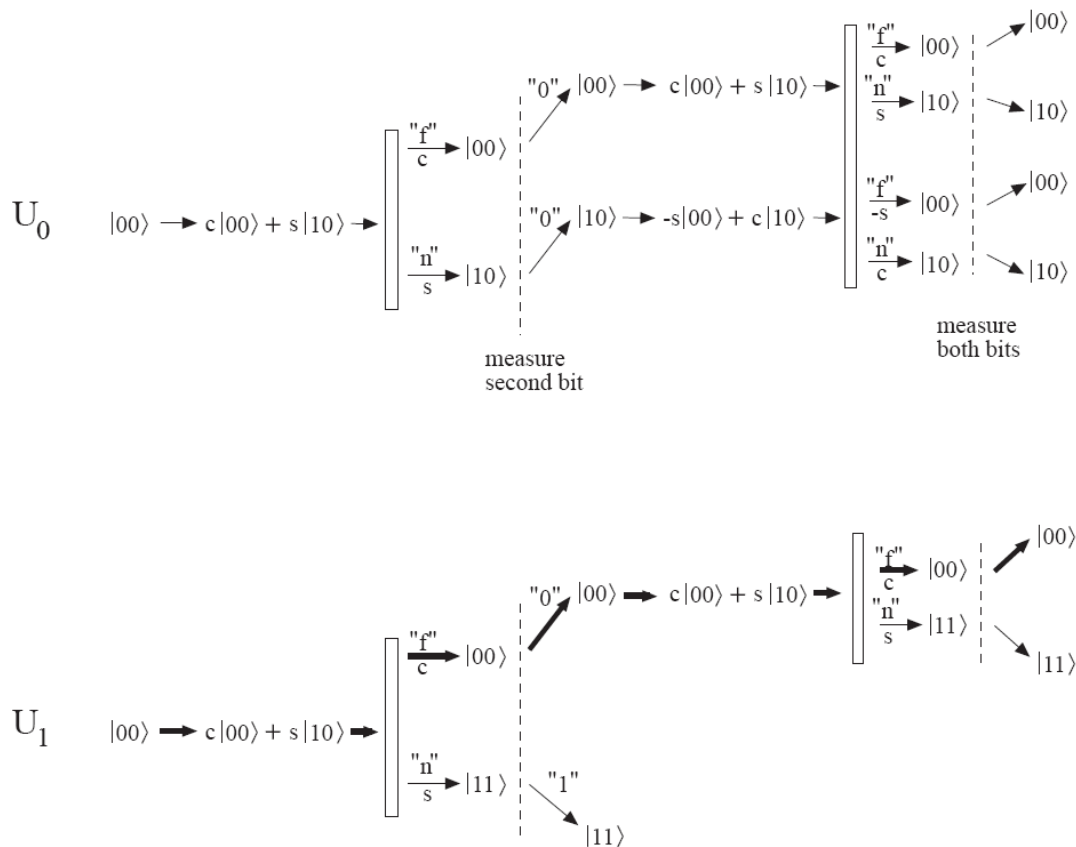


Figure 3. Example described in Jozsa (2000). Counterfactual computation under the operators U_0 and U_1

announced that they had developed the world's first quantum computing systems designed to run commercial applications. On February 13, 2007 they ran an initial demonstration of their Orion Quantum Computing System, which is built around a 16-qubit superconducting adiabatic quantum computer processor. Many physicists knowledgeable about quantum computing have expressed skepticism until new demonstrations are shown.

4.2 Limitations

In order to understand the limitations of building a truly functional quantum device or quantum computer, we need to consider first how optimal and reliable a quantum computer would be in comparison with classic computers. If so, the most important obstacles are error correction, decoherence, and hardware architecture.

¹⁴ Cavity quantum electrodynamics

4.2.1 *Error correction*

It is self explanatory, but related directly to decoherence, which is the tendency of a quantum computer to decay from a given quantum state into an incoherent state as it interacts, or entangles, with the state of the environment. These interactions between the environment and qubits cause errors in computation.

Theoretically, the early work in quantum error detection was proposed in 1995 by Peter Shor, and used the structure of an Abelian group eigenspace generated by tensor products of Pauli matrices. This kind of code was called additive or stabilizer. In 1997, more research inside the quantum error correction code community came up with a new idea of a non-additive error correction based on group theory. Still, the efforts in minimizing error are focused on reducing it before it happens. It would be fruitful to see, once with a real quantum computer, how to implement the quantum error correction of data transmitter over a quantum channel. Currently, most of the quantum error correction codes are simulated rather than applied at a useful level.

4.2.2 *Decoherence*

As explained above, is really difficult to deal with since the photons decay very fast. In 1998, a joint effort between Los Alamos National Lab and MIT suggested the use of the property of entanglement to study the interactions between states as an indirect method for analyzing the quantum information. Rather than a direct measurement, the group spread a single qubit across three nuclear spins of each molecule of a liquid solution and by using NMR techniques, they were able to detect and fix errors in a qubit's phase coherence¹⁵ and thus maintain a higher level of coherence in the quantum system.

Currently, research in quantum error correction continues with groups at certain universities (like Caltech, MIT and UMD), industry (IBM, Microsoft), and the government (Los Alamos, NIST).

It is hard to estimate when we will see reliable and robust quantum architecture. As explained before, there are several candidates to achieve the first quantum computer, but each of them carries out serious limitations. Perhaps NMR has become the most popular component in quantum hardware architecture but still, generating single photons and providing the right environmental conditions are not so easy to reproduce out of a well-controlled lab facility.

4.2.3 *Quantum Dots Technique*

In this technique the electron only remains in its excited state for about one microsecond before it falls to the ground state. Since the required duration of each laser pulse is around 1 nanosecond, there is a limit to the number of computational steps that can be made before information is lost. In addition, constructing a quantum dot is a very difficult process because they are so small (like 1 nanometer across). The technology needed to build a computer from these dots and an auto-tunable laser to selectively target different groups of quantum dots doesn't yet exist.

4.2.4 *Quantum Liquid Technique*

In this technique, which is called also as molecular magnet technique, the time before the decoherence sets in is much longer than in any other technique so far but the restriction is the limit on the number of qubits a system may have. Upgrading the system, for example from 7-qubits to 10-qubits, is very difficult since the readable output will be harder to detect.

5 CONCLUSIONS AND FUTURE WORK

The quantum scientific community relies on rigorous theoretical physics and new evolving math to

¹⁵ The state in which two signals maintain a fixed phase relationship with each other or with a third signal that can serve as a reference for each (definitions from the FEDERAL STANDARD of TELECOMMUNICATIONS).

provide insight as to what obstacles the future will hold for quantum computer architecture. For sure, the panorama of such a device is likely to be very different from what we know today.

The results of the experiments carried out are promising and maybe history will repeat itself, as was the case of the invention of the classic computer we use today. As it is known, the groundbreaking work of Shannon, Turing, and even the Von Newman architecture was developed before the use and discovery of the transistor. Thus, if this feat can be obtained, a computer of such characteristics will change the life of humankind directly or indirectly.

Conversely, the questions still arise: How will we measure the capacity of the processing of a quantum computer? What will be the parameters that will differentiate a quantum processor from another one? Will it be in the range of Thera-Hertz with a storage capacity in the range of Giga-qubits? What kinds of problems will quantum computers be able to solve?

In the meantime, the quantum phenomena can be exploited for IFM, which is possible and realizable. Even though a system can perform in the Penrose problem with a maximum of 25% probability, in a controlled environment this can be done for specific purposes, so we have a selected bomb system capable to perform with 100% certainty when deployed in cases of time-critical military operations. The IFM can achieve big success in the short term once a cost-benefit application is explored in other areas as well, since the bomb testing problem should also be considered as a metaphor for any measurement that we don't want to make, and at the same time we don't want to affect at all.

A new implementation of a microorganism isolation and detection problem is proposed by using some biophysical properties of certain microorganisms (fluorescence, shape, size). Therefore, it may be possible to select a sample of possible contaminated blood that we can spread onto a customized slide plate. An interferometer-based system will be tuned after the sample has been placed inside the interferometer, instead of mirror 2, for example. So the IFM principle holds; some microorganisms will be lost by contact with a photon, but in at least 25% of all the possible outcomes, we perhaps achieve our purposes: detect the microorganism without destroying it.

6. REFERENCES

- Arndt, Nairz, Voss-Andreae, Keller, van der Zouw, Zeilinger, 1999. Wave-particle duality of C60. *Nature*, 401:680-682.
- Calderbank A., Rains E., Shor P. and Sloane N.J.. 1997. Quantum Error Correction and Orthogonal Geometry. *Physical Review Letters*, 78:405-409
- Copenhagen Interpretation of Quantum Mechanics, 2002. Stanford Encyclopedia of Philosophy. First Publication.
- Deutsch, D. 1985. Quantum-theory, the Church-Turing principle and the universal quantum computer. *Proceedings of the Royal Society of London, Series A*, 400:97-117.
- Deutsch D. 1992. A comprehensive and inspiring guide to quantum computing. *Physics World*
- Elitzur, A., Vaidman, L. 1993. Quantum mechanical interaction-free measurements. *Foundation of Physics*, 23:987
- Einstein A., Podolsky B., Rosen N. 1935. Can quantum-mechanical description of physical reality be considered complete? *Physical Review Letters*, 41:777
- Hiskett P., Rosenberg D., Peterson C., Hughes R., Nam S., Lita A., Miller A.J., Nordholt J.E. 2006. Long-distance quantum key distribution in optical fiber. *New Journal of Physics*, 8:193.
- Jozsa, R. 1999. Quantum effects in algorithms. *Chaos, Solitons and Fractals*, 10:1657-1664.
- Kwiat, P., Weinfurter, H., Herzog, T., Zeilinger, A., and Kasevich, M. 1995. Interaction-free quantum measurements. *Physical Review Letters*. 74: 4763-4766.
- Mitchison G., Jozsa R. 2000. Counterfactual Computation. *Proceedings of Royal Society. London*
- Monroe C., Meekhof D., King B., Itano W. & Wineland, D. 1995. Demonstration of a Fundamental Quantum Logic Gate. *Physical Review Letters* 75: 4714-4717.
- Monroe C., Meekhof D.M., King B.E., Itano W.M., & Wineland D.J. 1995. NIST, *Physical Review Letters* 75:4714
- O'Connor J., Robertson E.F. 1996. On-line journal A History of Quantum Mechanics, MacTutor History of Mathematics, University of St. Andrews – Scotland.
- Platzman P.M., Dykman M.I. 1999. Quantum Computing with Electrons Floating on Liquid Helium. *Science*, 284(5422): 1967 – 1969
- Penrose R. 1994. *Shadows of the Mind*, Oxford University Press.
- Quantum Theory: von Neuman vs Dirac, 2004. Stanford Encyclopedia of Philosophy. First Publication.
- Rosenberg D., Lita A., Aaron J., Miller A.J., Nam S. 2006. Noise-free, high-efficiency, photon-number-resolving detectors. *Physical Review Letters*, 71(6):061803

- Tang X., Ma L., Mink A., Nakassis A., Xu H., Hershman B., Bienfang J., Boisvert R.F., Clark C., Su D. & Williams C. 2006. Auto-compensated, polarization coding, fiber-based quantum key distribution system operating at sifted-key rate over 4Mbit/s. SPIE Defense & Security Symposium, Orlando, Florida, USA.
- Vaidman L. 1996. Interaction-Free Measurements. Raymond and Beverly Sackler Faculty of Exact Sciences, Tel-Aviv University. Israel
- Vergano D. 1997. Brewing a quantum computer in a coffee cup. Science News
- West J. 2000. The Quantum Computer, Caltech, published on-line at: <http://www.cs.caltech.edu/~westside/quantum-intro.html>

Biofortificación de seis genotipos promisorios y el cultivar INIAP- 450 de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) mediante la aplicación de quelatos de hierro y zinc.

C. Falconí, F. Galvez. & P. Landázuri

Carrera de Ciencias Agropecuarias IASA, Departamento de Ciencias de la Vida, Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Pichincha, Ecuador. E-mail: cfalconi@espe.edu.ec

RESUMEN: La capacidad de asimilación de hierro y zinc de seis genotipos promisorios y un cultivar mejorado de chocho fue cuantificada mediante el índice del contenido de clorofila (ICC), y la fluorescencia variable del Fotosistema II (fv/fm), bajo condiciones de invernadero. Se determinó el contenido de Fe^{2+} en hojas y tallos mediante espectrofotometría, antes y después de la aplicación foliar de quelatos de hierro y zinc. La aplicación de quelatos de hierro y zinc se realizó mediante aspersión en tres dosis combinadas de cada elemento (0, 272, 545 ppm). Se realizaron dos mediciones desde los tres a los 98 días posteriores a la siembra. Los genotipos que presentaron los mayores índices de contenido de clorofila, fueron INIAP- 450 (46.65%) y la cruza F8 (ECU-2659 x ECU-8415) (39.87%) ($p \leq 0.05$) en comparación con el resto. Los genotipos, que presentaron la mayor fluorescencia variable fueron 722-4, 712-1, y F8 ($p \leq 0.05$). Las accesiones ECU- 2658 e I-450 ANDINO tuvieron el mayor contenido del ion Fe^{2+} en hoja ($p \leq 0.05$).

ABSTRACT: Iron and zinc assimilation capacity of six promising lupin genotypes was quantified by the chlorophyll index content (CIC) and photosystem II fluorescence capacity (fv/fm), under greenhouse conditions. Fe^{2+} content was determined in lupin leaves and stems by spectrometry, before and after foliar chelating agents of iron and zinc were applied. Iron and zinc were sprayed in three combined doses of each element (0, 272, 545 ppm). Plants were evaluated twice starting from three to 98 days after sowing. The genotypes INIAP- 450 (46.65%) and the F8 cross (ECU-2659 x ECU-8415) (39.87%) showed significantly ($p \leq 0.05$) higher values of chlorophyll index in comparison with the others. The genotypes 722-4, 712-1 and F8 presented significantly ($p \leq 0.05$) the highest variable fluorescence. The genotypes ECU- 2658 and I-450 ANDINO had significant ($p \leq 0.05$) the highest ion Fe^{2+} content on leaves.

1. INTRODUCCIÓN

El chocho, tarwi o lupino, *L. mutabilis* Sweet es una especie de gran interés ecológico, económico, científico y social. Su raíz afloja el suelo y colecta nitrógeno del aire, constituyendo un excelente abono verde capaz de fijar más de 400 kg de N x ha⁻¹ (Jacobsen y Sherwood 2002).

El alto valor nutritivo del chocho ha creado gran demanda en el Ecuador, incrementado el número de pequeñas empresas agroindustriales. Sumado a que el chocho es importante para la investigación, con una amplia variabilidad genética disponible y útil a la fitogenotecnia y agroindustria (Rivera *et al.* 1998).

El chocho es la leguminosa andina con mayor contenido de proteína (>40%), grasa de alta calidad, fibra, calcio, fósforo, hierro (90 ppm), y zinc (49 ppm) en el grano, convirtiéndose en un alimento estratégico para una población que aumenta aceleradamente (National Research Council 2009). Se estima que la deficiencia de zinc y hierro en humanos está considerada como la quinta y sexta causa respectivamente, de las diez principales enfermedades en países de bajos ingresos (WHO 2002). En el Ecuador la anemia constituye uno de los principales problemas de salud, (FUNDANEMIA 2006). El Ministerio de Inclusión Económica y Social (MIES) señala que en el año de 1988 en el país se reportaron deficiencias de Zn de hasta un 55% en menores de cinco años.

Con la expansión que los cultivos tendrán a futuro donde la disponibilidad de hierro y zinc no

serán ideales en los suelos por acción de un elevado pH y baja pluviosidad, se afectaría el vigor, producción, calidad y rendimiento de los cultivos. El desarrollo de plantas capaces de extraer de mejor manera estos microelementos por medio de la ingeniería genética y el fitomejoramiento sería una solución, sin embargo estos procedimientos llevan mucho tiempo y son costosos. Por el momento es posible corregir estas deficiencias en los cultivos haciendo aplicaciones con productos químicos a base de hierro y zinc (Abadía & Barton 2007). La forma más apropiada es mediante el uso de quelatos.

En el presente estudio se cuantificó la respuesta de seis líneas promisorias y el cultivar de chocho INIAP- 450 a la aplicación de distintas dosis de hierro y zinc solas y combinadas con el fin de encontrar poblaciones de lupino con potencial asimilación de estos microelementos, y de esta manera contribuir a la mejor calidad nutricional de los ecuatorianos.

2. METODOLOGÍA

2.1. Fase de campo

Seis semillas de siete genotipos de chocho (ECU 2700-2, ECU 8415, ECU 2659, ECU 2658, F8, ECU 712-1, ECU 722-4), fueron sembradas en macetas conteniendo un sustrato compuesto por turba, pomina y fibra de coco en relación 1:1:1 bajo condiciones de invernadero en la Carrera de Ciencias Agropecuarias de la Escuela Politécnica del Ejército, Ecuador. El ciclo de cultivo fue desde septiembre de 2008 hasta febrero de 2009. El riego se suministró a capacidad de campo cada dos o tres días.

La distribución de los tratamientos dentro de cada genotipo fue en un diseño de bloques completamente al azar (DBCA), una vez que aparecieron los primeros racimos florales a los 49 días posteriores a la siembra. Se realizó un raleo dejando solamente cuatro plantas por maceta. Se identificaron los tratamientos y se establecieron tres repeticiones por cada uno de ellos.

La primera medición, previo a la aplicación de los tratamientos, se realizó a los 79 días después de la siembra, en la hoja secundaria en relación al racimo floral, usando un cuantificador de clorofila de marca Opti- Sciences modelo CCM-200 y un fluorómetro de marca Opti- Sciences modelo OS-30p.

A los 80 días después de la siembra, se aplicaron los microelementos por aspersión en dosis de 0, 272, 545 ppm de hierro y zinc solas o combinadas. Mediante tres rociamientos de 2.95 ± 0.05 ml con un atomizador a cada una de las plantas de cada unidad experimental. Un cobertor de plástico evitó la dispersión del producto a plantas aledañas durante su aplicación.

Luego de tres días se midió por segunda vez el índice de contenido de clorofila y a los 18 días de la aplicación se midió la fluorescencia variable (fv/fm). La recolección gradual del material vegetal in vivo se realizó a los 122 días después de la siembra. Los brotes se cortaron a nivel del suelo, dividiéndolos en hojas y tallo (incluyendo el pecíolo). Cada tejido fue colocado en papel aluminio previamente etiquetado y rápidamente congelado en N₂ líquido para evitar la posible oxidación de Fe²⁺ a Fe³⁺. El material fue almacenado en un Bio Freezer de marca FormaScientific modelo CH/P a una temperatura de -60 ° C según el procedimiento de Katyal y Sharma (1980).

A los 50 días después de la aplicación foliar de los quelatos de Fe y Zn se tomaron los datos finales con ambos equipos.

2.2. Fase de laboratorio

Se elaboró una curva estándar de Fe (SO₄).7 H₂O. Se extrajo el Fe²⁺ de las muestras recolectadas anteriormente mediante el protocolo de Katyal y Sharma (1980). Cada muestra se colocó en un tubo de ensayo conteniendo 20 ml al 1.5% (p/p) de 1,10-Fenantrolina (en H₂O, ajustado a pH 3.0 con 1 M de HCl). Cada muestra fue filtrada a través de papel filtro Whatman No. 1 por alrededor de 16 horas a temperatura ambiental y la concentración de Fe²⁺ en el filtrado fue determinada en

un espectrofotómetro a una longitud de onda de 510 nm usando la curva de calibración de Fe (SO₄). 7 H₂O. El valor de Fe²⁺ en ppm fue ajustado mediante interpolación, para hoja y tallo.

3. RESULTADOS

3.1. Índice del contenido de clorofila (ICC)

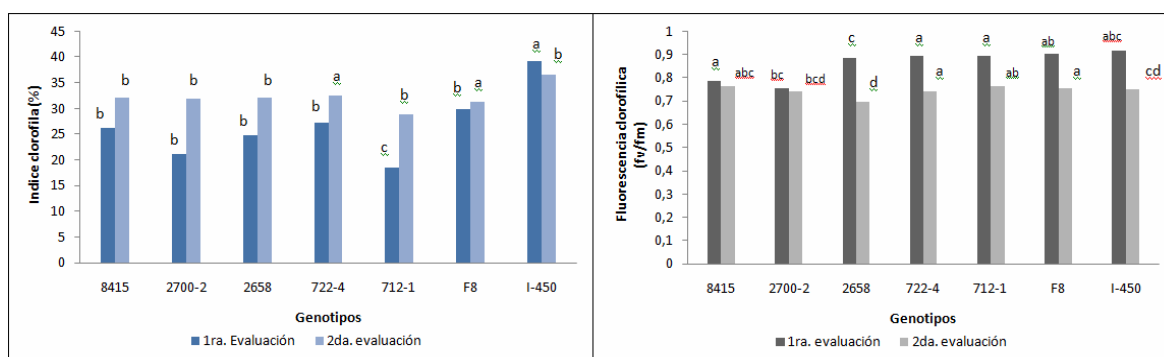
Se obtuvieron diferencias altamente significativas para genotipos ($F_{6,156} = 1260,89, p = 0.01$) antes de la aplicación de quelatos y genotipos (primera medición $F_{6,124} = 169,69, p = 0.01$; segunda medición $F_{6,124} = 436,488, p = 0.01$) y tratamientos (primera medición $F_{62,124} = 43,18, p = 0.01$; segunda medición $F_{62,124} = 136,70, p = 0.01$) luego de la aplicación. El cultivar INIAP- 450 obtuvo el mayor promedio de índice de clorofila (40,52 %) en la primera evaluación y la accesión ECU- 722-4 (31,42%) para la segunda aplicación (Fig. 1). El índice de clorofila se incrementó a medida que la dosis de Fe aumentó, de igual manera sucedió con la dosis intermedia de zinc (240 ppm), sin embargo cuando se superó esta dosis, se redujeron los niveles de clorofila en las hojas de chocho. Dosis combinadas de Fe₅₄₅ Zn₂₄₀ (38,20%) y Fe₅₄₅ Zn₀ (35,31%) resultaron en índices de clorofila altos (Duncan 5%); sin embargo cuando se superó esta dosis se redujeron los niveles de clorofila en las hojas de chocho. Dosis combinadas de Fe₅₄₅ Zn₀ y Fe₅₄₅Zn₂₄₀ resultaron en índices de clorofila altos (Duncan 5%).

Con respecto a los genotipos, el mejor tratamiento fue INIAP- 450 con la dosis combinada de Fe₅₄₅ Zn₂₄₀ ppm con un índice de 47,43% para la primera evaluación y de 30,60% para la segunda evaluación.

3.2. Fluorescencia variable (Fv/Fm)

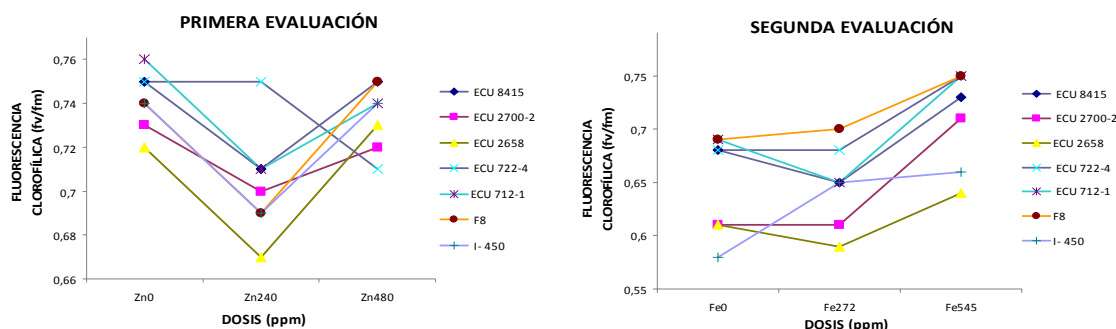
Se encontraron diferencias altamente significativas, para Fv/Fm ($F_{6,156} = 0.10, p = 0.01$) para genotipos antes de la aplicación de quelatos. Luego de la aplicación de los quelatos se obtuvieron diferencias altamente significativas para tratamientos, tanto para la primera ($F_{62,124} = 0.0034, p = 0.01$) como para la segunda evaluación ($F_{62,124} = 0.02, p = 0.01$) y para genotipos en las dos evaluaciones ($F_{6,124} = 0.036, p = 0.01$; $F_{6,124} = 0.04, p = 0.01$).

La accesión ECU- 722-4 obtuvo los valores de fluorescencia más altos después de la aplicación de quelatos en ambas evaluaciones (Fig.1). Conforme aumentó la dosis de Fe se obtuvieron mayores fluorescencias, mientras que dosis de Zn₀ y Zn₄₈₀ ppm determinaron la más alta fluorescencia, sin embargo, hubo una tendencia de disminución de fluorescencia a la dosis intermedia de Zn. Los genotipos ECU- 712-1 y ECU- 722-4 tuvieron la mayor fluorescencia (Fig. 2) a la dosis de 0 ppm de Zn₂₄₀ y 545 ppm de Fe en la primera y segunda evaluación respectivamente, Duncan ($p \leq 0.05$). La cruz F8 alcanzó la mayor fluorescencia variable, Duncan ($p \leq 0.05$) en la dosis combinada de Fe₀ y Zn₄₈₀ ppm.



Medias seguidas por la misma letra son estadísticamente iguales (Duncan $P \leq 0.05$)

Figura 1. Análisis comparativo del índice de clorofila y fluorescencia de 7 genotipos de chocho (*L. mutabilis* Sweet) durante dos evaluaciones.

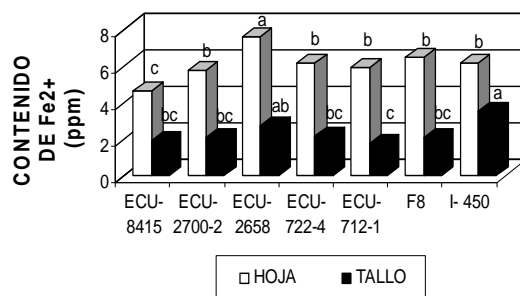


Medias seguidas por la misma letra son estadísticamente iguales (Duncan $P \leq 0.05$)

Figura 2. Efecto conjunto genotipo y dosis de quelato de Zn y de Fe en el radio de la fluorescencia variablesobre la máxima fluorescencia (fv/fm) en chocho (*L. mutabilis* Sweet) en la primera y segunda evaluación, respectivamente.

3.3. Contenido de Fe⁺² en hoja y tallo

Al realizar el ADEVA se presentaron diferencias altamente significativas en el contenido de Fe²⁺ para genotipos ($F_{6,124}=21,89$ $p = 0.01$; $F_{6,124}=9,78$ $p = 0.01$) y tratamientos ($F_{62,124}=9.98$ $p = 0.01$; $F_{62,124}=5.89$ $p = 0.01$) tanto en la hoja como en el tallo. El mayor contenido de ión ferroso está presente en la hoja (Fig. 3), la accesión ECU 2658 obtuvo el mayor promedio de hierro.



Medias seguidas por la misma letra son estadísticamente iguales (Duncan $p \leq 0.05$)

Figura 3. Análisis comparativo entre el contenido de Fe²⁺ en hojas y tallos de 7 genotipos de chocho (*L. mutabilis* Sweet).

La dosis de 272 ppm de Fe incrementó significativamente ($p \leq 0.05$) el contenido de hierro en el tallo. Al aumentar la dosis de Zn, el contenido del catión de Fe⁺² decreció significativamente ($p \leq 0.05$) en la hoja (Fig. 4). La mayor asimilación se obtuvo con la dosis más alta de Fe en ausencia de Zn (Fe₅₄₅Zn₀). Las accesiones ECU 2658 e I-450 ANDINO obtuvieron el mayor contenido Fe²⁺ Duncan 5% ($p \leq 0.05$) (Tabla 1).

4. DISCUSIÓN

Los genotipos de chocho no manifestaron similitud en los índices de clorofila, debido posiblemente a su habilidad propia de sintetizar clorofila. A medida que se incrementó la aplicación foliar de quelato de hierro en las plantas de chocho, aumentó el índice de clorofila tanto en la primera como en la segunda evaluación. Wiersma (2005) demostró que altas concentraciones de clorofila relativa (lecturas SPAD) se obtuvieron en plantas de soya en respuesta al primer incremento de quelato de Fe.

En el caso del zinc, el índice de clorofila aumentó mientras se adicionó este microelemento. El Zn es necesario para la síntesis de clorofila y formación de carbohidratos (Fagro 2008). Sin embargo,

Tabla 1. Efecto de dosis de Fe y Zn sobre el contenido de Fe²⁺ en hojas y tallos en 7 genotipos de chocho (*L. mutabilis* Sweet).

TRATAMIENTOS		Ppm Fe ²⁺ (X) HOJA		TRATAMIENTOS		Ppm Fe ²⁺ (X) TALLO	
ECU-2658	Fe ₀ Zn ₀	15.11	a	I-450	Fe ₂₇₂ Zn ₄₈₀	7.16	a
ECU-722-4	Fe ₅₄₆ Zn ₀	8.89	b	ECU-2700-2	Fe ₅₄₆ Zn ₀	4.91	ab
ECU-712-1	Fe ₅₄₆ Zn ₀	8.89	b	ECU-2658	Fe ₂₇₂ Zn ₄₈₀	4.84	abc
ECU-2700-2	Fe ₀ Zn ₂₄₀	8.14	bcd	ECU-722-4	Fe ₂₇₂ Zn ₄₈₀	4.29	b-g
(ECU 2658 X ECU 8415)	Fe ₂₇₂ Zn ₄₈₀	7.96	bcde	ECU-8415	Fe ₂₇₂ Zn ₄₈₀	4.29	b-g
I-450	Fe ₂₇₂ Zn ₀	7.71	b-g	(ECU 2658 X ECU 8415))	Fe ₂₇₂ Zn ₄₈₀	4.64	abcd
ECU-8415	Fe ₅₄₆ Zn ₀	7.18	b-j	ECU-712-1	Fe ₂₇₂ Zn ₄₈₀	3.58	b-k
ECU-8415	Fe ₅₄₆ Zn ₄₈₀	1.25	n	ECU-712-1	Fe ₀ Zn ₀	0.37	l

el nivel de Zn decreció cuando la concentración de Fe fue alta. Foy et al. (1998); Alam et al. (2000); Pedler et al. (2000); Patsikka et al. (2002) han demostrado que las plantas a menudo exhiben síntomas de “deficiencia inducida al hierro” cuando crecen bajo excesivas concentraciones de otros metales pesados tales como Zn, Mn, Cu, y Ni.

La eficiencia fotosintética cuantificada como fluorescencia clorofílica aumentó mientras hubo la presencia de Fe. Cavender-Bares (1999) en estudios realizados en fitoplancton determinó que la concentración de pigmentos celulares aumentó, así como la fluorescencia clorofílica en respuesta al tratamiento con Fe (2, 3 y 4 nM).

Estudios realizados por Mostafa (1993) en alga intacta (*Chlorella fusca*) confirman que bajo el efecto de distintas concentraciones de zinc se obtiene un efecto inhibitorio en la actividad del fotosistema II en los sitios de oxidación, concluyendo que los centros de reacción y la fotoquímica del FSII son inactivados por este elemento.

El contenido de ión ferroso fue afectado por la dosis media de quelato de hierro. Se ha evidenciado que al aplicar varias dosis de quelatos de Fe-EDDHA mediante inyección al suelo en durazneros (10, 20 y 40 g x árbol⁻¹) el contenido de hierro activo (Fe²⁺) aumentó en hojas conforme la dosis de hierro aumentó (Gil-Ortiz y Bautista-Carrascosa 2005). Por otro, las aplicaciones foliares de Zn (0, 0.35, 3.5 mmol L⁻¹) en tomate (*L. esculentum* L.) demuestran que la mayor reducción de Fe total ocurre por altas aplicaciones foliares de zinc (3.5 mmol l⁻¹) produciendo niveles deficientes de Fe (Kaya y Higgs 2002; Adams 1986; Kaya et al. 1999).

Los genotipos de chocho en estudio mostraron la capacidad de protegerse asimismo contra altas concentraciones de zinc y acumularon importantes concentraciones de Fe²⁺ en este tejido. Se recomienda estudiar concentraciones más bajas de estos quelatos en esta leguminosa andina.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Carrera de Ciencias Agropecuarias por las facilidades prestadas a este proyecto, a la ESPE por el financiamiento, al Ing. Juan Tigrero por sus ideas para el establecimiento de los ensayos de invernadero.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Abadía, J. Barton, L. 2007. Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms. The Netherlands. 477 p. ISBN 978-1-4020-4742-8 (HB).
- Adams, P. 1986. Mineral Nutrition. In: Atherton, J. Rudich, J. (Eds.). The Tomato Crop. Chapman and Hall, London. pp. 281-334.
- Alam, S. Kamei, S. Kawai, S. 2000. Phytosiderophore release from manganese-induced iron deficiency in barley. J. Plant Nutr. 23:1193-1207.
- Cavender-Bares K.K. Mann E.L. Chrisholm S.W. Ondrusek M.E. and Bidigare R.R. 1999. Differential response of equatorial Pacific phytoplankton to iron fertilization. Limnology and Oceanography 44:237-246.
- Fagro. 2008. Farmacia Agroquímica de México. Fertilizante líquido multiquelutado alto en zinc y boro. MX. . <http://www.scribd.com/doc/6582551/Ficha-de-Producto-Fagro-Kelatopzincboro>
- Foy, C. Farina, M. Oakes, A. 1998. Iron and manganese interaction among clones of nilegrass. J. Plant Nutr. 21:987-1009.
- FUNDACIÓN ECUATORIANA CONTRA LA ANEMIA. 2006. Estadísticas de Anemia en el Ecuador. Quito, EC. http://www.fundanemia.org.ec/estadisticas_ec.htm
- Gil-Ortiz, R. Bautista-Carrascosa, I. 2005. Response of leaf parameters to soil applications of iron-EDDHA chelates in a peach orchard affected by iron chlorosis. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 36:1839-1849.
- GOBIERNO NACIONAL DE LA REPÚBLICA DEL ECUADOR. 2008. Ministerio de Inclusión Económica y Social. Programa Aliméntate Ecuador. Nutrición. Ecuador. http://www.alimentateecuador.gov.ec/index.php?option=com_content&task=blogcategory&id=8&Itemid=28.
- Kaya, C. Higgs, D. 2002. Response of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) cultivars to foliar application of zinc when grown in sand culture at low zinc. Scientia Horticulturae 93, 53-64.
- Kaya, C. Higgs, D. Burton, M. 1999. Foliar application of iron as remedy for zinc toxic tomato plants. J. Plant Nutr., 22 (12):1829-1837.
- Katyal, J.C. Sharma, B.D. 1980. A new technique of plant analysis to resolve iron chlorosis. Plant and Soil, 55:105-119.
- Jacobsen, S. Sherwood, S. 2002. Cultivo de granos andinos en Ecuador. Informe sobre los rubros quinua, chocho y amaranto. Abya-yala. Quito, EC., pp. 90
- Mostafa, M. 1993. Quenching of the variable fluorescence induced by zinc in the green alga *Chlorella fusca*. Botany Department. Faculty of Science. Tanta University. Tanta. Egypt.
- National Research Council 2009. Lost crops of the Incas – Little known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation. Washington D.C., pp.180-189. http://orsted.nap.edu/openbook.php?record_id=1398&page=181.
- Patsikka, E. Kairavuo, M. Sersen, F. Aro, E. Tyystjarvi, E. 2002. Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition in vivo by outcompeting iron and causing decrease in leaf chlorophyll. Plant Physiol., 129:1359-1367.
- Pedler, J. Parker, D. Crowley, D. 2000. Zinc deficiency-induced phytosiderophore release by the Tricaceae is not consistently expressed in solution culture. Planta, 211:120-126.
- Rivera, M. Pinzón, J. Caicedo, C. Murillo, A. Mazón, N. Peralta, E. 1998. Catálogo del Banco de Germoplasma de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) y otras especies de lupinos. Programa Nacional de Leguminosas, Departamento Nacional de Recursos Filogenéticos. Quito, EC. Estación Experimental Santa Catalina, pp. 53.
- Wiersma, J. 2005. High Rates of Fe-EDDHA and Seed Iron Concentration Suggest Partial Solutions to Iron Deficiency in Soybean. Agronomy Journal, 97:924-934.
- World Health Organization (WHO). The World Health Report. 2002. Geneva: WHO. 2002.

Obtención de bioetanol anhidro usando desechos sólidos orgánicos

L. H. Cumbal

*Centro de Investigaciones Científicas, Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador.
Departamento de Ciencias de la Vida, Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador
luis.cumbal@espe.edu.ec*

J. C. Vásquez

Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Escuela Politécnica de Ejército, Sangolquí, Ecuador

RESUMEN: La mayor parte de la energía que se genera en el mundo es quemando combustibles fósiles que causan calentamiento global por la emisión de gases de efecto invernadero. Por las graves afectaciones del calentamiento global, una gran cantidad de investigadores han orientado sus esfuerzos a la búsqueda y posterior producción de combustibles alternativos. En este contexto, el presente proyecto explora la posibilidad de producir etanol anhidro a partir de desechos orgánicos domésticos. Este combustible fue obtenido en el laboratorio, aplicando diferentes tratamientos en las etapas de hidrólisis, fermentación y destilación. En la hidrólisis se trabajó con 6 g. de biomasa a 30° C y sin luminiscencia y se produjo un promedio de azúcares reductores de 61,5 g/L. En la fermentación, se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y se obtuvo etanol con una pureza del 11,90% (v/v). La destilación con 0,1 g de CaCl₂/mL produjo etanol con el 99,6% (v/v) de pureza. Los tratamientos que presentaron mayor eficiencia fueron escalados a un piloto y los resultados de los ensayos fueron similares a las pruebas a nivel de laboratorio.

ABSTRACT: Most of energy world-wide is generated burning fossil fuels that cause global warming due to greenhouse gas emissions. Because of the catastrophic effects coming from the global warming, a number of researchers have aimed their efforts to the search and production of alternative fuels. In this sense, this project explores the option of producing anhydrous ethanol from solid organic wastes. This fuel was produced in the laboratory by applying different treatments during hydrolysis, fermentation, and distillation stages. Hydrolysis with 6 g of waste biomass produced an average of 61.5 g/L of reducing sugars at 30°C in a process without light supply. Fermentation, using *Saccharomyces cerevisiae*, produced 11.90% (v/v) of ethanol. The distillation process with 0.1g CaCl₂/mL produced 99.6% (v/v) of ethanol. Treatments with higher performance were scaled up to a pilot plant and their results were similar to those achieved in the laboratory experiments.

1. INTRODUCCIÓN

El etanol; no sólo es el producto químico orgánico sintético más antiguo que ha sido empleado por el hombre, sino también uno de los más importantes (IICA 2004). Sus usos más comunes están en la industria, medicina y domiciliaria. El etanol es el componente activo esencial de las bebidas alcohólicas (García & García 2006) y en la actualidad varios países lo destinan a otros procesos químicos (Waites et al. 2001). Por otra parte, el bioetanol es el combustible alternativo con mayor producción mundial, en total se produjeron en el año 2007, 39,5 millones de toneladas (IICA 2008). Diversas fuentes de información indican que la producción de bioetanol es dominada por Estados Unidos con 19,5 millones de toneladas, seguido por Brasil con 14,9 millones, la Unión Europea con 1,8 millones y China con 1,27 millones. La producción de etanol puede darse de dos maneras fundamentalmente: por hidratación de etileno (síntesis química) o bien por fermentación (Abtahi 2008). La producción de etanol vía fermentativa utiliza varias materias primas con en alto contenido de azúcares, almidón y celulosa. Así, el proceso de fermentación alcohólica a partir de materiales celulósicos requiere de tres pasos básicos: i) hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa, en este paso se obtiene azúcares fermentables, a través de enzimas (amilasas) provenientes de

microorganismos (Quintero 1981). ii) fermentación mediada por levaduras. En este proceso se convierten los azúcares fermentables del mosto en etanol y CO₂. Sin embargo, este proceso puede generar compuestos organolépticos tales como alcoholes, ésteres, aldehídos y cetonas, compuestos sulfurados y ácidos orgánicos (Leveau & Bouix 2000), los que pueden variar en función del tipo de materia prima, tiempo, temperatura, etc. y iii) destilación, en esta etapa se separa el etanol de la mezcla etanol-agua mediante calentamiento. Desafortunadamente, la destilación convencional llega a un límite de separación, condición en la que la mezcla etanol-agua alcanza la composición azeotrópica (Kosaric et al. 1987). Por consiguiente, para mejorar la pureza del etanol, se emplea un proceso de destilación extractiva con efecto salino, el cual provoca la ruptura del azeótropo y los componentes deseados se pueden separar más fácilmente.

El proyecto PERSEO propone la producción de etanol a partir de una fracción de los desechos sólidos urbanos, que generalmente están compuestos por materiales lignocelulósicos. Estos compuestos pueden ser fermentados para obtener bioetanol, separando la lignina y el residuo sólido puede ser usado en la cogeneración de energía requerida en el proceso (Castañeda et al. 2007). Por otra parte, en la Universidad de Osaka, Japón, se ha producido bioetanol por hidrólisis y fermentación utilizando ácido diluido y la cepa etanológica recombinante *Escherichia coli* KO11, respectivamente, con grandes éxitos (Breijó & Yúfera 1989). Adicionalmente, en proyecto colaborativo entre la Universidad Tecnológica Chalmers de Suiza, la Universidad de Matanzas de Cuba y el Laboratorio Nacional Riso de Dinamarca, se ha estudiado la aplicación de cepas del hongo *Mucor indicus* como fermentador de azúcares contenidos en materiales lignocelulósicos con buenos rendimientos en la producción de etanol (Carlile et al. 2001). En el Ecuador, el Área de Levaduras del Laboratorio de Bioquímica, de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, se encuentra desarrollando el proyecto CELULOL, que tiene como objetivo impulsar la producción de bioetanol empleando papel reciclado como materia prima (Carvajal 2008). El presente proyecto explora procesos amigables y no costosos para la obtención de bioetanol anhidro. La investigación experimental emplea agentes biológicos derivados de microorganismos, eliminando de esta forma los problemas ambientales que generados por la desintoxicación de los hidrolizados químicos y no pone en riesgo la seguridad alimentaria porque utiliza desechos orgánicos como materia prima.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Pretratamiento de la materia prima

La materia prima utilizada en el estudio es aquella que presentó coloración uniforme, no tuvo deterioros ni alteraciones externas. Esta materia prima fue lavada y posteriormente triturada en un procesador de alimentos OSTER con el fin de obtener partículas del menor tamaño posible y faciliten la penetración del agua. El material obtenido, fue secado en la estufa EQUATHERM a 70° C por 48 h y triturado nuevamente en el procesador de alimentos. Este material particulado fue almacenado herméticamente en un lugar fresco y seco para evitar contaminación cruzada.

2.2 Crecimiento del microorganismo *Mucor sp.*

Se utilizaron los tres medios de cultivo líquidos para el crecimiento del hongo *Mucor sp.* (Tabla 1). Los reactivos fueron disueltos dependiendo de su grupo químico y posteriormente fueron mezclados. El pH del medio de cultivo resultante fue ajustado según su especificación. El medio contenido en erlenmeyers fue luego autoclavado, inoculado e incubado a 30° C por 120 h y 150 rpm de agitación. Transcurrido el tiempo de incubación, el contenido de los frascos se filtró y se procedió a cuantificar la biomasa húmeda.

2.3 Ensayo de hidrólisis

La hidrólisis se llevó a cabo inoculando el hongo en la materia prima contenida en 100 mL del medio. El proceso duró 96 h con agitación a 180 rpm. En la determinación de los parámetros a ser usados en la hidrólisis, se procedió en primer lugar a establecer el efecto de la luminiscencia bajo condiciones de presencia o ausencia de luz. A continuación, se procedió a establecer la influencia

de la temperatura fijando tres temperaturas: 20° C, 30° C y 40° C. Finalmente, se examinó el efecto de la cantidad de materia prima, experimentando con cinco cantidades de materia: 2g, 4g, 6g, 8g, y 10g. Se determinó que el más alto porcentaje de hidrólisis se logra con 6 g de biomasa, temperatura de 30°C y sin luminiscencia.

2.4 Ensayos de fermentación

La fermentación se llevó a cabo usando 300 mL del medio proveniente de la hidrólisis en erlenmeyers sellados herméticamente con tapones provistos de dos salidas, uno para la extracción de muestras y otro para la salida de gases. En la experimentación se utilizaron dos microorganismos. El hongo *Mucor sp* fue cultivado anaerobicamente a 30° C y con agitación a 150 rpm. En cambio la levadura *S. cerevisiae* marca Levapan, fue activada con una solución de glucosa 0,08% (p/v), 0,15 g de levadura y 1,105 g de mezcla nutricional (pH 7 ± 0,2) durante 15 min en condiciones aerobias. Una vez que se fijó la temperatura del hidrolizado en 30° C, se inoculó 1% (v/v) de levaduras activadas. Transcurridos las 192 h de fermentación se filtró para retener el material sólido, y la extracción de etanol se realizó mediante centrifugación a 2000 rpm por 10 min almacenando el sobrenadante en refrigeración para un posterior análisis de compuestos volátiles.

2.5 Ensayos de destilación

Se emplearon tres tipos de destilación: simple, fraccionada y extractiva. La destilación simple se condujo con una unidad de refrigeración horizontal, manteniendo la temperatura de 78° C hasta alcanzar el punto de ebullición del etanol, el destilado fue sometido a una destilación fraccionada y finalmente 30 mL de solución de etanol enriquecido fueron destilados extractivamente usando 0,1 mg/L de tres sales anhidras, cloruro de calcio (CaCl₂), acetato de sodio (NaCOOCH₃) y cloruro de magnesio (MgCl₂). El destilado recogido en cada etapa fue caracterizado por cromatografía de gases.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo usados en la experimentación

MEDIO 1 (García & Nickerson, 1962)		MEDIO 2 (Abtahi, 2008)		MEDIO 3 (Bialozynski, 2007)	
Compuesto	Concentración	Compuesto	Concentración	Compuesto	Concentración
H ₂ O	100 mL	H ₂ O	100 mL	H ₂ O	100 mL
C ₆ H ₁₂ O ₆	2 g	C ₆ H ₁₂ O ₆	2 g	PDA	1,22 g
KH ₂ PO ₄	0,3g	E. Levadura	0,5 g		
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g	(NH ₄) SO ₄	0,74 g		
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,18 mg	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,075 g		
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1 mg	KH ₂ PO ₄	0,35 g		
MnSO ₄ .H ₂ O	0,3 mg	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1 g		
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,04 mg	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,09 g		
Tiamina	0,1 mg	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,06 g		
A. Nicotínico	0,1 mg	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,006 g		
	pH 4,5 ± 0,2		pH 5,5 ± 0,2		pH 6,6 ± 0,2

2.6 Análisis estadístico

En el modelamiento estadístico, se empleó la estadística descriptiva que evalúa los resultados obtenidos en los ensayos realizados con tres repeticiones a fin de establecer la significancia entre los datos. Los datos se trataron mediante análisis de varianza (ANOVA) usando el software SPSS.

2.7 Producción de etanol en pruebas piloto

Tomando como referencia el rendimiento obtenido en los ensayos de laboratorio, se realizó un escalado del mejor tratamiento. La hidrólisis se llevó a cabo con 80 g de biomasa con 4 L del medio de cultivo. En tanto que la fermentación se condujo con 4 L del medio hidrolizado con 4 mL

de levaduras activadas. La destilación fue conducida bajo condiciones similares a las descritas en la sección 2.5.

2.8 Métodos analíticos

Para la medición de pH se empleó un pHmetro de mesa Mettler Toledo MX300 y en la medición de la temperatura se empleó un termómetro de digital de 20° C a 120° C. La cuantificación de azúcares se realizó con el método de Fehling con la glucosa como estándar y para la medición de la biomasa se empleó el método gravimétrico.

Los compuestos volátiles fueron analizados utilizando un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Autosystem con detección de ionización en llama (FID), columna Porapak Q con 95% de etilvinilbenzol y 5% de divinilbenzol, temperatura del inyector 190° C. La temperatura del detector se fijó en 185° C y flujo del gas de arrastre en 21,6 mL/min. Para el análisis, las muestras fueron filtradas con filtros millipore de 2 mm de diámetro y 0,22 µm de poro, diluidas en una relación 1:6 con agua destilada e inyectadas automáticamente al cromatógrafo (1,0µL/muestra). Para el procesamiento de los cromatogramas se empleó el programa Turbochrom Navigator Versión 4.1 y el área de los picos fue calculada por integración.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Microorganismo *Mucor sp.*

El análisis de varianza realizado con los resultados del crecimiento del hongo *Mucor sp.*, reveló una diferencia estadística entre los tratamientos, por lo que se procedió a analizarlos con la prueba de Tukey al 5%. Esta prueba estableció dos rangos de significancia (Tabla 2). El mejor tratamiento fue aquel que usó el Medio 2, cuyo promedio de biomasa húmeda generada fue de 0,378 g/g (Tabla 2). Se nota claramente que la relación entre el hongo y los nutrientes tiene una alta significancia, confirmando el hecho de que los microorganismos interactúan con el ambiente, de manera que su adaptación dependerá de las condiciones nutritivas del medio como reportan Bartnicki & Nickerson (1962). Por otra parte, en este estudio, se establece que el medio de cultivo para el hongo debe contener MgSO₄·7H₂O y KH₂PO₄ en concentraciones de 0,75 y 3,5 g/L, respectivamente; en cambio el (NH₄)₂SO₄ y la glucosa son la fuente de nitrógeno y carbono, respectivamente. Además, metales traza como el zinc, hierro, cobre y calcio son requeridos como cofactores de enzimas y otras proteínas funcionales, y las vitaminas como la tiamina o el ácido nicotínico son necesarios para apoyar el crecimiento anaerobio del hongo. Sues et al. (2005) reportan en su estudio que el extracto de levadura es el suplemento más eficiente, mientras que la adición de vitaminas al medio tiene un efecto insignificante debido a que éstas (tiamina o biotina, miembros del complejo B solubles en agua, esteroides, ácidos grasos, purinas y pirimidinas e inositol) son sintetizadas por *Mucor sp.* De los tres medios utilizados en la investigación se nota que el mejor tratamiento se consigue con el Medio 2, el cual genera un promedio de biomasa húmeda de 0,378 g/g.

3.2 Ensayo de Hidrólisis

El estudio sobre el efecto de la luminiscencia mostró una igualdad estadística entre tratamientos (Tabla 2), por lo que se cree que la iluminación no es un parámetro que influye en la hidrólisis enzimática. Carlile et al. (2001) reportan que *Mucor sp.*, dependiendo de la cantidad de luz, temperatura y humedad, puede producir solo micelio. En este estudio se comprobó, que los ensayos de hidrólisis con ausencia de luz, produjeron únicamente micelio, componente principal del proceso de hidrólisis.

En cambio, los resultados experimentales muestran que la temperatura tiene una alta significancia (Tabla 2), confirmando el hecho de que la hidrólisis depende de las condiciones físicas como lo reportan Ingensson et al. (2002). Estos autores señalan que la hidrólisis producida por *Mucor sp.* es más estable a bajas temperaturas de reacción (25° - 30° C). En este rango de temperatura la velocidad de reacción de la hidrólisis aumenta, originando un mayor importe de energía cinética a los reactivos y en consecuencia ayuda alcanzar el nivel de energía de activación

óptimo. Además, la adaptación del hongo a esta temperatura es favorable, pues ésta es similar a la temperatura de su hábitat natural (temperatura del suelo en el Valle de los Chillos varía entre 10 y 30° C), según reportan Breijo & Yúfera (1989).

El estudio sobre el efecto de la cantidad de biomasa se realizó usando un análisis de variancia con los datos experimentales. El análisis estadístico muestra una diferencia altamente estadística, por lo que se procedió a analizar los datos con la prueba de Tukey al 5%. Como resultado, los datos se agrupan en cuatro rangos de significancia (ver Tabla 2). El mejor tratamiento se logra con 6 g. de biomasa. Con este tratamiento se produce un promedio de azúcares reductores de 40.33 g/L (Tabla 2). De manera que la cantidad de biomasa sí influye en el proceso hidrolítico, confirmando la existencia de una tolerancia al sustrato por parte del hongo. Thomsen et al. (2006) indican que el hongo *Mucor sp.* no tolera concentraciones de biomasa de más del 50%. Por su parte, Lynd et al. (2001), Joseleau et al. (1992) y Pérez et al. (2002) señalan que este comportamiento puede ser atribuido a la resistencia mecánica y biológica que opone la biomasa a la hidrólisis. Además, Kosaric et al. (1987) reportan que a concentraciones de sustrato muy altas, se presentan problemas de respiración en los microorganismos y la presión osmótica sobre sus paredes celulares es muy grande, por lo que disminuyen su eficiencia. De manera que la combinación de factores para alcanzar la mayor cantidad de azúcares reductores (40,33 g/L) a las 48 horas de hidrólisis, es aquella que emplea 6 g de materia prima, 30° C y no emplea luz.

Tabla 2 Prueba de Tukey al 5% para los resultados obtenidos en las pruebas de laboratorio.

ENSAYO	UNIDAD	EFFECTO A ESTUDIAR	TRATAMIENTO	MEDIA	RANGO SIGNIFICANCIA	OBSERVACIÓN		
Microorganismo <i>Mucor sp.</i>	Biomasa (g/g)	Medio de cultivo líquido	Medio 1	0,0	A	Diferencia estadística alta		
			Medio 2	0,378	B			
			Medio 3	0,087	A			
Hidrólisis	Azúcares reductores (g/L)	Luminiscencia	Con luz	35,4	A	Igualdad estadística		
			Sin luz	36,73	A			
			Temperatura	20° C	22,06		A	Diferencia estadística alta
				30° C	34,73		B	
				40° C	20		A	
		Cantidad de biomasa	2 g	34,73	B	Diferencia estadística alta		
			4 g	39,13	C			
			6 g	40,33	D			
			8 g	26,46	A			
			10 g	32,93	B			
Fermentación	Pureza etanol [% (v/v)]	Microorganismo fermentador	<i>Mucor sp.</i>	5,12	A	Diferencia estadística alta		
			<i>S. cerevisiae.</i>	11,90	B			
Deshidratación	Sal anhidra		CaCl ₂	99,63	A	Diferencia estadística alta		
			MgCl ₂	98,5	B			
			NaCOOCH ₃	98,1	B			

3.3 Ensayo de fermentación

El análisis estadístico indica que la levadura *S. cerevisiae.* es el microorganismo fermentador que produce una mayor cantidad de etanol (11.9% (v/v)). Aunque se utilizó *Mucor sp.* sin, los resultados de los ensayos muestran que su fermentación es menos eficiente. Herrero & Gómez (1980) también encontraron que los procesos de fermentación utilizando *Mucor sp.* son lentos (3 – 12 d) y exhiben una pobre producción de etanol (0,8 – 60 g/L). Estos resultados pueden estar asociados con la baja tolerancia del microorganismo a la glucosa y al etanol en condiciones anaerobias. En cambio, Lin & Tanaka (2006) y Caylak & Vardar (1996) demostraron que *S. cerevisiae.* fue capaz de producir etanol a partir de glucosa en cuatro días con una producción aproximada de 96 g/L. Adicionalmente, la aplicación de nutrientes beneficia al crecimiento de *S. cerevisiae* durante la fermentación. Berry & Brown (1897) reportan que las levaduras utilizan la mayoría de aminoácidos como fuente de nitrógeno, sin embargo las tasas de crecimiento dependen

de las características de cada aminoácido y que la mezcla de diferentes tipos de aminoácidos proporciona un mejor crecimiento que un aminoácido solo.

3.4 Destilación

En la Tabla 3 se observa que la destilación simple produce concentraciones promedio de etanol del 35.1%. Mientras que con la aplicación de una etapa de destilación fraccionada, el contenido de etanol se incrementa al 65.27%. Un incremento adicional en la pureza del alcohol se logra con una segunda etapa de enriquecimiento por destilación fraccionada (95.7%). Aunque se condujo una tercera etapa de destilación, ésta sirvió únicamente para comprobar que se alcanzó el punto azeotrópico, bajo las condiciones del ensayo. Los concentrados finales fueron sometidos a una etapa de destilación extractiva. Los resultados revelan una diferencia altamente estadística proporcionando dos rangos de significancia (Tabla 2). La mayor pureza se obtuvo usando CaCl_2 con un promedio de concentración de etanol del 99.63% (v/v), confirmando que la naturaleza higroscópica de la sal, la vuelve mayormente susceptible a la hidratación. Perry et al. (2001) explican que la adición de sales iónicas no volátiles y solubles, logran modificar el comportamiento de la fase líquida que contiene etanol y agua y aumenta de la volatilidad relativa de la mezcla. Vásquez et al. (2006) añaden que los iones de las sales tienen mayor afinidad por las moléculas más polares como las del agua y debido a este fenómeno la selectividad y magnitud del efecto de la sal sobre la composición de la fase de vapor depende de la diferencia de solubilidades individuales de la sal y de los componentes líquidos.

Tabla 3 Resultados obtenidos en los procesos

PRUEBA	TIPO	MEDIA VOLUMEN (mL)	PUREZA MEDIA DE ETANOL (% (v/v))
Laboratorio	Simple	497,67	35,10
	Fraccionada I	180,67	65,27
	Fraccionada II	112,67	95,70
	Fraccionada III	109,67	95,77
Piloto	Simple	123	30,6
	Fraccionada I	47	66,7
	Fraccionada II	29	95,7
	Fraccionada III	26,7	95,8
	Deshidratación (CaCl_2)	23	99,6

3.5 Producción de bioetanol en pruebas piloto

Los tratamientos hidrolíticos y fermentativos de más alto rendimiento, se escalaron a un prototipo a nivel de laboratorio. La contribución de la materia prima se escaló manteniendo una linealidad con un factor de 13 (80 g). Para escalar el volumen (4000 mL), se consideró además de los 3900 mL, las pérdidas de volumen por evaporación durante la fermentación pero como este proceso se realiza a 30°C solamente se añadieron 100mL. La Tabla 4 resume las sustancias utilizadas en los ensayos piloto de hidrólisis y fermentación. Mientras que para el proceso de deshidratación con sales anhidras, se empleó aquel tratamiento que produjo la mayor concentración de etanol.

Concluida las 24 h de hidrólisis, se obtuvo una concentración promedio de azúcares reductores de 62,5 g/L. La elevada producción de azúcares en el ensayo piloto puede atribuirse al incremento de la velocidad de agitación. Esta condición produjo una tasa de rendimiento más alta pues la interacción de la biomasa con el medio es mejor. La fermentación luego de 192 h produjo una concentración de etanol de 11,88% (v/v), confirmandose los resultados de los ensayos de laboratorio.

En las pruebas piloto, la destilación simple alcanzó un grado de pureza de 30.6% (v/v) de etanol, mientras que con la destilación fraccionada se logró una pureza del 95.8% (v/v). La deshidratación con CaCl_2 alcanzó 23 mL de etanol al 99,6% (v/v).

Tabla 4 Niveles aplicados en la fase piloto.

ETAPA	CARACTERISTICAS
Hidrólisis	80 g de biomasa – sin luminiscencia – 30° C – 48 horas
Fermentación	1,65 g de levaduras - 12,155 g de mezcla nutritiva
Deshidratación	0,1 g de CaCl ₂ /mL

4. CONCLUSIONES

El medio de cultivo para *Mucor sp.* debe contener a la glucosa y (NH₄)₂SO₄ como fuentes de carbono y nitrógeno, concentraciones estándar de MgSO₄.H₂O y KH₂PO₄, concentraciones traza de zinc, hierro, cobre y calcio como cofactores de enzimas y otras proteínas y extracto de levadura como suplemento.

El hongo *Mucor sp.* muestra que tiene la habilidad de atacar sustratos refractarios como la celulosa mediante procesos amilo (amilasas) a una temperatura de 30° C y 6 g de biomasa, en donde después de 48 h de incubación, se alcanza una cantidad de azúcares reductores de 40,33 g/L.

S. cerevisiae. es el microorganismo con mejores características de fermentación en condiciones anaerobias a partir del hidrolizado de *Mucor sp.* con la adición de 1% (v/v) de levaduras activadas (solución de glucosa al 0,08% (p/v), 0,15 g de levadura y 1,105 g de mezcla nutricional).

Luego de 192 h de fermentación la producción de etanol alcanza un rendimiento de 11,9% (v/v). Este rendimiento es superior a los obtenidos industrialmente. Este hecho puede atribuirse a las condiciones de asepsia con que se desarrolla el proceso de fermentación en el laboratorio, así como al pequeño volumen de etanol procesado en las unidades experimentales.

Los ensayos de destilación muestran que con destilación simple se puede obtener concentraciones de etanol del 35,1% (v/v). Mientras aplicando destilación fraccionada, el contenido de etanol se incrementa al 65,27% (v/v). Un incremento adicional se logra con una segunda etapa de enriquecimiento por destilación fraccionada 95,77% (v/v). La adición de 0.1 g de CaCl₂/mL de solución de alcohol, alcanza una concentración de etanol del 99,63% (v/v) debido a una mejor ruptura del azeótropo etanol – agua.

Los resultados de las pruebas piloto indican que existe una producción 23 mL de etanol al 99,6% (v/v). En términos de masa, la producción fue de 11,88 g/80 g de biomasa con una eficiencia total del 14,85%.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su gratitud al Centro de Investigaciones Científicas de la Escuela Politécnica del Ejército por el apoyo brindado a esta investigación.

5. REFERENCIAS

- Abtahi, Z. 2008. Ethanol and glucose tolerance of *M. indicus* in aerobic and anaerobic conditions. University College of Borás.
- Bartnicki-Garcia, S., Nickerson, W. 1962. Nutrition growth and morphogenesis on *Mucor rouxii*. J. Bacteriol., 84:841-858.
- Berry, D., Brown, C. 1987. Physiology of the yeast growth. In: Berry, D.R.; Russel, I.; Steward, G.G., Yeast Biotechnology, Allen and Unwin, London, pp. 159.
- Bialozynsky, R. 2007. Etanol production from biomasa. Pulaski SSA Chapter. Ag. Science Fair.
- Breijó, F., Yúfera, E. 1989. Alcohol de biomasa. III. Hidrólisis de la fracción lignocelulósica obtenida de residuos agrícolas y cosechas de sorgo. Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment., 29 (4):501-509.
- Castañeda, R., Coll, C., Signes, V. Ballesteros, M. 2007. Proyecto PERSEO: Innovación tecnológica para el bioetanol de segunda generación. Revista técnica de medio ambiente, 20(121):50-57
- Carlile, M., Watkinson, S., Gooday, G. The fungi. 2nd Edition, Academic Press, Reading RG7 1AG, UK. 2001.
- Carvajal, J. 2008. Bioetanol Lignocelulósico y Switchgrass. BiodieselSpain.com.

- Caylak, B., Vardar, S. 1996. Comparison of different production processes for bioethanol. *Turk J. Chem.*, 22:351-359.
- García, C. J., García, L. J. 2006. *Biocarburantes Líquidos: Biodiésel y Bioetanol*. (Informe de Vigilancia Tecnológica). España. Universidad Rey Juan Carlos.
- IICA. 2004. *Cadena Industrial: Etanol*. Nicaragua.
- Ingensson, H., Zacchi, G., Yang, B., Esteghlalian, A., Saddler, J. 2001. The effect of shaking regime on the rate and extent of enzymatic hydrolysis of cellulose. *J. Biotechnol.*, 88:177-182.
- Joseleau, J., Comtat, J., Ruel, K. 1992. Chemical structure of xylems and their interaction in the plant cell walls. *FEMS Microbiology Reviews*, 13(2-3):255-263.
- Kosaric, N. et al. 1987. Ethanol. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, A9: 587-653. Editorial Hans-Jürgen Arpe.
- Leveau, J., Bouix, M. 2000. *Microbiología Industrial: Los microorganismos de interés industrial*. Zaragoza-España, Editorial Acribia
- Lin, Y., Tanaka, S. 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospect. *App. Microbiol. and Biotechnol.*, 69:627-642.
- Lynd, L., Lyford, K., South, C., van Walsum, G., Levenson, K. 2001. Evaluation of paper sludges for amenability to enzymatic hydrolysis and conversion to ethanol. *Tappi J.*, 84 (2):50.
- Thomsen, M. H., Martín, C., Taherzadeh, M., Hauggaard-Nielsen, H., and Thomsen A. B. 2002. Bioethanol fermentation with *Mucor indicus* on a White Clover/Rye grass substrate. Risoe National Laboratory (Clover-grass project) and EU-project Co-production Biofuels.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T., Martínez, J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose, and lignin: An overview. *International Microbiology*, 5:53-63.
- Perry, R., Green, D., Maloney, J. 2001. *Manual del Ingeniero Químico*.
- Quintero, R. 1981. *Ingeniería Bioquímica: Teoría y Aplicaciones*. México. Editorial Alhambra Mexicana, pp.332.
- Rockey, J. Higton, G. 2001. *Industrial Microbiology: An Introduction*. Great Britain: Blackwell Science.
- Sues, A., Millati, R., Edebo, L., Taherzadeh, M. 2005. Ethanol production from hexoses, pentosas, and dilute-acid hydrolyzate by *Mucor indicus*. *FEMS Yeast Research*, 5:669-676.
- Thomsen, M., Thygesen, A. Christensen, B.H. Larsen, J. Jorgensen, H. Thomsen A.B. 2006. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 129-132: 448-460.
- Vázquez, C., Ruiz, C., Anrango, D., Caicedo, R., Sanchez, M., Ríos, L., Restrepo, G. 2006. Producción de etanol absoluto por destilación extractiva combinada con efecto salino. Universidad de Antioquia.
- Waites, M., Morgan, N.,

Selección de bacterias para la remoción de hidrocarburos de petróleo desde suelos contaminados del oriente

R. Soria

Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Escuela Politécnica de Ejército, Sangolquí, Ecuador

A. Koch & L. Cumbal

*Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Escuela Politécnica de Ejército, Sangolquí, Ecuador
Centro de Investigaciones Científicas, Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador
luis.cumbal@espe.edu.ec*

K. Ponce

Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Escuela Politécnica de Ejército, Sangolquí, Ecuador

RESUMEN: Este estudio examina la biodegradación de petróleo crudo por cepas de bacterias aisladas del suelo contaminado en un sitio del Oriente Ecuatoriano. El aislamiento de las bacterias se realizó con la ayuda de la técnica de cultivo enriquecido y usando petróleo crudo como única fuente de carbono y energía. Se aislaron 51 cepas bacterianas. Seis de ellas fueron seleccionadas en base a su capacidad de degradar petróleo y a la capacidad de producir surfactantes. Las bacterias fueron identificadas como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavimonas arzyihabitans*, *Bacillus subtilis* y *Enterobacter cloacaceae*. Con estas bacterias se estableció un consorcio y fue probado a nivel de microcosmos, alcanzando aproximadamente un 80% de degradación de hidrocarburos de petróleo luego de 15 días de tratamiento.

ABSTRACT: This study explores the biodegradation of crude oil using bacterial strains isolated from contaminated soil in a site of the Ecuadorian Oriente. The isolation of bacteria was carried out by the enrichment culture method, using crude oil as carbon and energy source. Fifty one strains were isolated. Six of them were chosen based on their ability of petroleum degradation and surfactant production. Bacteria were identified as *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavimonas arzyihabitans*, *Bacillus subtilis* and *Enterobacter cloacaceae*. With these microbes, a bacterial consortium was formed and tested at a microcosmos level. Degradation of petroleum hydrocarbons was around 80% after 15 days of treatment.

1. INTRODUCCIÓN

La explotación petrolera en el norte de la Amazonía ecuatoriana ha generado graves daños ambientales. La localidad bajo estudio está ubicada en el Cantón Joya de los Sachas de la Provincia de Orellana y ha sido descrita por Varea et al. (1995) como uno de los casos más importantes de conflicto socio ambiental generado por la actividad petrolera. En la localidad se ubica una estación de bombeo, 44 pozos y cuatro mecheros (H. Consejo Provincial de Orellana 2009). Ante la problemática ambiental que acarrea la explotación petrolera, una de las alternativas para restaurar ambientes contaminados con petróleo es la biorremediación, cuyo uso ha crecido en los últimos años como un complemento de los métodos químicos y físicos tradicionales (Deyta et al. 1995). Esta técnica utiliza microorganismos para degradar los hidrocarburos contenidos en el petróleo y otros combustibles, constituyéndose en uno de los principales métodos mediante los que, los contaminantes hidrocarbonados se pueden eliminar del ambiente (Bracho et al. 2005). Los microorganismos usan para su crecimiento elementos o compuestos químicos que se encuentran en la naturaleza o que han sido sintetizados y para aislarlos es común usar la técnica de cultivo enriquecido (Jobson et al. 1972). El método está basado en la ventaja que tiene un microorganismo de usar un compuesto específico como fuente de carbono y energía, en un medio que contiene solo nutrientes inorgánicos. En estas condiciones las especies que son capaces de crecer utilizando esos compuestos químicos, se multiplicarán (Alexander 1999). Por otra parte, para aplicar los procesos

de biorremediación es recomendable trabajar con microflora directamente aislada de los ambientes impactados (Araujo 2002). En este contexto, el aislamiento de los microorganismos degradadores nativos es necesario y debe conducirse en el laboratorio. Algunos de los géneros más comúnmente utilizados incluyen, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Rhodotorula* y *Sporobolomice* (Bracho et al. 2005). El presente estudio tuvo como objetivo aislar e identificar cepas bacterianas del suelo de la zona afectada por la contaminación, con capacidad para biodegradar fracciones de petróleo y seleccionar las de mayor eficiencia o las productoras de surfactantes, como una alternativa para solucionar uno de los problemas de contaminación generados por la industria petrolera.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Descripción de la zona de estudio

El sitio donde se realizó el estudio se ubica en la provincia de Orellana entre los meridianos 76° 52' 300", 76 ° 53' 1" y los paralelos 0° 22' 20", 0° 22' 45". La densidad poblacional de la zona es de 17,8 habitantes/km² (Fontaine 2006). En el sitio se ubican 44 pozos lo que representa el 25% del total de la provincia de Orellana. Actualmente la tasa de explotación promedio en la zona es de 45.000 barriles diarios, de un crudo de 28° API (Varea et al. 1995). Para el estudio fueron seleccionados siete puntos en el centro urbano de la parroquia, de los que se tomaron las muestras de suelo. Para conocer el estado del suelo en estudio se realizó un conteo de microorganismos heterótrofos totales con muestras superficiales de cada uno de los puntos.

2.2 Origen y toma de las muestras

Para el muestreo se modificó el método reportado por Pérez et al. (2008). Se colectaron muestras a tres profundidades: 0-50 cm, 3.5-4 m y 6-6.5 m bajo condiciones asépticas. Las muestras fueron colocadas en fundas ziploc, mantenidas en refrigeración durante el transporte y procesadas dentro de las 24 horas posteriores a su colecta.

2.3 Aislamiento y selección de bacterias degradadoras de petróleo

El aislamiento de cepas bacterianas degradadoras de petróleo se llevó a cabo por la técnica de cultivo enriquecido, se empleó crudo de petróleo como fuente de carbono y energía. El enriquecimiento se realizó con medio mínimo mineral según Jobson et al. (1972), compuesto por (g·L⁻¹): NH₄Cl 1,2; KNO₃ 2,4; CaCl₂·2H₂O 0,00067; Na₂SO₄ 2,4; MgSO₄·7H₂O 2,04; K₂HPO₄·3H₂O 0,65; KH₂PO₄·3H₂O 0,5; FeSO₄·7H₂O 0,02. Se ajustó el pH del medio a 7.1 y se agregó rojo fenol como indicador de pH (Altamirano et al. 2006). Como fuente de carbono se utilizó petróleo crudo y se probaron tres concentraciones 0,1; 0,5 y 1 % (v/v). Los componentes del medio fueron esterilizados en autoclave a 120°C durante 20 min. El petróleo fue previamente esterilizado con luz UV durante 15 min. Se aplicó la técnica descrita por Altamirano et al. (2006), realizando una dilución de 10⁻¹ previa a la siembra en el medio mínimo mineral con petróleo crudo. Las muestras se incubaron a 30°C, durante 15-20 días. Para la selección de bacterias se evaluó la degradación, variación de pH y sedimentación en los cultivos. Una vez que se observó cambio de color en el medio debido al indicador, turbidez, o se hubiera cumplido el tiempo establecido para la incubación, se procedió a traspasar los cultivos a medio mineral sólido, con tres concentraciones de petróleo (Bracho et al. 2005). Se sembró por agotamiento dos cultivos subsecuentes hasta obtener colonias aisladas (Bracho et al. 2005), las que fueron traspasadas a agar tripticasa soya para obtener cultivos puros según lo detalla Pérez et al. (2008) y finalmente se estableció un cepario con los cultivos puros en agar tripticasa soya (TSA).

2.4 Evaluación de la degradación de petróleo por medio de la formación de halos

Para la selección de las bacterias con la mejor capacidad degradativa, se procedió a evaluar la aparición de halos en petróleo (Pérez et al. 2008). Se prepararon cajas con Medio Mínimo Mineral de Jobson agarizado al 1,5%, en las cuales se inculó con la aguja bacteriológica en puntos

específicos y se colocó una gota de petróleo con la micropipeta sobre el lugar de la siembra. El petróleo fue previamente esterilizado con UV. Se realizaron nueve repeticiones por cada uno de los cultivos. La incubación fue a 27 °C y se evaluó en mm el apareamiento de halos, a las 48, 72 y 96 h. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa SPSS 1.5 para el análisis de varianza y la prueba de Tukey para modelos lineales univariantes, parámetros que permitieron seleccionar las cepas de mayor actividad degradadora en función del tiempo.

2.5 Determinación de la producción de surfactantes

2.5.1 Hemólisis en Agar Sangre

La producción de surfactantes fue evaluada según la actividad hemolítica de cada cepa. Se inoculó cajas con agar sangre al 7%. Luego de 24 h de incubación a 45°C se observó el desarrollo de un halo de hemólisis alrededor de las colonias (Pardo et al. 2003).

2.5.2 Actividad emulsificante de las bacterias degradadoras de petróleo

Siguiendo la metodología propuesta por Goldman et al. (1982), se empleó el medio mínimo de Goldman cuya composición (g L⁻¹) es: K₂HPO₄ ·3H₂O 22,2; KH₂PO₄ 7,26; MgSO₄·7H₂O 0,2; (NH₄)SO₄ 4,0; y 20 g de etanol. Se adicionó extracto de levadura al 3% (p/v) (Escalante, 2005). Se esterilizó el medio a 121°C por quince min, excepto el etanol, el cual fue agregado posteriormente en condiciones de esterilidad.

Se reactivaron los cultivos en 2 mL de caldo nutriente y se los incubó a 37 °C por 24 h. Se colocó 18 mL del medio mínimo de Goldman con extracto de levaduras en matraces de 100 mL. Se adicionó después los 2 mL de cultivo. Los matraces se incubaron a 30 °C por setenta y 2 h en agitación constante. Los cultivos fueron centrifugados a 5000 rpm por treinta min (Cha et al. 2008). Se tomó 10 mL del sobrenadante, luego se le agregó a cada tubo con sobrenadante 0.2 mL de petróleo crudo y se agitó en el vortex por un min. Se trasvasaron 2 mL de la preparación anterior a celdas Perkin Elmer para espectroscopia UV/VIS de 10 mm. Se calibró el espectrofotómetro Thermo Spectronic Genesis 8 para Abs 540 nm. El blanco fue un tubo conteniendo el medio de cultivo sin inoculación y se procedió de la misma manera que con las otras muestras. La absorbancia leída se convirtió en unidades de actividad emulsificante por mL (UAE/mL), para lo cual 0.816 de absorbancia equivale a una UAE/mL (Escalante 2005). Se evaluó la actividad emulsificante a las bacterias que mostraron mayor actividad degradativa. Con los datos obtenidos se realizó el análisis de varianza y la prueba de Tukey para modelos lineales univariantes, con lo cual se seleccionó las cepas de mayor actividad emulsificante.

2.6 Pruebas de identificación de las cepas bacterianas seleccionadas

Para la identificación taxonómica, primero se efectuó la coloración de Gram de las cepas bacterianas seleccionadas. Se realizaron pruebas bioquímicas según lo detalla el Manual de Microbiología Determinativa de Bergey's (1997). Se confirmó la identificación utilizando los sistemas API 20E y API 50CHB. Los resultados obtenidos fueron procesados mediante el sistema apiwebTM stand alone V1.2.1.

2.7 Pruebas de antagonismo entre las cepas bacterianas seleccionadas

Las cepas seleccionadas para la prueba se reactivaron en caldo nutritivo durante 24 h a 30°C. Se sembró masivamente cada una de las cepas en agar nutritivo con la ayuda de un hisopo estéril y se enfrentó a las diferentes cepas con la ayuda de discos de papel estéril sumergidos en el caldo nutritivo con la cepa reactivada. La incubación duró 24 h a 30 °C (Díaz et al., 2007). Se evaluó la presencia o ausencia de halo, para los casos positivos el efecto antagónico se consideró midiendo el diámetro de cada uno de los halos de inhibición alrededor de los discos estériles, se tomó como antagonismo positivo a las cepas que al enfrentarse entre sí, inhibieron el crecimiento de las otras con un halo de inhibición mayor que 5 mm, se determinó un antagonismo negativo a las cepas que no presentaron halo o uno < a 5 mm (Díaz et al. 2007).

2.8 Ensayos de Microcosmos con las cepas bacterianas seleccionadas

Para este ensayo se empleó un consorcio bacteriano formado por las bacterias seleccionadas de las pruebas de degradación y de actividad emulsificante. Los ensayos se llevaron a cabo mediante la metodología descrita por Perfumo et al. (2005). Se plantearon dos tratamientos, 1) agua de la localidad suplementada con nutrientes KNO_3 y KH_2PO_4 como fuente adicional de N y P para alcanzar una proporción molar equivalente a 300C:10N:1P (Viñas 2005). Se agregó el inóculo bacteriano y se suplementó petróleo crudo al 0.5% v/v como fuente de carbono y energía y 2) agua del sitio bajo estudio sin la adición de nutrientes, con el inóculo bacteriano y con petróleo crudo al 0.5% v/v. Cada tratamiento se hizo por triplicado, adicionalmente se realizó dos controles. Para el ensayo se emplearon matraces de 250 mL conteniendo 100 mL de cada uno los tratamientos previamente descritos. Después de 15 días de incubación a temperatura ambiente y agitación constante, se realizó la extracción de TPHs usando diclorometano de acuerdo al método EPA 610, las muestras fueron leídas en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Autosistem y los resultados fueron utilizados para el análisis estadístico.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El conteo de heterótrofos totales que se realizó para las muestras superficiales mostró que el número de bacterias promedio del suelo está en el rango de 10^5 Unidades Formadoras de Colonias por gramo de suelo (UFCs/g) como se detalla en la Tabla 1, lo cual encaja dentro del promedio normal para suelos de la Amazonía como lo menciona Jerger et al. (2002) & Deyta et al. (1995). Este resultado además indica que la población nativa está dentro del rango aconsejable para iniciar procesos de biorremediación.

En el aislamiento realizado en agar petróleo, las colonias seleccionadas fueron aquellas que se encontraron totalmente aisladas y con morfologías diferentes, se encontró en algunos casos más de un tipo por caja. El cultivo en un medio mínimo con un hidrocarburo como única fuente de carbono y energía favorece la capacidad del microorganismo de crecer y emulsificar el hidrocarburo (Pérez et al. 2008).

En la prueba realizada para la observación de halos en petróleo los cultivos C9, C50, C7, C39 y C 33 fueron los que presentaron mejores resultados, los diámetros obtenidos en promedio a las 96 h de incubación fueron 2.44 , 2.40, 2.11 y 1,64 (mm) respectivamente, lo cual es similar a lo obtenido en el trabajo realizado por Bracho et al. (2004), donde entre 120-160 h de incubación los diámetros de las colonias degradadoras de hidrocarburos oscilaron entre 3 y 4 (mm) en medios rociadas con naftaleno y DBT. De las 51 cepas tolerantes al petróleo aisladas, 31 mostraron capacidad degradadora produciendo halos en alguno de los tres tiempos evaluados (Figura 1). En algunas de las que no produjeron halo, se observó la formación de una zona clara alrededor de la gota de petróleo crudo, lo cual podría indicar que la bacteria no degrada el petróleo crudo por completo sino que solo asimila una fracción, como lo demuestra Bracho et al. (2004).

Tabla 1. Valores del conteo en placa para muestras de suelo de los pozos 1,2,4,5, 8, 9, 10,11 y 12

Número de Pozo	Unidades formadoras de colonias UFCs/g
P1	7,30E+5
P2	3,08E+5
P4	6,04E+5
P5	9,93E+5
P8	6,86E+5
P9	5,14E 7
P10	8,89E+7
P11	4,82E+6
P12	5,40E+3

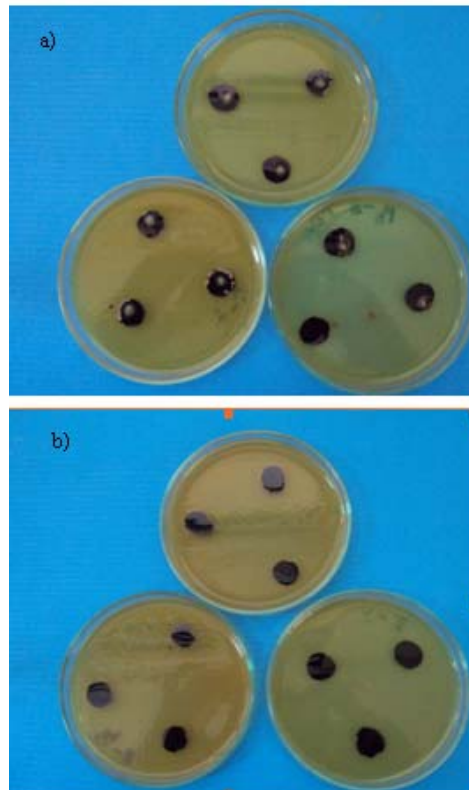


Figura 1. a) Halos en petróleo sobre agar mineral a las 96 h de incubación (tres repeticiones). b) control negativo a las 96 h de incubación (Escala 1:4.5).

Carrillo et al. (1996) encontró una asociación entre la actividad hemolítica y la producción de surfactantes y recomienda el uso de la técnica de la lisis en agar sangre como un método primario para detectar actividad biosurfactante. La siembra de los cultivos puros en agar sangre dio como resultado cuatro cajas positivas para beta hemólisis, es decir, que mostraron un halo transparente a las 24 h de incubación, este resultado indica que las cepas posiblemente producen surfactina (Moran et al. 2002) o ramnolípidos (Jhonson et al. 1980). No queda descartada la posibilidad de que otras cepas produzcan algún otro tipo de surfactantes. Según Tuleva et al. (2002), la hemólisis de los eritrocitos es causada por la secreción de ramnolípidos de algunos microorganismos especialmente del género *Pseudomonas*. Como se menciona en la publicación de Walter (2008), este método no es específico pues el apareamiento de zonas claras también puede asociarse con la acción de enzimas líticas. Además, sustratos hidrofóbicos no pueden ser incluidos como única fuente de carbono en este ensayo y la restricción de la difusión del surfactante puede inhibir la formación de zonas claras. Schulz et al.(1991) demostró que algunos surfactantes no muestran actividad hemolítica alguna, por eso se recomienda usar este método únicamente como preliminar y debería ser comprobado con otras técnicas basadas en la medida de la tensión superficial. Complementariamente, Youssef et al. (2004), al comparar varios métodos para la detección de biosurfactantes, encontró que el 45% de cepas que no hemolisaron el agar sangre fueron positivas para la producción de surfactantes por otros métodos.

Al realizar la evaluación de la actividad emulsificante con absorbancia a 540 nm, se observó que los valores más altos corresponden a las cepas C8, C13, C14 y C44, oscilando entre 0.41 y 1.99 unidades de actividad emulsificante. En el trabajo realizado por Escalante (2005) con *Pseudomonas aeruginosa* 4k-1, *Bacillus sp.* 6Bh-1 y *Serratia rubidae* 6B9, obtuvo resultados de actividad emulsificante en petróleo de 3.66, 1.676 y 2.72 UAE/mL, respectivamente. Según el estudio de Cha et al. (2008), el valor de actividad emulsificante de surfactantes generados por *P. aeruginosa* en petróleo crudo a $A_{540 \text{ nm}}$ fue 0.401 y valores más altos se alcanzaron para octadecano y algunos tipos de aceites vegetales. Además, en otros estudios se obtuvieron datos de 1.281 y 1.353

Tabla 2. Identificación de las cepas bacterianas seleccionadas

Código de la cepa	Nombre científico
C9	<i>Acinetobacter baumannii</i>
C50	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
C7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
C33	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>
C37	<i>Bacillus subtilis</i>
C44	<i>Enterobacter cloacae</i>

Tabla 3. Porcentajes de remoción de hidrocarburos totales de petróleo después de 15 días de incubación.

Tratamiento	Descripción	% de remoción de TPHs
T 1	Agua de San Carlos + KNO ₃ y K ₂ HPO ₄ + consorcio bacteriano + petróleo crudo 0.5%	81.8
T2	Agua de San Carlos + consorcio bacteriano + petróleo crudo 0.5%	42.4
T3	Agua de San Carlos+ nutrientes KNO ₃ y K ₂ HPO ₄	28.78
T4	Agua de San Carlos	Control

UAE/mL para *Bacillus sp.* y 1.561 UAE/mL para *Pseudomonas sp.* (Aycachi & Carreño 2008).

Además, las cepas seleccionadas para la degradación de petróleo en agua fueron identificadas mediante las técnicas que recomienda el Manual de Bergey's y los resultados obtenidos fueron procesados mediante el sistema con el apiweb™ stand alone V1.2.1. En la Tabla 2 se detallan los nombres de las cepas. Resultados que coinciden con los géneros más comúnmente encontrados en ambientes contaminados con hidrocarburos (Narváez et al. 2008 & Obuekwe et al. 2009).

Por otra parte, el consorcio bacteriano muestra buena capacidad para degradar hidrocarburos totales de petróleo (TPHs) en ensayos a nivel de microcosmos. En la Tabla 3 se detallan los porcentajes de remoción de TPHs obtenidos en las pruebas de laboratorio. Se nota que estos resultados son superiores a los reportados por Tuleva et al. (2002) & Bracho et al. (2004). Sin embargo, en vista de que algunas especies de *Pseudomonas* son patógenos oportunistas para los humanos, sus aplicaciones biotecnológicas se ven limitadas solo a la producción de biosurfactantes. Pero a pesar del riesgo sería importante continuar con la investigación de las moléculas surfactantes, ya que los ramnolípidos han sido usados sin riesgos y actualmente son los surfactantes más empleados en biorremediación y aplicaciones en el campo ambiental.

4. CONCLUSIONES

El consorcio conformado por *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavimonas oryzihabitans*, *Bacillus subtilis* y *Enterobacter cloacae* mostró una alta capacidad de degradación de TPHs pues los reduce en un 80.8 % después de 15 días de incubación. *Bacillus subtilis*, *Acinetobacter baumannii* y *Flavimonas oryzihabitans* tienen alta capacidad degradativa sobre el petróleo crudo y buena actividad emulsificante debido a la producción de moléculas surfactantes y por su baja patogenicidad pueden ser usadas en procesos de biorremediación y otras aplicaciones ambientales. En el caso de *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas aeruginosa*, a pesar de su gran capacidad degradativa y producción de surfactantes que han sido ampliamente reportadas, es necesario limitar su aplicación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su gratitud a la Unidad del Equipo Gestor del Programa de Reparación Ambiental y Social (UEG-PRAS) del Ministerio del Ambiente por el financiamiento otorgado para la ejecución del proyecto.

5. REFERENCIAS

- Altamirano, M.; Pozzo, M. 2003. Aislamiento e identificación de bacterias hidrocarburohílicas provenientes de un suelo sometido a biorremediación. XXVII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental.
- Araujo, I.; Romero, G.; Cárdenas, C.; Angulo, N.; Morillo, G.; Navarro, J.; Méndez, M. 2002. Biorremediación de aguas contaminadas con derivados de hidrocarburos utilizando cepas bacterianas autóctonas; Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Cancún, México, 27 al 31 de octubre, 2002.
- Bergey's. 1999. Manual de Microbiología Determinativa, Ejercicio 22: Enumeration of Bacteria: The standard plate count.
- Bracho, M.; Díaz, L.; Soto, L. 2005. Degradación de hidrocarburos aromáticos por bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo en el estado Zulia, Venezuela; Ciencia, ISSN, 1315-2076.
- Cha, M., Lee, N., Kim, M., Kim, M., Lee, S., 2008. Heterologous production of Pseudomonas aeruginosa EMS1 biosurfactant in Pseudomonas putida; Bioresource Technology, 99:2192–2199.
- Deyta, A.; Saval, S. 1995. Biodegradación de hidrocarburos monoaromáticos volátiles (BTX) a nivel microcosmos en suelos contaminados con gasolina. Instituto de Ingeniería, Coordinación de Bioprocesos Ambientales.
- Escalante, R. 2005. Biodegradación de crudo de petróleo en terrarios; Magistri et Doctores, 59.
- Fontaine G, 2006, Conflictos Ambientales y Ecologismo en la Amazonía Ecuatoriana.
- H. Consejo Provincial de Orellana, 2009, <http://www.hcpo.gov.ec/index.php?option=com_content&task=view&id=333&Itemid=33>.
- Jerger D y Woodhull P. 2002. Applications and costs for biological treatment of explosives-contaminated soils in the U.S., p. 395-423. In J. Spain, J. B. Hughes, and H.-J. Knackmuss (ed.), Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives. Lewis Publishers, Boca Raton, Fla.
- Johnson, M.; Boese, D. 1980. Production and Properties of Heat-Stable Extracellular Hemolysin from Pseudomonas aeruginosa; Infection and Immunity, 2(32):1028-1033.
- Morán, A.; Martínez, M.; Siñeriz, F. 2002. Quantification of surfactin in culture supernatants by hemolytic activity; Biotechnology Letters, 24:177–180.
- Narváez, S.; Gómez, M. L.; Martínez, M.M. 2008. Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos aisladas a partir de sedimentos del Caribe colombiano; Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras – INVEMAR.
- Obuekwe, C. O.; Al-Jadi, C. K.; Al-Saleh, E. S. 2009. Hydrocarbon degradation in relation to cell-surface hydrophobicity among bacterial hydrocarbon degraders from petroleum-contaminated Kuwait desert environment; International Biodeterioration & Biodegradation, 63:273–279.
- Pardo, J., Perdomo, M., Beavides, J., López, M. 2004. Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo a nivel laboratorio, NOVA, 2 (2):40-49.
- Pérez R, N.; Camacho, M.; Gómez, J.; Ábalos, A.; Viñas, M.; Cantero, D. 2008. Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo; Revista CENIC Ciencias Biológicas, 39(1):2008.
- Perfumo A, Banat I, Canganella F, Marchant R. 2006. Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading Pseudomonas aeruginosa AP02-1, Applied Microbial and Cell Physiology. 72:132-138.
- Schulz D, Passeri A, y Schmidt M. (1991), Marine biosurfactants, Screening for biosurfactants among crude-oil degrading marine microorganisms from the North-Sea.
- Tuleva B, 2002, Biosurfactant Production by a New Pseudomonas putida Strain.
- Varea A, 1995, Marea Negra en la Amazonía, Impacto Socio Ambiental de la Actividad Petrolera, estudio de caso de las comunidades de San Carlos y La Primavera, pp. 265-294.
- Viñas M, 2005, Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: Caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica.

LiLMOD: Una herramienta matemática para incrementar la competitividad leal en instituciones educativas

J. Mayorga-Zambrano

Departamento de Ciencias Exactas, Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador

RESUMEN: LiLMOD es un conjunto de modelos matemáticos con alto valor agregado en innovación y desarrollo. LiLMOD respeta, al tiempo que complementa, los aspectos filosóficos y la metodología del proceso de enseñanza-aprendizaje con un impacto directo en la formación de competencias, actitudes y perfiles de los educandos motivando competitividad leal, autosuperación y aprecio por los principios de justicia y solidaridad. El kernel de LiLMOD es un modelo matemático para establecer las calificaciones de los estudiantes que fue concebido en un Sistema de Evaluación Basado en Competencias pero que se adapta y complementa muy bien a diferentes filosofías pedagógicas. El número que LiLMOD calcula como calificación de una unidad tiene relación directa con el nivel de competencias alcanzado por el estudiante pero añade el elemento talento-responsabilidad a través de un sistema de promociones que motivan al educando a enfocar su trabajo hacia la eficiencia.

Palabras Clave: Modelamiento Matemático, Educación, Calificación por Competencias

ABSTRACT: LiLMOD is a set of mathematical models with high added-value in innovation and development. LiLMOD respects at the time that complements both the philosophical perspective and the methodology of the teaching-learning process with a direct impact on the competences building, attitudes and profiles which encourages loyal competitiveness, self-improvement, and esteem for principles of justice and solidarity. LiLMOD's kernel is a mathematical model to establish the student grades; it comes from a Competences-based Evaluation System but that works well with other pedagogical philosophies. LiLMOD's grade in a unit of contents is in direct relation with the achieved competences level balanced by the talent-responsibility element via a system of promotions; this motivates to work with efficiency.

Keywords: Mathematical Modeling, Education, Competences Grading.

1. INTRODUCCIÓN

En la sociedad del conocimiento en que se vive, donde aprender para toda la vida es esencial e involucra una actitud mental profunda que sólo se puede sustentar en valores éticos como honestidad y respeto. En una sociedad que camina a una velocidad inimaginable hace un par de generaciones, hay una tendencia a considerar incompatibles los conceptos de competencia y lealtad. Al fin y al cabo, ¿cómo puedo competir con mi amigo o colega sin caer en la deslealtad? La respuesta a este tipo de interrogante radica en una fusión de conceptos en el camino de la moderación; así concebimos la competencia leal, una competencia a todo vapor donde los competidores dan todo lo mejor, donde se respetan las reglas de juego que se ajustan a principios morales y éticos, y donde la victoria del competidor no es una desgracia sino una fuente de riqueza y crecimiento personal y profesional.

ללמוד/LiLMOD es una palabra hebrea que significa aprender. LiLMOD es una herramienta matemática con alto valor agregado en conocimiento e innovación que respeta, al tiempo que complementa, los aspectos filosóficos y la metodología del proceso de enseñanza-aprendizaje con un impacto directo en la formación de competencias, actitudes y perfiles de los educandos, motivando competitividad leal, auto-superación, y aprecio por los principios de justicia y solidaridad.

El kernel de LiLMOD es un modelo matemático para establecer las calificaciones de los estudiantes; fue concebido originalmente en y para un Sistema de Evaluación Basado en Competencias (Mayorga-Zambrano et al. 2008); pero, por su flexibilidad, se adapta a otras filosofías pedagógicas. El valor que LiLMOD calcula como calificación de una unidad tiene relación directa con el nivel de competencias alcanzado por el estudiante pero añade el elemento talento-responsabilidad a través de un sistema de promociones efectivas que motivan al educando a enfocar su trabajo hacia la eficiencia. El kernel es descrito en la Sección 2.

En LiLMOD se establece un criterio sano para decidir que estudiantes que habiendo reprobado un módulo estarían en condiciones de afrontar con probabilidades reales de éxito un curso intensivo de recuperación. Este modelo es descrito en la Sección 2.10.

Otro componente de LiLMOD es un modelo matemático que permite hacer un seguimiento a la construcción del perfil: permite tener a cualquier instante una imagen del rendimiento de los estudiantes conforme al tipo de materia (formativas, fundamentales, complementarias, de libre elección, etc.). Esta herramienta balancea el número de créditos con un factor por tipo y permite establecer de una manera depurada la nota de grado. Esto es tratado en la Sección 3.

2. EL KERNEL DE LILMOD

La implementación de un Sistema de Enseñanza Basado en Competencias, SEBC, genera diferentes desafíos (Gil 2000; Hawes 2005; Mayorga-Zambrano et al. 2008; Tobón 2006); entre ellos, la generación de un Modelo de Calificación de Competencias (MCC) que promueva la competitividad leal de una manera clara y justa y que considere el ritmo propio de aprendizaje de cada estudiante.

La ausencia de un MCC apropiado o su falta de unicidad provocan confusión e inseguridad en los educandos, genera distracciones y no permite optimizar recursos de tiempo y energía hacia el proceso de enseñanza-aprendizaje. Dar una solución a este problema concreto fue el objetivo de partida para las versiones preliminares del kernel de LiLMOD - este trabajo fue desarrollado por el autor en colaboración con Claudio del Pino (Universidad de Talca), (Mayorga-Zambrano et al. 2008).

Para establecer un MCC, es necesario recurrir a herramientas matemáticas más allá del simple cálculo de promedios pues, entre otros aspectos, hay que considerar la diferencia cualitativa entre unidades *exigibles* y unidades *no-exigibles* en un módulo. A grosso modo, una unidad se considera exigible cuando las competencias que desarrolla en el estudiante son de suma importancia al punto que un estudiante no debería aprobar el módulo si no cuenta con un nivel apropiado de tales competencias.

Observación 2.1 Se considera que competencia es un conjunto de conocimientos, capacidades, actitudes y destrezas necesarias para desempeñar una determinada tarea.

Un MCC matemáticamente sólido y coherente con el sistema de enseñanza promueve un ambiente adecuado para todos los agentes del proceso educativo al establecer reglas claras, lógicas y razonables. Desde sus primeras versiones, el MCC de LiLMOD cumple con las observaciones anteriores; la versión del kernel que se presenta en este artículo fue diseñado de manera tal que **i)** promueva la autosuperación de los estudiantes; **ii)** sea justo y sea percibido como tal por los agentes del proceso educativo; **iii)** considere los diferentes ritmos de aprendizaje de los estudiantes - las diferencias manifiestas entre estudiantes que desde un principio demuestran destrezas superiores en el módulo versus estudiantes que por alguna razón muestran dificultades en su desempeño; **iv)** administre parámetros de calidad; **v)** sea flexible para que permita, dentro de rangos razonables, manejar un número cualquiera de unidades exigibles y no-exigibles; **vi)** sea de fácil uso para los profesores; **vii)** emita reportes significativos a estudiantes, representantes, profesores y gerencia educativa.

2.1 Parámetros académicos y modulares

Como en todo modelo matemático, el kernel de LiLMOD tiene parámetros, criterios de restricción o de control, información de entrada y resultados de salida. Para empezar se consideran los parámetros académicos. Estos son comunes para todos los módulos dentro de la unidad académica que aplica el MCC.

Tabla 1. Parámetros Académicos

R_{min}	Calificación mínima posible en un módulo
R_{max}	Calificación máxima posible en un módulo
R	Calificación mínima necesaria para aprobar un módulo
U	Salto mínimo de medición

Los parámetros modulares corresponden a la estructura que se maneja al interior de un módulo fijo. Consideramos un módulo con $E + M$ unidades.

Tabla 2. Parámetros Modulares

E	Número de unidades exigibles
M	Número de unidades no-exigibles
M_{max}	Número máximo de unidades no-exigibles
x	Peso de una unidad no-exigible
η_{max}	Peso total máximo de las unidades no-exigibles
r	Razón entre el peso promedio de unidades exigibles y el peso de una unidad no-exigible.

Una unidad se considera exigible cuando un estudiante no puede aprobar el módulo si su desempeño en tal unidad es menor que R . Así que en nuestro MCC es condición necesaria (pero no suficiente) aprobar todas la unidades exigibles para aprobar el módulo. Una unidad que no tiene esta característica se denomina no-exigible.

Criterio 2.1 Todo módulo debe tener al menos una unidad exigible.

Un módulo podría carecer de unidades no-exigibles. Tener un número excesivo de unidades no-exigibles es un indicio de que el módulo en sí mismo no es relevante dentro del pènsum y que podría eventualmente ser removido o reemplazado.

Criterio 2.2 En un módulo determinado, la razón entre el peso promedio de unidades exigibles y el peso de una unidad no-exigible debe estar en el intervalo $(1,2]$.

En concordancia con lo anterior, suponemos que el peso promedio de unidades exigibles es r veces el peso de una unidad no-exigible. Se tiene que:

$$x = \frac{1}{rE + M}, \tag{1}$$

de manera que $1-xM$ es el peso total de unidades exigibles. Si todas las unidades exigibles tienen el mismo peso, $1-xM = rx$.

Criterio 2.3 El peso total de las unidades no-exigibles, denotado η , no puede sobrepasar un valor $0 < \eta_{max} < 0.5$.

De este criterio y de la relación (2.1) se sigue un control al número de unidades no-exigibles:

$$M \leq \min \left\{ r \left(\frac{\eta_{max}}{1 - \eta_{max}} \right) E; M_{max} \right\}, \tag{2}$$

donde

$$M_{max} \equiv \left[2 \left(\frac{\eta_{max}}{1 - \eta_{max}} \right) E \right]_{1,0}. \tag{3}$$

Observación 2.2 Por $[a]_s$ se entiende la truncación del real a al número de cifras significativas de s .

2.2 Parámetros para medir Competencias

Como ya se dijo, un estudiante requiere (pero posiblemente no le basta) alcanzar R en cada una de las unidades exigibles para aprobar el módulo. Esto hace lógico introducir el siguiente criterio.

Criterio 2.4 En un módulo normal, se debe tener más de una oportunidad para alcanzar R . No es apropiado un número excesivo de tales oportunidades.

Congruente con el SEBC, dividimos la medición de competencias en niveles Básico-Medio (BM) y Medio-Superior (MS). El nivel BM corresponde a *exigencia* en tanto que MS corresponde a *excelencia*.

Criterio 2.5 Un estudiante no puede aprobar el módulo si no ha alcanzado en cada unidad exigible al menos un rendimiento R a nivel BM. El puntaje correspondiente al nivel BM debe estar por encima de R pero de ninguna manera cercano o igual a R_{max} .

Consideramos adicionalmente la posibilidad de que el profesor requiera aportes en forma de trabajos, investigaciones, deberes, etc. Este ítem es opcional y en caso de estar vigente será calificado como una fracción de la medición a nivel MS. Esto es congruente con el siguiente criterio.

Criterio 2.6 Un estudiante no puede aprobar el módulo a base de tareas.

En virtud de las anteriores observaciones establecemos un grupo de parámetros que denominamos *globales* pues si considera que deben ser válidos para todo módulo en toda unidad académica dentro de una institución educativa. A estas alturas se hace claro que se necesita introducir notación que permita distinguir el tipo de unidad (ver Tabla 3):

I	Índice de unidad
U_i	Tipo de unidad

De manera que

$$U_i = \begin{cases} 1, & \text{si la unidad } i \text{ es exigible} \\ 0, & \text{si la unidad } i \text{ es no-exigible} \end{cases}$$

También usaremos los conjuntos de unidades exigibles y no-exigibles, dados respectivamente por:

$$E^* = \{i = 1, \dots, E + M \quad t.q. \ U_i = 1\},$$

$$N^* = \{i = 1, \dots, E + M \quad t.q. \ U_i = 0\}.$$

J_{max}	Número máximo de oportunidades para alcanzar un rendimiento BM mayor o igual a R en $i \in E^*$
D_{max}	Distancia entre el rendimiento máximo posible, $R_{min} + D_{max}$, y R_{min} a nivel BM en $i \in E^*$.
α_{max}	Cota superior para la fracción necesaria para aprobar (i.e. obtener R) al nivel BM de una unidad exigible
α_{min}	Cota inferior para la fracción necesaria para aprobar (i.e. obtener R) al nivel BM de una unidad exigible.
γ_{max}	Fracción máxima de la calificación MS que puede corresponder a <i>aportes</i> .

En un módulo de carácter semestral nos parece apropiado $J_{max} = 4$ y $\gamma_{max} = 0.50$.

Puesto que cada unidad académica y cada módulo tienen sus particularidades, es menester considerar parámetros de calidad definidos o bien por la unidad académica (a la que se debe el módulo bajo estudio) o bien por el profesor. Estos parámetros deben respetar los parámetros globales que, como se dijo, son válidos para todo módulo en toda unidad académica. Consideramos entonces los siguientes parámetros *locales*.

Tabla 5. Parámetros Locales

J	Número de oportunidades para alcanzar un rendimiento BM mayor o igual a R
D	Distancia entre el rendimiento máximo posible, $R_{min} + D$, y R_{min} a nivel BM en $i \in E^*$.

En un módulo de carácter intensivo de recuperación lo lógico es $J=1$. Se debe cumplir que

$$1 \leq J \leq J_{max}, \tag{4}$$

$$u + \hat{R} \leq R_{min} + D \leq R_{min} + D_{max}. \tag{5}$$

Tabla 6. Parámetros Locales

α	Fracción necesaria para aprobar (i.e. obtener R) al nivel BM de una unidad E^*
γ	Fracción de la calificación MS que puede corresponder a <i>aportes</i>

Criterio 2.7 El nivel de exigencia se debe establecer antes de arrancar el módulo y debe ser constante en su desarrollo.

El nivel de exigencia se toma como un valor en el intervalo $(\alpha_{min}, \alpha_{max})$ y determina el valor de D mediante la relación:

$$D = \left[\frac{\hat{R} - \alpha R_{min}}{\alpha} \right]_u. \tag{6}$$

2.3 Salto simple de promoción

Puesto que buscamos que nuestro MCC sea justo manejamos el siguiente criterio.

Criterio 2.8 La calificación final de dos estudiantes con el mismo desempeño obtenido en dos intentos distintos debe ser diferente. Jamás reprueba una unidad exigible un estudiante que por su propio esfuerzo alcanza un desempeño BM igual o superior a α .

Para la implementación del Criterio 2.8 nos valemos de un sistema de promociones cuyo elemento básico es un salto simple de promoción, $p \geq u$, que se calcula mediante:

$$p = \left[\frac{R_{min} + D - \hat{R}}{J - 1} \right]_u \tag{7}$$

$$= \left[\left(\frac{1 - \alpha}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{\hat{R} - R_{min}}{J - 1} \right) \right]_u. \tag{8}$$

De las relaciones (2.5), (2.7) y (2.8) se sigue que

$$0 < \alpha_{min} \leq \alpha \leq \alpha_{max} < 1,$$

donde,

$$\alpha_{\min} = \frac{\hat{R} - R_{\min}}{D_{\max}}, \tag{9}$$

$$\alpha_{\max} = \frac{\hat{R} - R_{\min}}{\hat{R} - R_{\min} + u}. \tag{10}$$

2.4 Información individual

Considerando un curso que corresponde a un módulo determinado dentro de un sistema de evaluación.

Tabla 7. Información Inicial

K	Número de alumnos en el curso, $K \in \mathbf{N}^*$
k	Índice de alumno: $k = 1, 2, \dots, K$
$C(k)$	Calificación final del estudiante k en el módulo

Se tiene que

$$R_{\min} \leq B_i(k) \leq R_{\min} + D,$$

$$\lambda_i(k) = \begin{cases} j, & \text{si } b_{ij} \geq \alpha \\ J+1, & \text{si } b_{ij} < \alpha. \end{cases}$$

$$0 \leq a_i(k) \leq R_{\max},$$

$$0 \leq S_i(k) \leq R_{\max} - R_{\min} - D.$$

Tabla 8. Variables para calificar una unidad exigible

j	Índice de intento para aprobar BM en una unidad exigible, $j = 1, \dots, J$.
$b_{ij}(k)$	Desempeño de k en la evaluación j de la unidad $i \in \mathbf{E}^*$
$B_i(k)$	Calificación BM de k en la unidad $i \in \mathbf{E}^*$
$\lambda_i(k)$	Tipo de aprobación de k en la unidad $i \in \mathbf{E}^*$
$s_{ij}(k)$	Desempeño de k en la evaluación $j \in \{1, 2\}$ a nivel MS de la unidad $i \in \mathbf{E}^*$
$a_i(k)$	Calificación de k en <i>aportes</i> de la unidad $i \in \mathbf{E}^*$
γ	Fracción de la calificación MS que corresponde a <i>aportes</i>
$S_i(k)$	Calificación MS de k en la unidad $i \in \mathbf{E}^*$
$H_i(k)$	Calificación de k en la unidad $i \in \mathbf{E}^*$
$\bar{H}(k)$	Calificación global de las unidades \mathbf{E}^*

Criterio 2.9 Unidades exigibles diferentes pueden tener pesos diferentes. En congruencia con el criterio anterior se puede:

q_i Peso de la unidad $i \in \mathbf{E}^*$ respecto a \mathbf{E}

de manera que:

$$\sum_{i \in \mathbf{E}^*} q_i = 1. \tag{11}$$

Tabla 9. Variables para calificar una unidad no-exigible

$t_i(k)$	Fracción obtenida por k en la única evaluación de la unidad $i \in \mathbf{N}^*$
$T_i(k)$	Calificación de k en la unidad $i \in \mathbf{N}$
$\bar{T}(k)$	Calificación global de las unidades no-exigibles

Es claro que

$$0 \leq t_i(k) \leq 1, \\ R_{min} \leq T_i(k) \leq R_{max}.$$

Se tiene que

$$T_i(k) = R_{min} + t_i(k) * (R_{max} - R_{min}). \tag{12}$$

2.5 Calificación de una unidad exigible

Nuestro MCC promueve la competitividad leal a base de un sistema de promociones efectivas. La calificación de la unidad exigible está dada por

$$H_i(k) = B_i(k) + S_i(k). \tag{13}$$

Observación 2.3 Para la implementación del Kernel de LiLMOD es indispensable un cronograma de evaluaciones que debe ser presentado a los estudiantes al inicio del período lectivo. El ciclo de segundas evaluaciones de unidades exigibles debe ser realizada (sin traslapes) en fechas cercanas al ciclo de primeras evaluaciones. Un estudiante que no aprueba una unidad al primer intento desarrollará sólo las pruebas BM de las evaluaciones $2,3,\dots,J$. La evaluación J se desarrollará al final del período lectivo; y, en ella los estudiantes que hayan aprobado la unidad al primer o segundo intentos tienen una última chance de mejorar la calificación de la prueba MS.

En las fórmulas que a continuación se presentan puede verse que **1)** un estudiante que aprueba al primer intento el nivel BM tiene promoción efectiva completa - sólo contando el nivel BM se puede alcanzar una nota de $R_{min} + D$ y, más aún, puede, si así lo desea, repetir la evaluación MS dos veces más con la única posibilidad de mejorar su calificación; **2)** un estudiante que aprueba al intento $\lambda = 2,\dots,J - 1$ puede alcanzar al nivel BM una nota de hasta de $R_{min} + D_{max} - (\lambda - 1) \times p$. **3)** Un estudiante que aprueba al segundo intento el nivel BM tiene promoción efectiva parcial - puede, si así lo desea, repetir la evaluación MS una vez más con la única posibilidad de mejorar su calificación. **4)** Jamás un estudiante reprueba la unidad siendo que mostró un desempeño igual o mayor a α a nivel BM. Un estudiante que aprueba la unidad al último intento, $\lambda = J$, recibe una nota de \hat{R} . **5)** La calificación correspondiente al nivel MS es una "cuenta de ahorros" que se hace efectiva si se alcanza un desempeño mayor o igual a α en los intentos $j = 1,2,\dots,J - 1$.

2.6 Calificación BM y MS

El desempeño máximo a nivel BM está dado por

$$\omega_i(k) = \max_{j=1,\dots,J} b_{ij}(k). \tag{14}$$

Si $\omega_i(k) < \alpha$,

$$B_i(k) = \min \left\{ \left(\frac{\hat{R} - R_{\min}}{\alpha} \right) * \omega_i(k) + R_{\min}; \hat{R} - u \right. \quad (15)$$

Si $\omega_i(k) \geq \alpha$,

$$B_i(k) = \hat{R} + \varepsilon_i^{(1)}(k) \cdot \left(\frac{\omega_i(k) - \alpha}{1 - \alpha} \right) \cdot (R_{\min} + D - p(\lambda_i(k) - 1) - \hat{R}), \quad (16)$$

donde,

$$\varepsilon_i^{(1)}(k) = \begin{cases} 1, & \text{si } \lambda_i(k) = 1, \dots, J-1 \\ 0, & \text{si } \lambda_i(k) = J, J+1. \end{cases} \quad (17)$$

El desempeño efectivo a nivel MS está dado por

$$\sigma_i(k) = \begin{cases} \max_{j=1,2,J} s_{ij}(k), & \text{si } \lambda_i(k) = 1, \\ \max_{j=1,J} s_{ij}(k), & \text{si } \lambda_i(k) = 2, \\ s_{i1}(k), & \text{si } \lambda_i(k) = 3, \dots, J-1. \end{cases} \quad (18)$$

Entonces se tiene que

$$S_i(k) = \varepsilon_i^{(1)}(k) \cdot \left(\sigma_i(k) \cdot (1 - \gamma) + \frac{a_i(k)}{R_{\max}} \cdot \gamma \right) \cdot (R_{\max} - R_{\min} - D) \quad (19)$$

2.7 Calificación por tipo de unidad

La calificación global de las unidades exigibles está dada por

$$\bar{H}(k) = \sum_{i \in E^*} q_i H_i(k).$$

La calificación global de las unidades no-exigibles está dada por

$$\bar{T}(k) = \frac{1}{M} \sum_{i \in N^*} T_i(k).$$

Observación 2.4 El cardinal de un conjunto A se denota mediante $\# A$.

Para obtener una fotografía a cualquier tiempo sobre el rendimiento en unidades exigibles y no-exigibles consideramos $\tilde{E} \subset E^*$, $\tilde{N} \subset N^*$. La calificación en \tilde{E} está dada por

$$\bar{H}(k; \tilde{E}) = \sum_{i \in \tilde{E}} \hat{q}_i H_i(k), \quad (20)$$

donde

$$\hat{q}_i = \frac{q_i}{\sum_{l \in \tilde{E}} q_l}$$

La calificación en \tilde{N} está dada por

$$\bar{T}(k; \tilde{N}) = \frac{1}{\#\tilde{N}} \sum_{i \in \tilde{N}} T_i(k). \quad (21)$$

2.8 Calificación parcial y total de un módulo

En la fórmula que a continuación se presenta puede observarse que es requisito indispensable para aprobar el módulo el tener a su vez aprobadas todas las unidades exigibles.

$$C(k) = \begin{cases} G(k), & \text{si } \bar{H}_i(k) \geq \hat{R}, \forall i \in E, \\ \min \{ \hat{R} - u; G(k) \}, & \text{si no;} \end{cases} \quad (22)$$

donde,

$$G(k) = x \left(\sum_{i \in N} T_i(k) + rE \sum_{i \in E} q_i H_i(k) \right). \quad (23)$$

Dados $\tilde{E} \subset E^*$ y $\tilde{N} \subset N^*$, la calificación en (\tilde{E}, \tilde{N}) está dada por las siguientes fórmulas.

Si $\bar{H}_i(k) \geq \hat{R}$, para todo $i \in \tilde{E}$,

$$C(k; (\tilde{E}, \tilde{N})) = G(k; (\tilde{E}, \tilde{N})); \quad (24)$$

caso contrario,

$$C(k; (\tilde{E}, \tilde{N})) = \min \{ \hat{R} - u; G(k; (\tilde{E}, \tilde{N})) \} \quad (25)$$

donde,

$$G(k; (\tilde{E}, \tilde{N})) = x(\tilde{E}, \tilde{N}) \cdot (\# \tilde{N} \cdot \bar{T}(k; N) + r \# \tilde{E} \cdot \bar{H}(k; \tilde{E})),$$

$$x(\tilde{E}, \tilde{N}) = \frac{1}{r \cdot \# \tilde{E} + \# \tilde{N}}.$$

2.9 Observaciones importantes

Cuando se cumple la primera condición en (22), es decir cuando se tienen aprobadas todas las unidades exigibles, se debe cumplir

$$\bar{T}(k) \geq \hat{R} - \frac{rE}{M} (\bar{H}(k) - \hat{R}) \quad (26)$$

para aprobar el nivel; pues, aun cuando las unidades no-exigibles tienen menor peso que las unidades exigibles, de todas maneras tienen que ser atendidas con responsabilidad por parte del estudiante.

La relación (2.26) nuevamente motiva a que los estudiantes se acostumbren a trabajar con seriedad buscando alcanzar la aprobación de las unidades exigibles al primer intento. En efecto, si tomamos el caso en que un estudiante aprueba todas las unidades exigibles en el último intento, entonces $\bar{H}(k) = \hat{R}$ y, por (2.26), deberá sacar un promedio de R en las unidades no-exigibles. Por otro lado, mientras mayor sea la calificación global de las unidades exigibles, menor será el requerimiento en (2.26) para las unidades no-exigibles. De hecho, si se obtiene:

$$\bar{H}(k) \geq H_0 \equiv \hat{R} + \frac{M}{rE} (\hat{R} - R_{min}) \quad (27)$$

Tabla 10. Rendimientos

μ	Rendimiento promedio necesario en las unidades E^* para aprobar el módulo sin depender de las unidades N^*
μ_{min}	Rendimiento promedio mínimo exigible en las unidades E^* para aprobar sin depender de las unidades N^*
μ_{max}	Rendimiento promedio máximo exigible en las unidades E^* para aprobar sin depender de las unidades N^*

aprobaría el módulo sin necesidad de recurrir al aporte de unidades no-exigibles. Son importantes los siguientes parámetros:

Es claro que

$$H_0 = [\mu * R_{max}]_u.$$

Observación 2.5 A nuestro parecer es apropiado $\mu_{min} = 0.85$.

A partir de la relación (2.27) se obtiene una fórmula para determinar el valor de r :

$$r = \frac{M(\hat{R} - R_{min})}{E(\mu R_{max} - \hat{R})}. \quad (28)$$

De (2.2) y (2.28) se tiene que:

$$\mu_{max} \equiv \frac{1}{R_{max}} \left[\left(\frac{\eta_{max}}{1 - \eta_{max}} \right) \cdot (\hat{R} - R_{min}) + \hat{R} \right]; \quad (29)$$

y, puesto que $\mu_{max} \leq 1$, se sigue que:

$$\eta_{max} \leq \frac{R_{max} - \hat{R}}{R_{max} - R_{min}}. \quad (30)$$

2.10 Cursos intensivos de recuperación

Como ya se comentó anteriormente nuestro MCC puede ser aplicado por una unidad académica para llevar a cabo cursos intensivos de recuperación cuando amerite tal decisión. En este caso $J = 1$, es decir hay una única evaluación por cada unidad, y entonces la diferencia entre "exigible" y "no-exigible" desaparece y tampoco se aplica el juego de promoción - penalización. Para establecer con qué estudiantes se podría efectuar tal tipo de curso, se decide de la siguiente manera:

i) Si $C(k) \geq \hat{R}$, el estudiante k aprueba el módulo. **ii)** Si $\hat{R} - I \cdot u \leq C(k) \leq \hat{R} - u$, el estudiante k reprueba el módulo pero puede acceder a un curso intensivo de recuperación. **iii)** Si $C(k) < \hat{R} - I \cdot u$, el estudiante k reprueba el módulo sin opción a un curso intensivo de recuperación. enumerate Aquí I es un parámetro local tal que:

$$1 < I \leq I_{max}, \quad (31)$$

donde $I_{max} = R_{min} / u$ es un parámetro global.

3. SEGUIMIENTO A LA CONSTRUCCIÓN DEL PERFIL

En un Sistema de Créditos Académicos se puede clasificar a los módulos conforme al papel que juegan estos en la construcción del perfil profesional. Por facilidad, consideramos que el conjunto de módulos se puede clasificar por materias fundamentales, formativas, complementarias y de libre elección. Sin embargo, es claro que las fórmulas no captan esta restricción.

Criterio 3.1 Para la determinación de la nota de grado, cada módulo tiene un peso que es directamente proporcional a su número de créditos y que se balancea conforme al tipo de módulo.

Se introduce la siguiente notación

l	Superíndice de módulo
$\delta(l)$	Tipo de módulo
$n^{(l)}$	Créditos del módulo l

Por tanto,

$$\delta(l) = \begin{cases} \text{for,} & \text{si el módulo } l \text{ es formativo} \\ \text{fun,} & \text{si el módulo } l \text{ es fundamental} \\ \text{com,} & \text{si el módulo } l \text{ es complementario} \\ \text{ele,} & \text{si el módulo } l \text{ es de libre elección} \end{cases}$$

Se usan los conjuntos de módulos de acuerdo a su tipo: W_{for} , W_{fun} , W_{com} y W_{ele} ; y se denota W la unión de estos. Ponemos

$$\begin{aligned} v &= \# W, \\ v_{\delta(l)} &= \# W_{\delta(l)}, \\ P_{\delta(l)} &= \frac{v_{\delta(l)}}{v}, \end{aligned}$$

para todo $\delta(l)$. Se define para cada $l = 1, 2, \dots, v$,

$$y^{(l)} = \frac{n^{(l)}}{v_{\delta(l)}}, \tag{32}$$

$$\tilde{y}^{(l)} = \frac{n^{(l)}}{v} P_{\delta(l)}, \tag{33}$$

$$p^{(l)} = \frac{\tilde{y}^{(l)}}{\sum_{\theta=1}^v \tilde{y}^{(\theta)}}. \tag{34}$$

Observación 3.1 Es claro que

$$\begin{aligned} \sum_{l \in W_{\delta(\theta)}} y^{(l)} &= 1, \quad \text{para todo } \delta(\theta), \\ \sum_{l=1}^v p^{(l)} &= 1. \end{aligned}$$

La calificación de materias formativas, fundamentales, complementarias y de libre elección viene dada por la fórmula:

$$N_{\delta(\theta)} = \sum_{l \in W_{\delta(\theta)}} C^{(l)}(k) \cdot y^{(l)}, \quad \text{para todo } \delta(\theta). \tag{35}$$

La nota de grado viene dada por:

$$NG = \sum_{l=1}^v C^{(l)}(k) \cdot p^{(l)}. \tag{36}$$

4. APLICACIÓN DEL KERNEL DE LILMOD

El MCC y el modulo para determinar alumnos que van a curso de recuperación de LiLMOD fueron aplicados a varios cursos de matemática en Universidad de Talca mediante una implementación piloto en hoja electrónica. Concentremos nuestra atención en una muestra de 300 estudiantes de Ingeniería Industrial e Ingeniería en Sistemas quienes comparten el curso de Cálculo Diferencial. Para este grupo de estudiantes era la segunda vez que trabajaban con el MCC de manera que ya tenían claras sus características.

Puesto que en el Sistema de Educación de Chile se califica sobre 7.0 y se aprueba con 4.0, se ha trasladado esa información de manera que corresponda a una escala sobre 10. Por tanto los parámetros equivalentes utilizados son:

Tabla 11. Aplicación piloto

R_{\min}	1.0	R_{\max}	10.0
\hat{R}	7.0	u	0.1
N	0	M	3
J	3	D	7.0
α	0.85	P	0.5
I	10	G	0.25

Los pesos de las unidades exigibles se indican en la Tabla 12:

Tabla 12. Pesos de unidades

q_1	q_2	q_3
0.25	0.50	0.25

Resumiendo la información en las siguientes tablas:

Tabla 13. Unidad 1

Aprobados	Porcentaje	Promedio
Intento 1	61.2%	8.19
Intento 2	0.0%	NA
Intento 3	13.4%	7.0
Total	74.6%	7.98

Tabla 14. Unidad 2

Aprobados	Porcentaje	Promedio
Intento 1	68.7%	8.63
Intento 2	22.3%	7.67
Intento 3	0.0%	NA
Total	91.0%	8.39

Tabla 15. Unidad 3

Aprobados	Porcentaje	Promedio
Intento 1	50.7%	8.31
Intento 2	17.9%	7.40
Intento 3	1.5%	7.0
Total	70.1%	8.05

Uno observa claramente que los estudiantes se esfuerzan por aprobar las unidades exigibles al primer intento. El resumen final del curso está dado en la siguiente tabla.

Tabla 16. Resumen

Estudiantes	Porcentaje
Aprobados	62.7%
Reprobados	37.3%
A recuperación	25.4%

Como se puede ver el porcentaje de estudiantes en situación de abordar con probabilidades de éxito un curso intensivo de recuperación es significativo.

5. CONCLUSIONES

LiLMOD es una herramienta innovadora que conecta el modelamiento matemático con el ámbito educativo. Hasta donde se conoce, este trabajo es pionero en este ámbito en Ecuador.

Si bien su aplicación natural es en el ambiente universitario, se cree factible su implementación en el bachillerato. Por ejemplo, una adaptación del modelo matemático para el seguimiento de la construcción del perfil podría ser utilizado como una herramienta de apoyo al trabajo de orientación vocacional.

La separación de las componentes *exigencia* (BM) y *excelencia* (MS) en las formulaciones permite a una institución educativa llevar un mejor control de calidad sobre las cotas mínimas aceptables para las competencias.

Por otro lado, el criterio que establece que un estudiante ni aprueba ni reprueba una unidad académica a causa de sus aportes (deberes, trabajos, consultas, etc.) - al tiempo que los reconoce en la nota final - permite garantizar que el estudiante alcanza realmente las competencias necesarias para la construcción del perfil.

Las fórmulas presentadas en este trabajo requieren, como continuación lógica, una implementación computacional que permita su evaluación estadística y posibles depuraciones adicionales. Lugar natural de aplicación es el curso prepolitécnico (o preuniversitario) en virtud de la diferencia de objetivos entre los cursos de carrera y los cursos de nivelación; en estos últimos, uno encuentra una notable heterogeneidad entre los tópicos y niveles de conocimiento de manera que el alcance de las competencias a nivel de exigencia toma más tiempo.

6. REFERENCIAS

- Gil G. La medida de los conocimientos y destrezas de los alumnos. Un nuevo marco de evaluación., OCDE. Ministerio de Educación y Cultura, España, 2000.
- Hawes G., Evaluación de Competencias en la Educación Superior, IIDE. Universidad de Talca, Talca, 2005.
- Mayorga-Zambrano J. and C. Del Pino, Un modelo matemático para calificar dentro de un Sistema de Evaluación Basado en Competencias, Universidad de Talca, 2008.
- Tobón S., Competencias, Calidad y Educación Superior, Cooperativa Editorial Magisterio, 2006.

Evaluación de la sobrevivencia de protocormos de *Oncidium stenotis* en el proceso de encapsulación-deshidratación con miras a desarrollar un sistema de criopreservación

A. Roura. & M. Jadán

Laboratorio de Cultivo de Tejidos, Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Departamento de Ciencias de la Vida, Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador.

K. Proaño.

Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Departamento de Ciencias de la Vida, Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador.

RESUMEN: En la presente investigación se realizó la germinación *in vitro* de semillas de *Oncidium stenotis*, a partir de cápsulas maduras, donde se evaluó la interacción de ácido naftalen acético (ANA) (0.1, 0.5 y 1 mgL⁻¹), bencil amino purina (BAP) (1, 1.5 y 2 mgL⁻¹), ácido indolacético (AIA) (1, 1.5 y 2 mgL⁻¹) y ácido giberélico (GA₃) (0.1, 0.5 y 1 mgL⁻¹) tanto en medio Knudson C líquido como sólido con el fin de establecer el medio más adecuado para obtener un alto porcentaje de germinación. El ensayo con medio sólido se analizó en un diseño completamente al azar, mientras que el ensayo con medio líquido se evaluó mediante un arreglo factorial de 2x4x4 en un diseño estadístico completamente al azar, en ambos grupos se realizaron 3 repeticiones por tratamiento y control con un total de 53 tratamientos. Se analizó además, la incidencia de las diferentes fases del proceso de encapsulación-deshidratación en la viabilidad de los protocormos formados en la germinación. Para lo cual se realizaron pruebas de tinción con TTC y un recultivo en medio Knudson C sólido modificado por un periodo de 7 días en completa oscuridad, luego se trasplantaron a un medio Knudson C sólido con un fotoperiodo de 16 horas luz, en ambos periodos la temperatura fue de 23 ± 2° C. La evaluación de la sobrevivencia se la realizó cada día durante 15 días, por tinción con TTC al 1% por 2 horas a 70 °C. Además se evaluó el número de plántulas regeneradas a partir de protocormos sometidos a la fase de encapsulación, osmoprotección y deshidratación, más un tratamiento control. Los resultados de las pruebas de tinción y el número de plántulas regeneradas se analizaron mediante la prueba de chi-cuadrado. Los mejores tratamientos para la germinación *in vitro* fueron los que contenían 1, 1.5, y 2 mg.L⁻¹ de AIA en medio Knudson sólido. La fase de deshidratación fue la más importante en el proceso de encapsulación-deshidratación debido a su influencia en la supervivencia de los protocormos.

ABSTRACT: In this research, *in vitro* germination of *Oncidium stenotis* seeds was carried out, starting from mature capsules, where interaction between ABP, IAA and GA was evaluated, in Knudson C both solid and liquid media with the purpose of obtaining a high germination percentage in the smallest possible time. The incidence of the different stages of the technique of encapsulation-dehydration process in the viability of the protocorm was also analyzed, by recovering them. Staining with TTC to observe the relationship between the different phases of the encapsulation-dehydration process and the survival of the protocorms. The best treatments for *in vitro* germination were those that contained 1, 1.5, and 2 mgL⁻¹ of IAA on Knudson solid medium. The phases of osmoprotection, dehydration were the most important in the technique of encapsulation-dehydration process due to their influence in the survival of the protocorms. The best treatment for the recovery of the protocorms post-freezing was the one that used modified Knudson media amended with 0.5 mgL⁻¹ of ABP and 0.1 mgL⁻¹ of IBA showing an 80% recovery. The technique of capsulation-dehydration is an efficient tool for *Oncidium stenotis* protocorm future cryopreservation rendering a high recovery percentage. In this sense, the proposed methodology could also build a paradigm for advanced studies and establish cell tolerance mechanisms during dehydration and freezing.

1. INTRODUCCIÓN

El Ecuador posee probablemente la mayor diversidad de orquídeas a nivel mundial, debido principalmente a que nuestro país cuenta con una extensa variedad de microclimas que circunscriben especies en áreas muy restringidas, con características peculiares y muy específicas (Meisel & Woodward 2005). Actualmente en el Ecuador, la familia Orchidaceae se encuentra amenazada y con numerosas especies en peligro de extinción, principalmente debido a dos factores: a) la depredación selectiva de especies por parte de colectores comerciales, la cual es influenciada por la exportación y la comercialización que deriva en extinciones a nivel local; y b) la destrucción masiva de hábitats, producto de la invasión intensiva de tierras debido a la extracción de madera, el pastoreo, quema, tala de bosques, proyectos hidroeléctricos, extracción minera y a la agricultura migratoria, que deforestan unas 300000 hectáreas por año, exterminando flora y fauna nativa inclusive en áreas protegidas (Meisel & Woodward 2005). Teniendo en cuenta la importancia que desde el punto de vista ecológico, económico y social que tienen las orquídeas, se debe plantear su conservación efectiva y eficiente tanto in situ como ex situ. La conservación ex situ aseguraría la variabilidad genética de las especies en el tiempo en bancos de germoplasma. La conservación in situ, permitiría la evolución y la coevolución natural de las especies en sus hábitats naturales. La integración de los sistemas de conservación en los planes de desarrollo sustentable y en las estrategias globales de preservación, permitirán garantizar la conservación de la biodiversidad y su aprovechamiento sostenible al otorgar nuevas alternativas para el desarrollo (Rodríguez et al. 2005). Por estas razones es necesario establecer alternativas para la conservación de orquídeas desarrollando y fortaleciendo las iniciativas de conservación ex situ. El uso de la técnica de encapsulación-deshidratación para la crioconservación en nitrógeno líquido representa un método fácil, seguro y de baja relación costo-beneficio, que puede ser aplicado en preservar gran parte o toda la diversidad genética intra e interespecífica por largos períodos de tiempo sin intervención alguna (Linington & Pritchard 2001).

El presente trabajo se evaluó la sobrevivencia de protocormos de *Oncidium stenotis* luego de aplicar la técnica de encapsulación-deshidratación, con el fin de determinar los posibles problemas de sobrevivencia que presenten los protocolos para utilizar esta técnica en un posterior proceso de crioconservación. Como una perspectiva a corto plazo los resultados de este trabajo servirán como base para desarrollar sistemas in vitro que posibiliten la crioconservación de germoplasma de especies de orquídeas nativas del Ecuador.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Germinación

Las semillas de *Oncidium stenotis* se obtuvieron de 12 cápsulas con madurez fisiológica adecuada (fig. 1), recolectadas del Orquidario ORQUISAN de la provincia de los Tsachilas, las cuales fueron desinfectadas superficialmente con un procedimiento de lavados sucesivos en solución de hipoclorito de sodio al 1%, agua estéril y flameo con alcohol al 99% dentro de una cámara de flujo laminar (McKendrick, 2000). Se preparó medio Knudson C (1951) líquido con

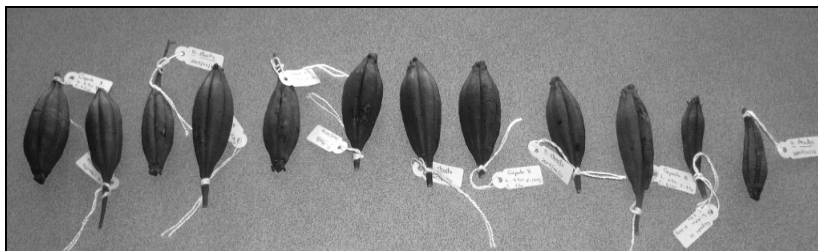


Figura 1: Cápsulas de *Oncidium stenotis* (Roura A., 2008).

30 gL⁻¹ de sacarosa con 0, 0,1, 0,5, y 1 mgL⁻¹ de ácido α -naftalén acético (ANA) y ácido giberélico (GA₃) y medio Knudson sólido con 30 gL⁻¹ de sacarosa, 7 gL⁻¹ de agar con 0, 1, 1,5, y 2 mgL⁻¹ de benziladenina (BAP), ácido indolacético (AIA) y ácido α -naftalén acético (ANA).

En total se probaron 53 tratamientos con 3 repeticiones repartidos en 2 grupos. Todos los medios se trabajaron en un rango de pH 5.5 - 5.7 (Ávila & Salgado 2006; Lee et al. 2007). En cada frasco se colocaron 30 mL de medio Knudson C líquido y sólido y se esterilizaron autoclavándolos a 121 °C 15 psi por 30 minutos.

2.2. Aplicación de la Técnica de Encapsulación-Deshidratación:

En la tabla 3 se detallan los tratamientos evaluados en cada paso del proceso de encapsulación-deshidratación. El análisis del número de plantas regeneradas en los tratamientos se realizó mediante una prueba de chi-cuadrado con 3 repeticiones por tratamiento. La sobrevivencia se evaluó mediante la tinción con TTC (cloruro de 2-3-5 trifenil tetrazolio) y se analizó mediante la prueba de chi-cuadrado con 3 protocormos diarios durante 15 días. Las condiciones del recultivo fueron 15 días (7 días en oscuridad y 8 días con luz). El medio de cultivo para la fase de recultivo fue Knudson modificado para la fase de oscuridad y Knudson C para la fase con fotoperiodo.

Tabla 3. Tratamientos evaluados en la fase de recultivo en cada paso del proceso de la técnica de encapsulación-deshidratación.

Tratamiento	Fases			Pruebas	
	Encapsulación	Osmoprotección	Deshidratación	Recultivo	
Control (Tratamiento 1)	—————→			Medio S.R.C	
2	Esferas de alginato	—————→		Medio S.R.C	
3	Esferas de alginato	Sacarosa (0.15, 0.25 y 0.75 M)	—————→	Medio S.R.C	
4	Esferas de alginato	Sacarosa (0.15, 0.25 y 0.75 M)	Sílica gel (5 horas)	—————→	Medio S.R.C

S.R.C: Sin reguladores de crecimiento

3. RESULTADOS

3.1. Germinación

En los ensayos de germinación para los tratamientos con medio líquido se analizó la interacción de 3 concentraciones de ANA y GA₃, en medio líquido de Knudson C mediante un ANOVA para observar la incidencia de los reguladores de crecimiento en el porcentaje de germinación.

En la figura 2 se aprecia que el uso de altas concentraciones de ANA: tratamiento 3 (0.5 mgL⁻¹ ANA) y tratamiento 4 (1 mgL⁻¹ ANA) tienen un efecto inhibitorio en la germinación de las semillas de orquídea, dando porcentajes de germinación de 5 y 3.33% respectivamente. Las concentraciones de ANA en combinación con GA₃ tienen un efecto sinérgico que estimulan la germinación de las semillas. Sin embargo, se observa un mayor porcentaje de germinación en el tratamiento 8 (0.1 mgL⁻¹ ANA, 0.1 mgL⁻¹ de GA₃), tratamiento 11 (0.5 mgL⁻¹ ANA, 0.1 mgL⁻¹ de GA₃) y 12 (0.5 mgL⁻¹ ANA, 0.5 mgL⁻¹ de GA₃) con un 93.33% aproximadamente, donde las concentraciones de la auxina ANA son mayores o iguales a las concentraciones de GA₃. El resto de tratamientos (incluyendo el tratamiento control) tienen un porcentaje que varía entre el 60 y 90% lo cual es muy aceptable para esta variable.



Figura 2. Efecto de la aplicación de ANA y GA₃ y sus interacciones en el porcentaje de germinación de los 16 tratamientos en medio líquido.

Los mejores tratamientos que se encontraron para los tratamientos con medio sólido fueron T8, T9 y T10 con concentraciones de 1, 1.5 y 2 mgL⁻¹ de AIA, respectivamente. Se evidencia además que los tratamientos T13, T16, T24, T26, T27, T31, T34, T35, T36, T37 con diferentes concentraciones de ANA, BAP y AIA no presentan indicios de germinación.

Existe un alto porcentaje de germinación de las semillas cuando no existen interacciones de los reguladores de crecimiento (fig. 3). Como en el caso de los tratamientos 2 al 10 y el tratamiento control (T1). En los tratamientos en que los reguladores de crecimiento están combinados no se evidencia una germinación significativa, por lo que se puede afirmar que la combinación de altas concentraciones de ANA, BAP y AIA no tiene efecto en el proceso de germinación de semillas de orquídeas.



Figura 3. Porcentajes de germinación de los 37 tratamientos del medio sólido mediante la utilización de diferentes concentraciones ANA, BAP, AIA.

3.2. Aplicación de la técnica de Encapsulación-Deshidratación:

3.2.1 Número de plántulas Regeneradas

El tratamiento en el cual se someten a los protocormos a la encapsulación y osmoprotección (tratamiento 3) tiene un bajo número de plántulas regeneradas (fig. 4). Al compararlo con el

tratamiento en el cual los protocormos son sólo encapsulados (tratamiento 2) donde hay un alto número de plántulas regeneradas. Con estos datos podemos sugerir que el estrés osmótico al que son sometidos los protocormos afecta su viabilidad. El tratamiento donde los protocormos son encapsulados, osmoprottegidos y deshidratados (tratamiento 4), tiene un bajo número de plántulas regeneradas por lo que al compararlo con el tratamiento dos nos indica que posiblemente la fuerte deshidratación es un factor que incide en la viabilidad de los protocormos.



Figura 4. Número de plantas regeneradas en las diferentes fases del proceso de crioconservación y en los medios de cultivo.

En la figura 5 se observa las características de las plántulas regeneradas a partir de protocormos. Se puede notar una coloración verde en su tejido el cual es indicativo de la actividad fotosintética. Se observa además, un aumento en el tamaño y una transformación morfológica de protocormo a plántula donde aparecen las primeras hojas, lo cual es un indicativo de que las plántulas tienen un desarrollo normal y que generan plantas de *Oncidium stenotis* totalmente normales.

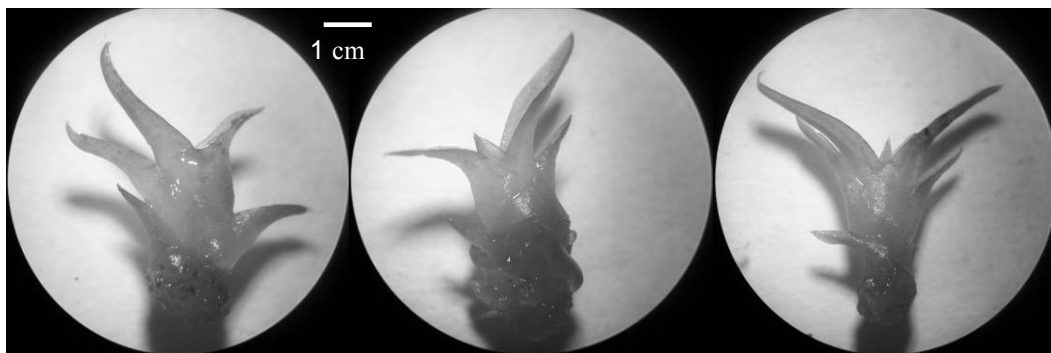


Figura 5. Fotografía de plántulas regeneradas a partir de protocormos (Roura A., 2009).

3.2.2 Tinción de protocormos

Se analizó la supervivencia de los protocormos en las diferentes fases de la técnica de encapsulación-deshidratación mediante la tinción con TTC de 3 protocormos por día durante los 15 días de recuperación por cada tratamiento. El factor a observar fue el número de protocormos teñidos en cada tratamiento, si el protocormo se tornaba rojo es indicativo de supervivencia (valor 1) mientras si toma una coloración rosada pálido o blanca es inicio de muerte celular

(valor 0). La valoración de uno y cero se dio para transformar a esta variable en una variable dicotómica y ser analizada mediante la prueba de chi-cuadrado y para observar la incidencia de los tratamientos en la supervivencia de los protocormos.

Al final de los 15 días de evaluación de la supervivencia de los protocormos se observa que todos los protocormos permanecen vivos luego de la fase de encapsulación a la que son sometidos los protocormos no afectan la supervivencia de los mismos. Mientras que las pruebas de chi-cuadrado en base a la tinción de los protocormos indican una relación de las fases de osmoprotección y deshidratación en la sobrevivencia de los mismos luego de los 15 días de recuperación, posiblemente debido a daños inducidos por el estrés a los que sometidos los protocormos.

4. DISCUSIÓN

Las semillas de algunos géneros de orquídeas son capaces de germinar *in vitro* (Knudson, 1922), sin embargo, cada especie de orquídea tiene diferentes necesidades de nutrientes para germinar. Existen varios factores complejos que influyen en la germinación y el crecimiento de las orquídeas. La temperatura, el fotoperiodo y la humedad, son ejemplos de las condiciones que influyen en la germinación. La composición del medio de cultivo también es un factor fundamental para el proceso de germinación, hormonas, agua, minerales, carbono y vitaminas son los componentes indispensables en los medios de germinación (Pierik, 1990).

Análisis realizados para determinar el porcentaje de germinación en los tratamientos del medio líquido, nos sugiere que concentraciones de 0.1 mgL⁻¹ de ANA, 0.5 mgL⁻¹ de GA3 y combinaciones de ANA y GA3 a concentraciones entre 0.1-0.5 mgL⁻¹ son los mejores tratamientos debido a los altos porcentajes de germinación que presentaron los ensayos.

En los tratamientos del medio sólido se observó que cuando no hay interacciones entre los reguladores de crecimiento (ANA, BAP y AIA) se favorece la germinación entre un 83,33% a un 100% aproximadamente. La mayoría de las interacciones de estos reguladores a distintas concentraciones presentan bajos porcentajes de germinación, con lo cual comprobamos que no hay una relación de estos reguladores con las concentraciones empleadas en esta investigación.

En estos ensayos los tratamientos control que no contenían reguladores de crecimiento evidenciaron una germinación del 60% para el medio líquido y del 58,33% para el medio sólido. Pierik (1990) manifiesta que no son necesarios los reguladores de crecimiento en el proceso de germinación de semillas de orquídea y que inclusive su presencia puede producir efectos no deseados, como los bajos porcentajes de germinación que se presentaron en esta investigación con el uso de altas concentraciones (0.5 – 1 mgL⁻¹) de ANA. Trabajos realizados en germinación de semillas de orquídea en medio de cultivo sin reguladores de crecimiento, demuestran que la composición del medio de cultivo y la especie son los factores que más influyen en la germinación de las semillas (Ruiz et al., 2008).

Al evaluar la metodología de encapsulación, osmoprotección, deshidratación de protocormos observamos que en el proceso de encapsulación se obtuvo un 90% de plántulas viables, por lo que posiblemente el estrés producido en este proceso no influye en la supervivencia de los protocormos. El proceso de encapsulación y osmoprotección disminuyó en un 50% las plántulas regeneradas, posiblemente las altas concentraciones de sacarosa a las que son sometidas las cápsulas, influyó en la viabilidad de los protocormos. La concentración y el tiempo de inmersión son dos aspectos a tomar muy en cuenta ya que en algunos casos las altas concentraciones de sacarosa pueden ser tóxicas y producir una baja recuperación.

En la deshidratación se debe eliminar la mayor cantidad de agua de las células de los protocormos para evitar la formación de cristales intracelulares que causen daños en las membranas plasmáticas. Luego de deshidratar las muestras se obtuvo un 60% de plántulas normales, lo que indica que este proceso tiene influencia en la viabilidad de los protocormos. Se

debe formar un estado vitrio que permita que el agua de las células pueda formar una estructura amorfa que no cause daño en las membranas (Engelmann, 2003). La eliminación del agua por deshidratación con lleva a la acumulación de solutos en los espacios intra y extra celulares, lo cual puede ser tóxico y afectar la viabilidad de los protocormos (Flachsland, 2002).

Las pruebas de chi-cuadrado junto a la tinción con TTC nos indican que existe una relación entre los tratamientos y la supervivencia de los protocormos en los procesos de deshidratación, lo cual es corroborado con el número de plantas regeneradas. En cambio, en los procesos de encapsulación, osmoprotección y en el tratamiento que evalúa el fotoperiodo sin fase de oscuridad, no existe relación con la supervivencia de los mismos.

El proceso de osmoprotección afecta la regeneración de plántulas, contrastando con el análisis de la supervivencia de los protocormos. Posiblemente las altas concentraciones de sacarosa son tóxicas para algunos procesos metabólicos que inhiben el normal desarrollo de las plántulas, más no la supervivencia. La tinción con TTC es una prueba cualitativa que nos permite visualizar rápidamente la supervivencia de los protocormos, lo que indica la existencia de tejido vivo en el momento de la tinción, mas no indica los daños celulares, bioquímicos o biofísicos que se pueden presentar en los protocormos sometidos a diferentes tratamientos.

Estos resultados sugieren que los protocormos se ven afectados por las diferentes fases del proceso de encapsulación-deshidratación. La técnica de cultivo de tejidos puede ser una alternativa para la recuperación de protocormos que han sido almacenados en NL, ya que con esta técnica se podría obtener plántulas desarrolladas al recultivarlas en medios de cultivo. En consecuencia, la prueba de TTC solo sirve como control del material para observar de una manera rápida el estado de los protocormos en el instante de la tinción y no un indicativo de la recuperación.

5. CONCLUSIONES

Los porcentajes más altos de germinación de semillas de *Oncidium stenotis* se obtuvieron con los tratamientos que contenían concentraciones de 1, 1.5 y 2 mgL⁻¹ de AIA en medio Knudson C.

La facilidad de la manipulación de las semillas germinadas y de la adición del medio de cultivo en caso de deshidratación está determinada por la presencia o ausencia de agar en el medio de cultivo Knudson C.

Los procesos de deshidratación y congelamiento en nitrógeno líquido son los más importantes en la metodología de crioconservación, debido a que el estrés causado por estos influye directamente en la supervivencia de los protocormos sometidos a este proceso.

La prueba de tinción TTC sirve como control del material para observar de una manera rápida y segura la supervivencia de los protocormos en el instante de la tinción.

La técnica de encapsulación-deshidratación se perfila como una herramienta eficiente en la crioconservación de protocormos de *Oncidium stenotis* al obtener un alto porcentaje de recuperación de éstos. En este sentido, la metodología propuesta también podría construir un paradigma para estudios avanzados y establecer mecanismos de tolerancia en las células durante la deshidratación y congelación.

6. REFERENCIAS

- Ávila, I. y Salgado-Garciglia R. 2000. Un sistema de propagación masiva de *Laelia speciosa* (HBK) Schlechter (Orchidaceae), como alternativa para la conservación. ¡Divulga!, revista de la CIC/UMSNH, 1:27-30.
- Ashmore, S. 1997. In: Status report on the development and application of in vitro techniques for the conservation and use of plant genetic resources. (ed.) F. Engelmann. International Plant Genetic Resources Institute, 1-67.

- Engelmann, F. 2003. Current research status and utilization of plant cryopreservation. In: Proceedings of the International Workshop on Cryopreservation of Bio-genetic Resources. International Technical Cooperation Center, RDA, Suwon, Korea, 3-5: 19-40
- Gonzalez-Arno, M., F. Engelmann, C. Urra; M. Morena y A. Rios. 1998. Cryopreservation of Citrus apices using the encapsulation-dehydration technique. *Cryo-Letters* 19: 177-182.
- Meisel, J. y Woodward, C. 2005. Andean Orchid Conservation and the Role of Private Lands: A Case Study from Ecuador. *Selbyana, The Journal of the Marie Selby Botanical Gardens*, 26(1): 49-57.
- McKendrick, S. 2000. Manual para la germinación in vitro de Orquídeas. Ceiba Foundation for Tropical Conservation © Copyright 2000.
- Pierik, R. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- Rodriguez, L. 2005. Producción y recuperación de orquídeas silvestres cubanas. Cuba. 2005. ISBN 959-250-156-4. Disponible en: www.dama.gov.cu.
- Ruiz, B. Laguna, C., Iglesias, A., Damon, A., Marín, H., Azpíroz, R. y Moreno, M. 2008. In vitro germination of *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae) seeds. *ΦΥΤΟΝ 77 Revista Internacional de BOTANICA EXPERIMENTAL*, 77: 203-215.

Inducción de embriogénesis somática de piñón (*Jatropha curcas*) para la obtención de semilla artificial

D. Freire, P. Jiménez & M. Jadán

Escuela Politécnica Del Ejército, Departamento de Ciencias de la Vida, Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Sangolquí - Ecuador

RESUMEN: En la presente investigación se estableció la inducción de embriones somáticos de piñón *Jatropha curcas* por vía indirecta a partir de callo embriogénico. El tejido vegetal utilizado para la investigación fue el pecíolo de la hoja, el cual fue sometido a la etapa de desinfección con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (1-1.6%) y tiempos de inmersión (10 y 15 min) obteniendo menor pérdida por contaminación y necrosis de tejido en el tratamiento de 10 min de tiempo de inmersión y 1.6 % de hipoclorito de sodio. Para la fase de formación de callo embriogénico se probó diferentes concentraciones de AIA (1-2 mg.L⁻¹) combinado con BAP (2.2-3.8 mg.L⁻¹) en un medio base de *M.S.* donde se obtuvo la mejor respuesta en el tratamiento 3.8 mg.L⁻¹BAP y 2 mg.L⁻¹AIA . En la etapa de maduración embrionaria se suplemento el medio de cultivo *M.S.* con diferentes concentraciones de GA3 (1.5-3 mg.L⁻¹) combinado con 250 mg.L⁻¹de glutamina y 15% de agua de coco, donde se evidenció mejor desarrollo en los tratamientos suplementados con glutamina. Una vez obtenido los embriones somáticos en fase cotiledonar madura, se procedió a encapsular en alginato de sodio disuelto en una solución de *M.S.* a la mitad de su fuerza iónica. Se encontraron concentraciones de biorreguladores ideales, que ayudaron a la micropropagación, aunque las plantas presentaron fitohormonas en sus tejidos y que en combinación con fuentes exógenas de biorreguladores pudieron causar inhibición en el crecimiento de los explantes.

ABSTRACT: This research explored induction of somatic embryos of *Jatropha curcas* nut by an indirect way using an embryogenic calli. The vegetal tissue used for this investigation was the leaf petiole. The disinfection of nut petiole leaves was performed with different concentrations of sodium hypochlorite (1-1.6%) and immersion times (10 and 15 min). It was obtained the less value of pollution and tissue death in the treatment that consist on 1.6% Sodium Hypochlorite and 10 min of immersion time. The embriogenic calli were induced from petioles on MS basal medium containing various concentrations of AIA (1-2 mg.L⁻¹) combined with BAP (2.2-3.8 mg.L⁻¹). The most effective combination for development of the embriogenic callus was 3.8 mg.L⁻¹ of BAP and 2 mg.L⁻¹ of AIA. In the maturation phase of somatic embryos, it was tested four treatments combining 250 mg.L⁻¹ of glutamine with 1.5 and 3 mg.L⁻¹ of GA3 and 15% of coconut water with same concentrations of GA3 in a *M.S.* It was evaluated percentages of death tissue, proembryogenic tissue and embryonaries structures in different growing phases. The best treatment was 250 mg.L⁻¹ of glutamine. Finally, the somatics embryos were encapsulated in sodium alginate dissolved on *M.S.* medium at 50% when they were in a cotyledonary phase. Best concentrations of growth regulators were found, which trigger the development of tissues *in vitro*, although plants had phytohormones in their tissues and in combination with exogenous sources of growth regulator could cause inhibition in the growth of explants.

1. INTRODUCCIÓN

El aceite obtenido de las semillas de piñón (*Jatropha curcas*) es utilizado para la elaboración de biodiesel lo cual contribuye como fuente de energía alternativa, la que puede remplazar a los combustibles tradicionales que causan deterioro al ambiente por sus altas emisiones de gases de efecto invernadero. La cantidad de aceite que se puede extraer de las semillas de piñón es de alrededor de un 40% además los subproductos resultantes de la extracción del aceite, como la pasta y cascarilla de las semillas, pueden ser usados para la obtención de biogás como fuente de energía (De La Vega, 2008).

Es importante recalcar que el aceite de piñón es no comestible, por lo que no se atenta contra la seguridad alimentaria, como es el caso de la utilización de cultivos comestibles para la elaboración de los biocombustibles, situación que ya se produjo en cultivos como el maíz, soja, caña de azúcar etc. Además, *Jatropha curcas* tiene la capacidad de sobrevivir y crecer en tierras marginales, erosionadas, pobres en nutrientes y que requiere de mínimo riego (Heller, 1996; Falasc et al, 2006).

Gracias a técnicas de micropropagación in vitro como la embriogénesis somática se puede obtener una gran cantidad de plantas clones a partir de pequeños tejidos, además existe la posibilidad de crioconservar los embriones o realizar la técnica de semilla artificial con fines comerciales. Al establecer embriogénesis somática por vía indirecta los callos embrionarios obtenidos, se los puede utilizar para realizar suspensiones celulares, las cuales después van a formar embriones somáticos en condiciones de cultivos líquidos y gracias a esta técnica se puede llegar a producir una gran cantidad de plantas, en periodos cortos de tiempo (Karami, 2008).

Por consiguiente el presente estudio buscó establecer medios de cultivo para la obtención de embriones somáticos viables para realizar la técnica de encapsulación. Por lo cual con los resultados obtenidos se podrá proporcionar una base importante para investigaciones futuras sobre técnicas de propagación in vitro.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. *Recolección de muestras*

Se seleccionó plantas jóvenes con buenas características morfológicas, como por ejemplo, uniformidad en la estructura y coloración en el área foliar y que no presenten tallos ni pecíolos lastimados o necrosados. Una vez elegida la planta con dichas características, se procedió a cortar los pecíolos de las hojas con una podadora previamente desinfectada con hipoclorito de sodio al 3%, inmediatamente después se colocó los pecíolos en fundas plásticas donde se añadió agua destilada estéril y se las empacó, al final se las colocó en un enfriador para transportarlas frescas. Las muestras fueron colectadas en la provincia de los Tsachilas-Ecuador.

2.2. *Desinfección del material vegetal*

Una vez colectados los pecíolos se los lavó con agua potable más detergente durante 20 minutos. Después se enjuagó con abundante agua e inmediatamente se las colocó en el primer fungicida el cual poseía como ingrediente activo carbendazim, se dejó durante 30 minutos (Thepsamran, 2006; Kalimutu *et al*, 2007; Jha *et al.*, 2007). A continuación previo a un lavado con agua estéril se los colocó en el segundo fungicida que tenía como ingrediente activo sulfato de cobre heptahidratado, igualmente durante 30 minutos. Después a los pecíolos se los enjuagó con agua estéril y se los trasvasó, a un recipiente de etanol al 70% durante un minuto y finalmente se los sumergió en diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión, para lo cual se probó ocho tratamientos como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1 Tratamientos de desinfección aplicados a los pecíolos de piñón.

Tratamientos	NaClO %	Tiempo de inmersión (minutos)
1	1.0	10
2	1.0	15
3	1.2	10
4	1.2	15
5	1.4	10
6	1.4	15
7	1.6	10
8	1.6	15

2.3. Inducción y multiplicación de callo embriónico y sobrevivencia de pecíolo al medio.

Para la inducción de callos embriónicos se utilizó como medio base las sales y vitaminas de *Murashige* y *Skoog* (1962). Para lo cual se probaron 3 concentraciones de benzilaminopurina (BAP) combinadas con 2 concentraciones de ácido indol acético (AIA) (Datta *et al.*, 2007; Jha *et al.*, 2007). Obteniendo un total de 6 tratamientos más un control como se muestra en la Tabla 2, donde se evaluó el área de callo embriónico formada y sobrevivencia del tejido (pecíolo) al medio de cultivo.

2.4. Maduración embrionaria

Después de 8 semanas de la siembra se observó el desarrollo de estructuras embrionarias en los callos embriónicos, este material vegetal fue recultivado a otro medio de cultivo de maduración embrionaria, para lo cual se probó cuatro tratamientos, variando la fuente de nitrógeno orgánico y la concentración de ácido giberélico (Tabla 3). Como medio base se utilizó *Murashige* y *Skoog* (1962) a la mitad de su concentración suplementado con 0.1 mg.L⁻¹ de ácido indol acético, 0.8 mg.L⁻¹ de benzilaminopurina, 2.5 mg.L⁻¹ sulfato de adenina, 40 g.L⁻¹ de sacarosa y como agente solidificante fita-gel al 1.7% (Muñoz, 2003; Jha *et al.*, 2007; *Sujatha et al.*, 2008).

2.5. Encapsulación (formación de la semilla artificial)

Una vez obtenidos los embriones somáticos en la fase cotiledonar madura se procedió a encapsular con alginato de sodio al 2% diluido en un medio M.S. a la mitad de su fuerza iónica. Para realizar esta técnica se preparó una solución de CaCl₂ a 50 mM en la cual con ayuda de una micropipeta se absorbió el embrión sumergido en el alginato y se lo trasvasó a una solución de cloruro, en donde se produjo la formación de la semilla artificial gracias al intercambio iónico que se produjo entre el Na⁺ y Cl⁻ (Silveira, 1999).

Tabla 2 Tratamientos para la inducción y multiplicación de callo embriónico.

Tratamientos	BAP mg.L ⁻¹	AIA mg.L ⁻¹
1	2.2	1
2	2.2	2
3	3	1
4	3	2
5	3.8	1
6	3.8	2
Control	0	0

Tabla 3 Tratamientos de maduración embrionaria.

Tratamientos	GA ₃ mg.L ⁻¹	Fuente de nitrógeno
1	1.5	Agua de coco (15%)
2	3	Agua de coco (15%)
3	1.5	Glutamina 250 mg.L ⁻¹
4	3	Glutamina 250 mg.L ⁻¹

2.6. Variables estudiadas

2.6.1 Porcentajes de contaminación y sobrevivencia a la desinfección

En esta etapa se evaluó la contaminación producida por hongos y la sobrevivencia del tejido al hipoclorito de sodio. Para lo cual se aplicó un DCA con ocho tratamientos y se realizó una prueba binomial al 95% de confianza para determinar la significancia entre tratamientos.

2.6.2 Área de callo producida y sobrevivencia de pecíolos al medio de cultivo

El diseño experimental establecido fue un DCA con seis tratamientos más el control, donde se evaluó el área de callo producido en un tiempo de 41 días después de la siembra. Para observar la significancia entre tratamientos se realizó un análisis de varianza. Para analizar la sobrevivencia se realizó una prueba binomial al 95% de confianza.

2.6.3 Maduración embrionaria y encapsulación

En esta fase se procedió cambiar los callos que presentaban estructuras embrionarias al medio de maduración, para un desarrollo óptimo de los embriones. En esta etapa se evaluó porcentaje de embriones, necrosis del material, callo y tejido proembriogénico formado. Una vez obtenido embriones en fase cotiledonar madura se procedió a encapsular o desarrollar la técnica de semilla artificial.

3. RESULTADOS

3.1. Número de pecíolos contaminados y sobrevivencia a la desinfección

Para analizar la significancia entre tratamientos de desinfección se realizó una prueba binomial, ya que se trabajó con variables dicotómicas (contaminado, no contaminado y vivo, muerto). Al realizar la prueba binomial con un nivel de confianza del 95% para analizar las variables contaminación fúngica y sobrevivencia de pecíolo de piñón, sobre el efecto de los tratamientos de desinfección, se obtuvo un valor de significancia de 0.009 para la variable contaminación fúngica y un valor de 0.0002 para la variable sobrevivencia de pecíolo (Tabla 4). Lo que quiere decir que por lo menos un tratamiento de desinfección va actuar de diferente manera tanto en la contaminación como en la sobrevivencia.

Se puede observar en la Figura 1 los porcentajes de pérdida total de pecíolos obtenidos en la etapa de desinfección. Además, se observa que en el tratamiento 1.6% de hipoclorito de sodio y 10 min de tiempo de inmersión existe una pérdida por contaminación fúngica del material vegetal (pecíolo) de 20% y por necrosis del 13%, teniendo una pérdida total del 33%, el cual fue el porcentaje más bajo de pérdida considerando así como el mejor tratamiento.

Tabla 4 Análisis de la prueba binomial para las variables contaminación fúngica y sobrevivencia de pecíolo de piñón *Jatropha curcas* bajo el efecto de los tratamientos de desinfección

Variable	Categoría	N	Proporción observada	Significancia
Contaminación fúngica	Contaminado	52	0.65	0.009
	No contaminado	28	0.35	
	Total	80	1	
Sobrevivencia de pecíolo	Muerto	57	0.71	0.0002
	Vivo	23	0.28	
	Total	80	1	

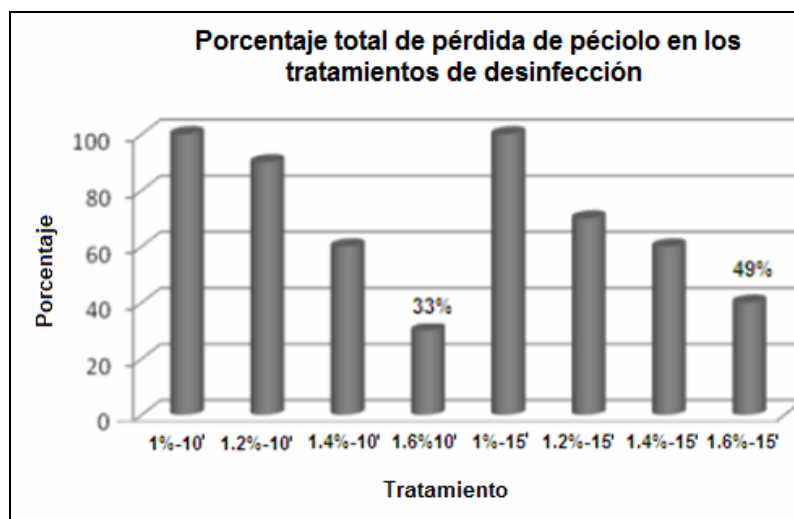


Figura 1 Porcentajes de pérdida total de pecíolos de piñón *Jatropha curcas* en la etapa de desinfección a las dos semanas de la siembra

3.2. Área de callo producida y sobrevivencia de pecíolos al medio de cultivo

Para el análisis de inducción y multiplicación de callo se realizó un análisis de variancia para los 3 días (18, 27 y 41). En la Tabla 5 se observa que se obtuvo una alta significancia para los tratamiento BAP x AIA lo que indica que por lo menos un tratamiento se comportó de diferente manera al resto, formando callo embriogénico. En las concentraciones de AIA se observó que también se presentaba una alta significancia lo cual nos dice que este biorregulador está relacionado con la formación de callo y en el análisis de las concentraciones de BAP se obtuvo un valor no significativo para los días 18 y 41 lo que indica que las diferentes concentraciones usadas no causaron una significancia en la inducción de callo como se presenta en la tabla 5.

Para analizar la variable sobrevivencia de pecíolo a los medios de cultivo se realizó una prueba binomial, ya que se trabajó con variables dicotómicas de vivo y muerto. Se obtuvo una significancia de 0.006 lo cual nos indica que si existe diferencia entre tratamientos a la sobrevivencia del pecíolo (Tabla 6).

En la Figura 2 se presentan los porcentajes de área obtenida y de sobrevivencia de pecíolo a los tratamientos de inducción y multiplicación de callo embriogénico. Se observó que los tratamientos 2 (1.5 mg.L⁻¹ de BAP y 2 mg.L⁻¹ de AIA) y el tratamiento 6 (3.8 mg.L⁻¹ de BAP y 2 mg.L⁻¹ de AIA) son los que mayor pecíolos vivos tuvieron además de presentar una mayor área de callo formada hasta los 41 días de la siembra.

Tabla 5 Análisis de varianza para la variable inducción y multiplicación de callo embriogénico a partir de peciolo de piñón *Jatropha curcas* para los diferentes tratamientos de inducción y multiplicación de callo

Fuentes de variación	GL	Evaluación de la inducción y multiplicación de callo a partir de peciolo a los 18, 27 y 41 días		
		18	27	41
TOTAL	34			
BAP x AIA	5	14.968**	14.34**	19.892**
AIA	1	6.818**	11.694**	15.475**
BAP	2	2.993 ^{ns}	4.257*	1.962 ^{ns}
BAPxAIAx Control	1	7.3*	1.52 ^{ns}	21.7**
Control	1	0.01 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.01 ^{ns}
ERROR	24	0.016	0.080	0.801
Área (cm²)		0.36	0.78	2.18

*0.05 **0.01 ns: no existe significancia

Tabla 6 Análisis de la prueba binomial para la variable sobrevivencia de peciolo de piñón *Jatropha curcas* bajo el efecto de los tratamientos de inducción y multiplicación de callo embriogénico a los 41 días de la siembra

Variable	Categoría	N	Proporción observada	Significancia
Sobrevivencia de peciolo al medio	Vivo	47	0.67	0.006
	Muerto	23	0.33	
	Total	70	1	

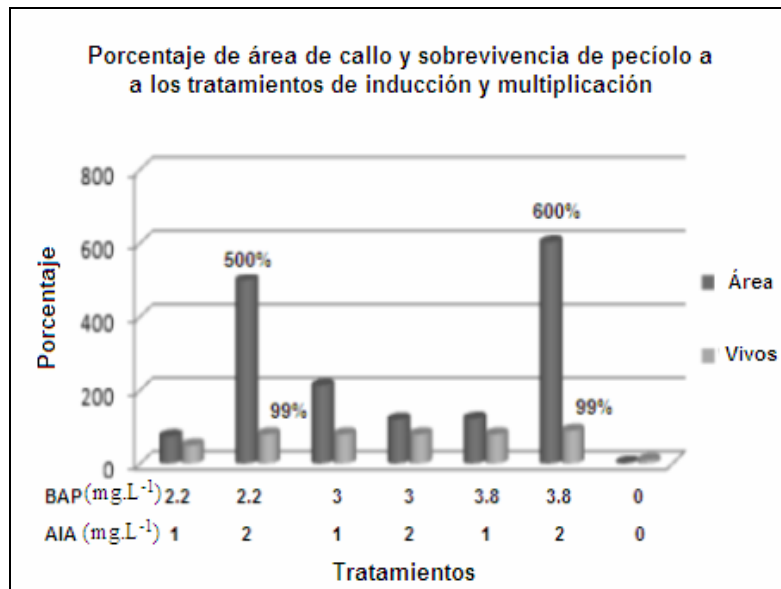


Figura 2 Porcentajes de área de callo embriogénico formada y sobrevivencia de peciolo de piñón *Jatropha curcas* a los diferentes tratamientos de inducción y multiplicación de callo embriogénico

3.3. Maduración embrionaria y encapsulación

En la fase de maduración embrionaria se procedió a cambiar de medio de cultivo a los callos embriogénicos que se obtuvieron en la fase de inducción y proliferación, aproximadamente a los 41 días de la siembra cuando el tejido desdiferenciado (callo) comenzaba a diferenciarse. En la

Figura 3 se muestra los porcentajes de callo que continuaban formándose en los medios de maduración después del cambio de medio, comportamiento del tejido a los medios de cultivo (necrosis), embriones somáticos en las diferentes etapas de desarrollo y finalmente el porcentaje de tejido proembrionario que presentaban estructuras preglobulares.

En esta fase de maduración embrionaria, además se analizó el crecimiento o desarrollo de la embriogénesis somática, identificando las diferentes fases embrionarias que se produjeron a lo largo del cultivo como se muestra en la Figura 4.

Una vez obtenido embriones en fase cotiledonar madura a aproximadamente después de 8 semanas de la siembra como se muestra en la Figura 4 en la fotografía E, se procedió a realzar la semilla artificial de piñón con alginato de sodio como se puede observar en la Figura 5.

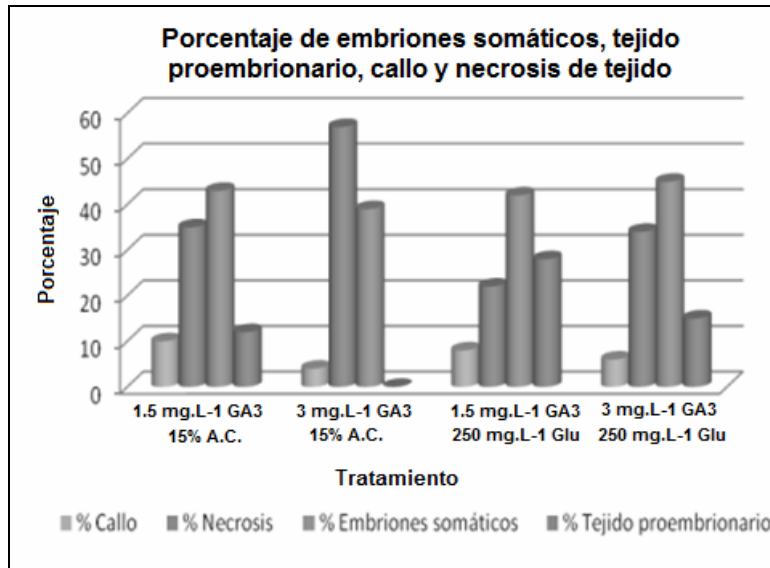


Figura 3 Porcentajes de callo, tejido necrosado, embriones somáticos y tejido proembriogénico que se produjo en los diferentes tratamientos de maduración embrionaria a partir de peciolo de piñón *Jatropha curcas*

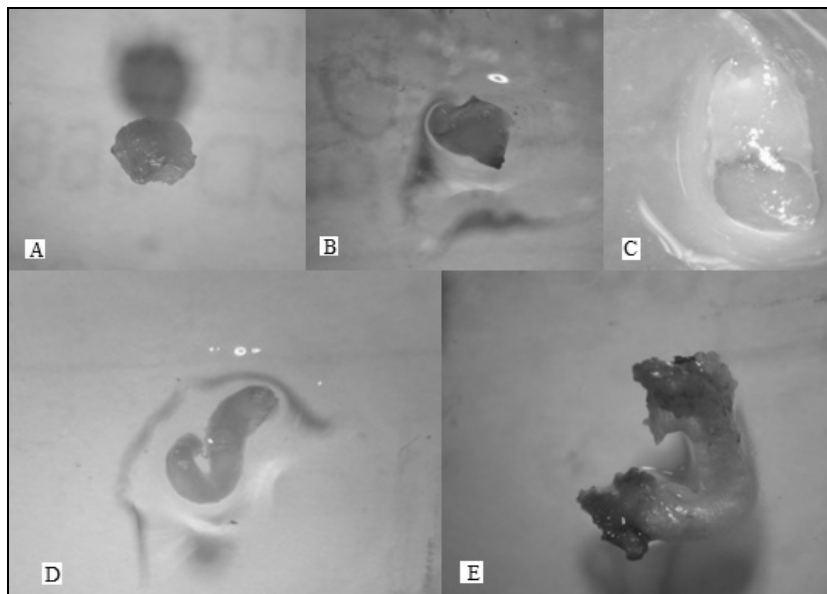


Figura 4 Fases de la embriogénesis somática de piñón *Jatropha curcas*. A) Fase globular, B) fase acorazonado, C) fase torpedo, D) fase cotiledonar y E) embrión maduro

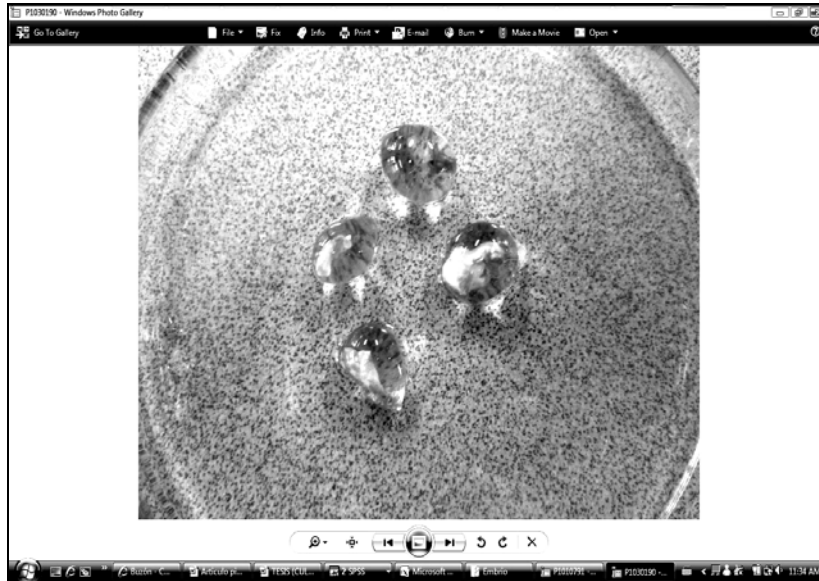


Figura 5 Semilla artificial de piñón *Jatropha curcas*

4. DISCUSIÓN

4.1. Porcentajes de contaminación y sobrevivencia a la desinfección

Para establecer un tratamiento de desinfección óptimo hay que evaluar la sobrevivencia del tejido, ya que el NaClO causa estrés fisiológico debido a que es un compuesto químico altamente oxidante, por lo cual se debe tener mucho cuidado con las concentraciones con las que se trabaje ya que puede causar la muerte del explante como se evidenció en el tratamiento 8 el cual tenía una concentración de hipoclorito de sodio del 1.6% y un tiempo de inmersión de 15 min (Roca et al. 1991).

En los tratamientos de desinfección 1%-10min, 1%-15min; 1.2%-10min, 1.2%-15min se presentó altos porcentajes de contaminación fúngica lo cual causó la muerte de los pecíolos debido a que los metabolitos que producen los hongos, son liberados al medio los cuales son tóxicos para los explantes, además de la elevada tasa de crecimiento del hongo lo cual recubrió por completo a los pecíolo sembrados en condiciones in vitro, causando la muerte de los pecíolos (Lázzari 1993).

Debido a que el piñón *Jatropha curcas* es una planta que tiene altos porcentajes de contaminación fúngica se procedió a utilizar dos fungicidas en la fase de desinfección, con diferentes ingredientes activos, para eliminar por completo los microorganismos presentes en el tejido vegetal, que se usó para establecer los cultivos (Jha et al. 2007).

4.2. Área de callo producida

En la etapa de establecimiento y multiplicación de callo, se probaron diferentes concentraciones de AIA y BAP obteniendo mejor resultado en el tratamiento 3.8 mg/L de BAP y 2 mg/L de AIA, debido a que presentó un área de callo mayor en la totalidad de las repeticiones, a comparación de los otros tratamientos. Para un desarrollo óptimo de los callos embriogénico hay que tener presente los varios factores que intervienen en el crecimiento de los explantes como es la edad del material vegetal y qué tipo de tejido se va a usar (Roca et al. 1991). Para lo cual en esta investigación se utilizó pecíolo de hojas jóvenes mantenidas en condiciones de invernadero.

Es muy importante establecer las concentraciones adecuadas de biorreguladores de crecimiento debido a que estos compuestos pueden causar inhibición del crecimiento y una posterior necrosis del tejido o no causen ningún efecto en el explante (Moncada et al. 1997).

Las condiciones físicas en las cuales se colocan los cultivos para su desarrollo, son muy importantes para un crecimiento adecuado del tejido. Condiciones de humedad, temperatura e intensidad de luz nos garantizan un crecimiento adecuado de los explantes. (Muñoz 2003). Por lo cual se mantuvieron los cultivos de embriones somáticos, en las condiciones más similares del hábitat natural de la planta donadora.

4.3. Maduración embrionaria y encapsulación

Es difícil establecer cultivos de embriones somáticos que mantengan una uniformidad de sus células en el desarrollo de nuevos clones o individuos, ya que el desarrollo de los embriones se produce independientemente uno del otro (Moncada et al. 1997; Muñoz 2003).

Para la maduración de los embriones somáticos es importante colocar fuentes extras de nitrógeno orgánico y carbono, para un buen desarrollo de las estructuras embrionarias y evitar una germinación precoz (Kyte 1996). Ya que los embriones en fase cotiledonar deben poseer buenas características como la diferenciación del cotiledón y la radícula, para ser encapsulados y formar la semilla artificial. Además es muy importante disminuir la concentración de auxina para evitar la formación de callo.

5. CONCLUSIONES

- En la fase de desinfección se presentó necrosis de los explantes debido a la contaminación fúngica. Necrosando en pocos días el tejido sembrado ya que el hongo o los mohos poseen una tasa de crecimiento mucho mayor a la de un tejido vegetal y además producen gran cantidad de metabolitos secundarios tóxicos para los explantes vegetales.
- Mantener las plantas que van hacer utilizadas para los cultivos in Vitro en condiciones de invernadero nos ayudó mucho en la fase de desinfección ya que se puede realizar tratamientos fitosanitarios que disminuyan los índices de contaminación a comparación de explantes que se obtienen de plantas en el campo.
- Es muy importante encontrar las concentraciones de biorreguladores adecuadas para una buena micropropagación, ya que las plantas poseen fitohormonas en sus tejidos y en combinación con fuentes exógenas de biorreguladores pueden causar inhibición en el crecimiento de los explantes.
- Una cantidad limitada de luces en la etapa de crecimiento de los embriones somáticos puede causar la muerte del tejido debido a que la intensidad de lumínica no es la suficiente para activar los fotosistemas y pueda realizar fotosíntesis.
- No se puede establecer una uniformidad en las fases de desarrollo de los embriones somáticos debido a que se originan de una célula o un grupo de ellas gracias a la activación o silenciamiento de los genes.
- La presencia de auxina impide un desarrollo adecuado de los embriones somáticos ya que este biorregulador tiene la característica de inducir y proliferar callo. Por lo cual va interrumpir la diferenciación de los embriones somáticos.

6. REFERENCIAS

- Datta M. M., Mukherjee P., Ghosh B., & Jha T. B. 2007. *In vitro* clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.), Current Science, 93:1438 – 1442.
- De la Vega J. 2008. *Jatropha curcas* L. Agro – Energía. Grupo Editorial 3W México SA de CV.
- Falasca S., & Ulberich A. 2006. Posibilidades de éxito de *Jatropha curcas* L. en Argentina. UNICEN, Buenos Aires – Argentina.
- Heller J. 1996. Physic nut. *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- Jha, T. Mukherjee, P. & Mukul, M. 2007. Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. Plant Biotechnol Rep., 1:135–140

- Kalimuthu K., Paulsamy S., Senthilkumar R., & Sathya M. 2007. *In vitro* Propagation of the Biodiesel Plant *Jatropha curcas* L. *Plant Tissue Culture & Biotechnology*, 17(2): 137 – 147.
- Karami, O. 2008. Induction of Embryogenic Callus and Plant Regeneration in Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Journal of Biological Sciences*, 8 (4): 68-72.
- Kyte, L. & Kleyn, J. 1996. *Plants from test tubes An Introduction to Micropropagation*. USA: Timber press. pp. 71.
- Lázzari, F.A. 1993. Humedad, hongos y micotoxinas na qualidade de sementes, granos y rações. Ed. 2, Curitiba, PR. pp.140.
- Moncada, E. Vielma, M. & Mora, A. 1997. Inducción *in vitro* de embriogénesis somática a partir de tejido foliar de *Coffea arábica* L. Variedad Catuai Amarillo.
- Muñoz, S. 2003. Embriogénesis somática en Cedro (*Cedrela odorata* Linnaeus) a partir de Cotiledones. Universidad Agraria La Molina.
- Roca, W. & Mroginski, L. 1991. Cultivo de tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Colombia: CIAT. pp. 144 - 151.
- Silveira, V. 1999. Embriogéneses somática e sementes sintéticas, Laboratorio de Biotecnologia. CBB/UENF Santa Catarina-Brasil.
- Sondahl, M. Nakamura, T. & Sharp, W. 1981. Propagación *in vitro* de café. DNA Plant Technology Corporation, Cinnaminson.
- Sujatha, M. Reddy, T. & Mahasi, M. 2008. Role of biotechnological interventions in the improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L. *Biotechnology Advances*, 26(5): 424-435
- Thepsamran N., Thepsithar C., & Thongpukdee A. 2006. *In vitro* multiple shoot induction of physic nut (*Jatropha curcas*). Proceedings of the 32nd Congress on science and technology of Thailand, 10 – 12 Octubre, 2006.

Una familia de controladores tipo Exponencial – Hiperbólico

F. Terneus

Departamento de Energía y Mecánica, Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador

F. Reyes

Facultad de Ciencias Eléctricas, Benemérita Universidad Autónoma del Estado de Puebla, Puebla, México

RESUMEN: Este artículo estudia la problemática del control de posición en robots manipuladores. Con este propósito, se analiza una familia de controladores Exponencial Hiperbólicos. La familia propuesta consiste en algoritmos con una estructura no lineal, que incorpora componentes de tipo hiperbólico con el fin de llevar el error de posición a cero. Se presentan suficientes condiciones para probar estabilidad asintótica global del sistema de lazo cerrado compuesto por el modelo dinámico no lineal de un robot de n grados de libertad y el algoritmo propuesto. Adicional a los resultados teóricos, se presentan pruebas comparativas de tiempo real. Esto ilustra el desempeño de la familia propuesta frente a otros bien conocidos algoritmos como PD y tangente hiperbólica en un robot manipulador de tres grados de libertad.

ABSTRACT: This research studies different issues related to the control of position in robot manipulators. With this purpose a hyperbolic exponential family of controllers is analyzed. The oncoming family consists of algorithms with a non linear structure that contains hyperbolic components to bring the error of position to zero. Several conditions are studied to test global asymptotic stability of closed loop that is formed by a non linear dynamic model of a robot with n degrees of freedom and the suggested algorithm. Besides the theoretical results, comparative proofs of real time performance are presented. This illustrates the implementation of the suggested family compared to other well known algorithms, such as PD and hyperbolic tangent in a robot manipulator of three degrees of freedom.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad los robot manipuladores ofrecen desafíos tanto teóricos como prácticos en el área de control debido a la no – lineal y multivariable naturaleza de su comportamiento dinámico (Su et al. 2006) (Sun et al. 2006) (Jarzebowska, 2006). En particular, el control de posición de robots rígidos lo cual representa una de las más relevantes capítulos en la práctica de manipuladores (Santibañez et al. 2005). El problema consiste en mover el manipulador de cualquier posición de estado inicial a la posición deseada asegurando el error de posición y velocidad en cero. (Kelly 1995) (Siavico & Siciliano 1996). Los reguladores que alcanzan este objetivo para todas las condiciones deseadas e iniciales se llaman globalmente convergentes (Canudas et al. 1996). La función de Liapunov es una herramienta indispensable en el análisis y diseño de controladores para sistemas no lineales y juegan un papel importante en el estudio de la estabilidad de robots manipuladores. La estabilidad asintótica se alcanza utilizando el principio de invarianza de La Salle (Khalil 2002). Se utiliza la metodología de moldeo de energía (Takegaki & Arimoto 1981) para estudiar el control PD con compensación de gravedad. Usando moldeo de energía se logra estabilidad global para un sistema de lazo cerrado con una selección trivial de las ganancias proporcional y derivativa, y aplicando el principio de La Salle se obtiene estabilidad asintótica (Arimoto & Miyazaki 1986). Varios autores utilizan la técnica de moldeo de energía para diseñar algoritmos de control usando la función de Liapunov. (Ho & Tu, 2006) (Wang et al., 2002) (Arai & Tachi 2002). La estabilidad asintótica la obtienen con el principio de invarianza de La Salle (Kelly & Carelli 1996) (Seraji 1998) (Hsia 1994) (Santibañez et al. 1998) (Loria et al. 2000) (Reyes & Rosado 2005).

En vista de la simplicidad y aplicabilidad del control PD en aplicaciones industriales, el propósito de este artículo es unificar los resultados previos del control lineal PD con los controladores de tipo Hiperbólicos para robots manipuladores con los que se obtiene estabilidad asintótica global de un sistema de lazo cerrado utilizando el método directo de Liapunov. El esquema de control propuesto tiene una estructura no lineal que incorpora componentes de tipo hiperbólico para un rápido posicionamiento del error a cero. Adicionalmente al desarrollo teórico, este artículo también presenta una comparación de cinco controladores de posición: tres miembros de la familia propuesta versus la Tangente Hiperbólica y el PD en un robot de tres grados de libertad.

Este artículo está organizado de la siguiente manera. La sección 2 recapitula la dinámica del robot y las más usadas propiedades de estabilidad. En la sección 3, la familia propuesta es presentada junto a su análisis de estabilidad asintótica global con la función de Liapunov.

La sección 4 resume los principales componentes del equipo experimental. La sección 5 contiene la comparación experimental con tres controladores de la propuesta familia versus Tangente Hiperbólica y PD en tres grados de libertad. Finalmente, se ofrecen algunas conclusiones en la sección 6.

1.1 Dinámica del Robot

En la ausencia del fenómeno de fricción y otras distorsiones, la dinámica de un robot de eslabones rígidos en serie puede escribirse de la siguiente manera: (Spong & Vidvasagar 1989)

$$M(q)\ddot{q} + C(q, \dot{q})\dot{q} + g(q) = \tau \quad (1)$$

Donde q es el vector $n \times 1$ del desplazamiento angular de los eslabones, τ es el vector $n \times 1$ del torque de ingreso, $M(q)$ es la matriz de inercia $n \times n$ simétrica y definida positiva, $C(q, \dot{q})$ es la matriz $n \times n$ de la fuerza Centrípeta y de Coriolis, y $g(q)$ es el vector $n \times 1$ del torque gravitacional obtenido del gradiente de la energía potencial.

Se asume que los eslabones están unidos por juntas de revolución. La ecuación del modelo dinámico del robot (1) tiene algunas propiedades fundamentales que pueden ser explotadas para facilitar el diseño del sistema de control. Para el control propuesto las siguientes propiedades son usadas:

Propiedad 1. La matriz de inercia $M(q)$ es simétrica, definida positiva, por lo tanto $\exists M(q)^{-1}$ que es también una matriz simétrica y definida positiva. Ambos $M(q)$ y $M(q)^{-1}$ son uniformemente acotadas como función de $q \in R^n$, esto es $\|M(q)\| < \beta$, donde β es una constante real positiva, estrictamente hablando, el acotamiento de la matriz de inercia requiere que todas las uniones sean de revolución (Koditschek, 1998) (Ortega & Spong, 1998).

$$\beta \geq n \left(\max_{(i,j) \in \{1, \dots, n\}} |M_{i,j}(q)| \right) \quad (2)$$

Donde $M_{i,j}$ son los elementos de $M(q)$

Propiedad 2. Ver (Koditschek, 1984), (Spong & Vidyasagar, 1989) y (Romeo et al., 1998) La matriz $C(q, \dot{q})$ definida usando los símbolos de Christoffel la derivada de la matriz de inercia satisface:

1. $\dot{q}^T \left[\frac{1}{2} \dot{M}(q) - C(q, \dot{q}) \right] \dot{q} = 0 \forall q, \dot{q} \in R^n$
2. $\dot{M}(q) = C(q, \dot{q}) + C(q, \dot{q})^T \forall q, \dot{q}$

Propiedad 3. La matriz de coriolis satisface lo siguiente (Spong & Vidyasagar 1989) (Ortega & Spong 1998):

1. Si $\dot{q} = 0$ entonces $C(q, \dot{q}) \in R^{n \times n} \forall q \in R^n$
2. $\dot{q}^T C(q, \dot{q}) \dot{q}$ esta acotado como una función de $q, \dot{q} \in R^n$ entonces $\|\dot{q}^T C(q, \dot{q}) \dot{q}\| < \|\dot{q}\|^2 k_c$, donde $k_c \in R_+$

1.1. Una familia de controladores Exponenciales Hiperbólicos

Esta sección presenta la familia propuesta de controladores exponencial hiperbólico y su análisis de estabilidad asintótica global. Se intentará extender los resultados de un simple control PD a una gran clase controladores hiperbólicos para robots manipuladores. Considere el siguiente esquema con compensación de gravedad con

$$\tau = K_p \frac{ch(\lambda \tilde{q})^{m-1} sh(\lambda \tilde{q})}{1 + ch(\lambda \tilde{q})^m} - K_v \frac{ch(\alpha \dot{q})^{m-1} sh(\alpha \dot{q})}{1 + ch(\alpha \dot{q})^m} + g(q) \tag{3}$$

Donde $K_p \in R^{n \times n}$ es la ganancia proporcional y es una matriz diagonal, $K_v \in R^{n \times n}$ es una matriz definida positiva, y los siguientes términos son definidos de la siguiente manera:

$$\frac{ch(\lambda \tilde{q})^{m-1} sh(\lambda \tilde{q})}{1 + ch(\lambda \tilde{q})^m} = \begin{bmatrix} \frac{ch(\lambda \tilde{q}_1^{m-1} sh(\lambda \tilde{q}_1)}{1 + ch(\lambda \tilde{q}_1^m)} \\ \vdots \\ \frac{ch(\lambda \tilde{q}_n^{m-1} sh(\lambda \tilde{q}_n)}{1 + ch(\lambda \tilde{q}_n^m)} \end{bmatrix} \tag{4}$$

$$\frac{ch(\alpha \dot{q})^{m-1} sh(\alpha \dot{q})}{1 + ch(\alpha \dot{q})^m} = \begin{bmatrix} \frac{ch(\alpha \dot{q}_1^{m-1} sh(\alpha \dot{q}_1)}{1 + ch(\alpha \dot{q}_1^m)} \\ \vdots \\ \frac{ch(\alpha \dot{q}_n^{m-1} sh(\alpha \dot{q}_n)}{1 + ch(\alpha \dot{q}_n^m)} \end{bmatrix} \tag{5}$$

Donde λ_i and $\alpha_i \in R_+$ m es el exponente, que es un número entero positivo, $\tilde{q} \in R^n$ es el vector error de posición, que está definido como $\tilde{q} = q_d - q$, con $q_d \in R^n$ representa la posición deseada; ch() y sh() son el coseno y seno hiperbólico, respectivamente.

El problema de control consiste en seleccionar las matrices K_p y K_v de tal manera que el error de posición y la velocidad angular del eslabón tiendan a cero asintóticamente.

Considere el modelo dinámico del robot (1), junto con la ley de control (2), el sistema de lazo cerrado es global y asintóticamente estable y la posición $\lim_{t \rightarrow \infty} q(t) = q_d \wedge \lim_{t \rightarrow \infty} \dot{q}(t) = 0$ es alcanzada.

La ecuación de lazo cerrado obtenida de combinar el modelo dinámico del robot (1) y el esquema de control (2), puede ser escrita así:

$$\frac{dy}{dt} \begin{bmatrix} \tilde{q} \\ \dot{\tilde{q}} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -\dot{\tilde{q}} \\ M^{-1}(q) \left[K_p \frac{ch(\lambda \tilde{q})^{m-1} sh(\lambda \tilde{q})}{1 + ch(\lambda \tilde{q})^m} - K_v \frac{ch(\alpha \dot{q})^{m-1} sh(\alpha \dot{q})}{1 + ch(\alpha \dot{q})^m} - C(q, \dot{q}) \dot{q} \right] \end{bmatrix} \tag{6}$$

La cual es una ecuación diferencial autónoma. Ahora, se puede demostrar que el punto de equilibrio existe y es único.

Note que $-\dot{q} = 0 \Rightarrow -Iq = 0 \Rightarrow \dot{q} = 0$, donde $I \in \mathbf{R}^{n \times n}$ es la matriz identidad.

Para el segundo componente de la ecuación (5) $C(q, \dot{q}) = 0$ de acuerdo a la propiedad (3). $M(q) > 0 \Rightarrow \exists M(q)^{-1} > 0$ Por lo tanto.

$$M^{-1}(q) \left[K_p \frac{ch(\lambda \tilde{q})^{m-1} sh(\lambda \tilde{q})}{1 + ch(\lambda \tilde{q})} \right] = 0 \Leftrightarrow sh(\lambda \tilde{q}_i) \Leftrightarrow \tilde{q}_i = 0 \quad (7)$$

Por lo tanto

$$K_p \frac{ch(\lambda \tilde{q})^{m-1} sh(\lambda \tilde{q})}{1 + ch(\lambda \tilde{q})} = 0 \Leftrightarrow \tilde{q}_i = 0 \quad (8)$$

Con $K_{p_i} \in \mathbf{R}^+$, $K_p = diagonal(K_{p_i})$

Por lo tanto el origen del espacio de estado el único punto de equilibrio.

Para obtener el análisis de estabilidad de la ecuación (5), las siguientes funciones de Lyapunov son propuestas:

$$V(\tilde{q}; \dot{\tilde{q}}) = \frac{1}{2} \dot{\tilde{q}}^T M(\tilde{q}) \dot{\tilde{q}} + \frac{1}{m} \begin{bmatrix} \sqrt{\ln\left(\frac{1 + ch(\lambda \tilde{q}_1^m)}{2}\right)} \\ \vdots \\ \sqrt{\ln\left(\frac{1 + ch(\lambda \tilde{q}_n^m)}{2}\right)} \end{bmatrix}^T \Lambda^{-1} K_p \begin{bmatrix} \sqrt{\ln\left(\frac{1 + ch(\lambda \tilde{q}_1^m)}{2}\right)} \\ \vdots \\ \sqrt{\ln\left(\frac{1 + ch(\lambda \tilde{q}_n^m)}{2}\right)} \end{bmatrix} \quad (9)$$

Donde Λ^{-1} es la matriz diagonal representada así:

$$\Lambda = \begin{bmatrix} \frac{1}{\lambda_1} & & 0 \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & & \frac{1}{\lambda_n} \end{bmatrix} \quad (10)$$

El primer término de $V(\tilde{q}; \dot{\tilde{q}})$ es una función definida positiva con respecto a $\dot{\tilde{q}}$ porque $M(\tilde{q})$ es una matriz definida positiva. El segundo término de la función candidata de Lyapunov (8), que puede ser interpretada como la energía potencial inducida por el error de posición es también una función definida positiva con respecto al error de posición \tilde{q} , porque K_p es una matriz definida positiva diagonal.

Por lo tanto, la función candidata de Lyapunov (8) es radialmente desacotada y definida positiva.

La derivada con respecto al tiempo de la función candidata de Lyapunov (8) es:

$$\dot{V}(\tilde{q}, \dot{\tilde{q}}) = \dot{\tilde{q}}^T M(q) \dot{\tilde{q}} + \frac{1}{2} \dot{\tilde{q}}^T \dot{M}(q) \dot{\tilde{q}} + \left[\begin{array}{c} \sqrt{\ln\left(\frac{1 + ch(\lambda \tilde{q}_1)^m}{2}\right)} \\ \vdots \\ \sqrt{\ln\left(\frac{1 + ch(\lambda \tilde{q}_n)^m}{2}\right)} \end{array} \right]^T A^{-1} K_p \left[\begin{array}{c} \sqrt{\ln\left(\frac{1 + ch(\lambda \tilde{q}_1)^m}{2}\right)} \\ \vdots \\ \sqrt{\ln\left(\frac{1 + ch(\lambda \tilde{q}_n)^m}{2}\right)} \end{array} \right] \dot{\tilde{q}} \quad (11)$$

A lo largo de la trayectoria de la ecuación de lazo cerrado (5) y luego de ciertas simplificaciones algebraicas:

$$\dot{V}(\tilde{q}, \dot{\tilde{q}}) = \dot{\tilde{q}}^T k_v \frac{ch(\lambda \tilde{q}_i)^{m-1} sh(\lambda \tilde{q}_i)}{1 + ch(\lambda \tilde{q}_i)^m} + \dot{\tilde{q}}^T \left[\frac{1}{2} \dot{M}(q) - C(q, \dot{q}) \right] \dot{\tilde{q}} \quad (12)$$

Y usando la propiedad 2, esto se puede escribir así:

$$\dot{V}(\tilde{q}, \dot{\tilde{q}}) = -\dot{\tilde{q}}^T k_v \left[\begin{array}{c} \frac{ch(\lambda \tilde{q}_1)^{m-1} sh(\lambda \tilde{q}_1)}{1 + ch(\lambda \tilde{q}_1)^m} \\ \vdots \\ \frac{ch(\lambda \tilde{q}_n)^{m-1} sh(\lambda \tilde{q}_n)}{1 + ch(\lambda \tilde{q}_n)^m} \end{array} \right] \leq 0 \quad (13)$$

Que es una función semidefinida negativa, por lo tanto se concluye que el punto de equilibrio es estable. Con el fin de probar la estabilidad asintótica global, se usa la ecuación de lazo cerrado (2) cuando se aplica el principio de invarianza La Salle:

En la región

$$\Omega = \left\{ \left[\begin{array}{c} \tilde{q} \\ \dot{\tilde{q}} \end{array} \right] \in \mathcal{R}^{2n} : \dot{V}(\tilde{q}, \dot{\tilde{q}}) = 0 \right\} \quad (14)$$

La única invarianza es $\left[\tilde{q}^T \quad \dot{\tilde{q}}^T \right]^T = 0 \in \mathcal{R}^{2n}$, por lo tanto $\lim_{t \rightarrow \infty} \left[\begin{array}{c} \tilde{q}(t) \\ \dot{\tilde{q}}(t) \end{array} \right] \rightarrow 0$.

2. EQUIPO

El equipo para investigación de algoritmos de control ha sido diseñado y construido en la “Benemérita Universidad Popular Autónoma del estado de Puebla”. Es un brazo manipulador de tres grados de libertad que se mueve en el espacio tridimensional (ver figura 1).

El robot experimental consiste en eslabones construidos de aluminio 6061, movidos por servomotores de transmisión directa sin escobillas de la Parker Compumotor. Las ventajas de este tipo de motor incluye una baja fricción comparada con el sistema por engranajes. Los motores usados en el robot experimental se encuentran en la Tabla 1.



Figura 1: Robot experimental. Posición de casa.

Tabla 1: Servo motores del robot experimental

Eslabón	Modelo	Torque [Nm]	Pasos / rev.
Base	DM – 1015B – 60	15	2621440
Hombro	DM – 1050A – 115	50	4096000
Codo	DM – 1004C – 115	4	2621440

Los servos son operados en el modo de torque, recibiendo de entrada una señal analógica. La posición se obtiene de los encoders localizados en el motor. El espacio de trabajo del robot es de un metro cúbico.

Adicionalmente el motor incluye un control de movimiento de la marca Precisión MicroDynamic Inc., que es usado para obtener las posiciones de los eslabones. El algoritmo de control se aplica en una computadora Pentium II (333 MHz).

Con referencia al robot, solamente se requiere el vector gravitacional para implementar la nueva familia de controladores (2), que está disponible en (Reyes & Kel 1997)

$$g(q) = \begin{bmatrix} 0 \\ 1.02 \sin(q_1) + 0.20 \sin(q_1 + q_2) \\ 0.20 \sin(q_1 + q_2) \end{bmatrix} [Nm]. \quad (15)$$

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

En esta sección se presenta una comparación experimental de cinco controladores de posición de tres grados de libertad en un robot manipulador de transmisión directa para soportar el

desarrollo teórico. Para investigar el desempeño entre controladores, se han clasificado como E2H, E3H y E4H de la familia Exponencial Hiperbólica, donde $m = 2,3$ y 4 respectivamente. Se llama TANH y PD a los controladores de Tangente Hiperbólica y Proporcional derivativo, respectivamente.

Para comparar el desempeño de los controladores en el robot de transmisión directa, un experimento de control de posición se desarrolla cuyo objetivo es mover el efector final del manipulador desde su posición inicial hasta su posición deseada establecida. Para la presente aplicación la posición deseada se ha escogido así: $[q_{d1}, q_{d2}, q_{d3}]^T = [45, 45, 90]^T$ grados, donde q_{d1}, q_{d2}, q_{d3} representa la posición de la base, hombro y codo respectivamente. La posición inicial y velocidades son cero. El fenómeno de fricción no ha sido modelado para propósito de compensación. Como resultado, ningún controlador muestra compensación de fricción. Los controladores evaluados han sido escritos en lenguaje C. Las muestras se toman cada 2.5 msec. Las figuras 1 y 2 muestran las posiciones inicial y deseada para el robot manipulador respectivamente.

3.1. Resultados Experimentales para los controladores de la familia Exponencial Hiperbólica

De la ecuación (2), con $n = 3$ grados de libertad del brazo manipulador, (ver figura 1), las siguientes clases de controladores son encontrados: Con el exponente $m = 2$, este miembro de la familia es llamado E2H, la ecuación para las tres articulaciones están dadas así:



Figura 2: Posición deseada del robot experimental

$${}^T E2H1 = N_{p1} \frac{\text{ch}(\lambda q_1) \text{sh}(\lambda q_1)}{1 + \text{ch}(\lambda q_1)^2} - N_{v1} \frac{\text{ch}(q_1) \text{sh}(q_1)}{1 + \text{ch}(q_1)^2}$$

$${}^T E2H2 = N_{p1} \frac{\text{ch}(\lambda q_2) \text{sh}(\lambda q_2)}{1 + \text{ch}(\lambda q_2)^2} - N_{v1} \frac{\text{ch}(q_2) \text{sh}(q_2)}{1 + \text{ch}(q_2)^2} + 1.02 \sin(q_2) + 0.2 \sin(q_2 + q_3) \quad \square$$

$${}^T E_{3H3} = K_{p1} \frac{\text{ch}(\lambda \dot{q}_2) \text{sh}(\lambda \dot{q}_2)}{1 + \text{ch}(\lambda \dot{q}_2)} - K_{v1} \frac{\text{ch}(\alpha \dot{q}_2) \text{sh}(\alpha \dot{q}_2)}{1 + \text{ch}(\alpha \dot{q}_2)} + 0.2 \sin(q_2 + q_3) \quad (16)$$

Con el exponente $m = 3$, este miembro de la familia es llamado E3H, la ecuación para las tres articulaciones están dadas así:

$$\begin{aligned} {}^T E_{3H1} &= K_{p1} \frac{\text{ch}(\lambda \dot{q}_1)^3 \text{sh}(\lambda \dot{q}_1)}{1 + \text{ch}(\lambda \dot{q}_1)^3} - K_{v1} \frac{\text{ch}(\alpha \dot{q}_1)^3 \text{sh}(\alpha \dot{q}_1)}{1 + \text{ch}(\alpha \dot{q}_1)^3} \\ {}^T E_{3H2} &= K_{p1} \frac{\text{ch}(\lambda \dot{q}_2)^3 \text{sh}(\lambda \dot{q}_2)}{1 + \text{ch}(\lambda \dot{q}_2)^3} - K_{v1} \frac{\text{ch}(\alpha \dot{q}_2)^3 \text{sh}(\alpha \dot{q}_2)}{1 + \text{ch}(\alpha \dot{q}_2)^3} + 1.0z \sin(q_2) + 0.2 \sin(q_2 + q_3) \\ {}^T E_{3H3} &= K_{p1} \frac{\text{ch}(\lambda \dot{q}_3)^3 \text{sh}(\lambda \dot{q}_3)}{1 + \text{ch}(\lambda \dot{q}_3)^3} - K_{v1} \frac{\text{ch}(\alpha \dot{q}_3)^3 \text{sh}(\alpha \dot{q}_3)}{1 + \text{ch}(\alpha \dot{q}_3)^3} + 0.2 \sin(q_2 + q_3) \end{aligned} \quad (17)$$

Con el exponente $m = 4$, este miembro de la familia es llamado E4H, la ecuación para las tres articulaciones están dadas así:

$$\begin{aligned} {}^T E_{4H1} &= K_{p1} \frac{\text{ch}(\lambda \dot{q}_1)^4 \text{sh}(\lambda \dot{q}_1)}{1 + \text{ch}(\lambda \dot{q}_1)^4} - K_{v1} \frac{\text{ch}(\alpha \dot{q}_1)^4 \text{sh}(\alpha \dot{q}_1)}{1 + \text{ch}(\alpha \dot{q}_1)^4} \\ {}^T E_{4H2} &= K_{p1} \frac{\text{ch}(\lambda \dot{q}_2)^4 \text{sh}(\lambda \dot{q}_2)}{1 + \text{ch}(\lambda \dot{q}_2)^4} - K_{v1} \frac{\text{ch}(\alpha \dot{q}_2)^4 \text{sh}(\alpha \dot{q}_2)}{1 + \text{ch}(\alpha \dot{q}_2)^4} + 1.0z \sin(q_2) + 0.2 \sin(q_2 + q_3) \\ {}^T E_{4H3} &= K_{p1} \frac{\text{ch}(\lambda \dot{q}_3)^4 \text{sh}(\lambda \dot{q}_3)}{1 + \text{ch}(\lambda \dot{q}_3)^4} - K_{v1} \frac{\text{ch}(\alpha \dot{q}_3)^4 \text{sh}(\alpha \dot{q}_3)}{1 + \text{ch}(\alpha \dot{q}_3)^4} + 0.2 \sin(q_2 + q_3) \end{aligned} \quad (18)$$

Donde τ representa los torques aplicados a la base, hombro y codo respectivamente.

Las ganancias de los controladores fueron seleccionadas empíricamente. Sin embargo, múltiples pruebas fueron necesarias para asegurar un comportamiento aceptable en la práctica, esto es una respuesta rápida y un pequeño error en estado estable.

Para evitar la saturación del torque en los actuadores y que trabaje en la zona lineal, la ganancia proporcional fue escogida de manera tal que $\tau < \|\tau_{\max}\|$, donde τ_{\max} representa el torque máximo aplicado en la junta i . (Véase los límites de los actuadores en la Tabla 1).

La fórmula empírica que fue usada para seleccionar la ganancia proporcional es: $K_{p1} = 80\% \frac{\tau_{\max}}{q \dot{q}_1}$. Para disminuir el error, el factor λ debe ser incrementado. Mientras λ incrementa, la pendiente del algoritmo es mayor. Fijadas las ganancias proporcionales, las derivadas deben ser ajustadas para obtener una señal amortiguada. Para un valor bajo de α se obtiene una relación proporcional entre la velocidad y el factor derivativo.

Las matrices K_p y K_v para esta familia propuesta son las mismas para E2H, E3H y E4H, que corresponden a los exponentes $m = 2, 3$ y 4 respectivamente. Las figuras de la 3 a la 8 contienen los resultados experimentales de la familia Exponencial Hiperbólica. Hay tres miembros de la familia E2H, E3H, E4H, para cada uno hay un gráfico de error de posición y torque. Los gráficos de error de posición muestran que los tres eslabones tienden a una vecindad cercana a cero. Esta característica muestra las propiedades de la familia propuesta. Los gráficos del torque aplicado muestra que el actuador trabaja en su zona lineal y no en la de saturación.

Tabla 2. Límites de actuadores

kp	[Nm]	kv	[Nm]
Kp1	12	Kv1	60
Kp2	32	Kv2	8
Kp3	3.2	Kv3	0.5

Tabla 3. Valores de λ

λ	[rad/degrees]	α	[rad/degrees]
λ_1	3.14/4	α	3.14/1000
λ_2	3.14/0.75	α	3.14/1000
λ_3	3.14/1.4	α	3.14/1000

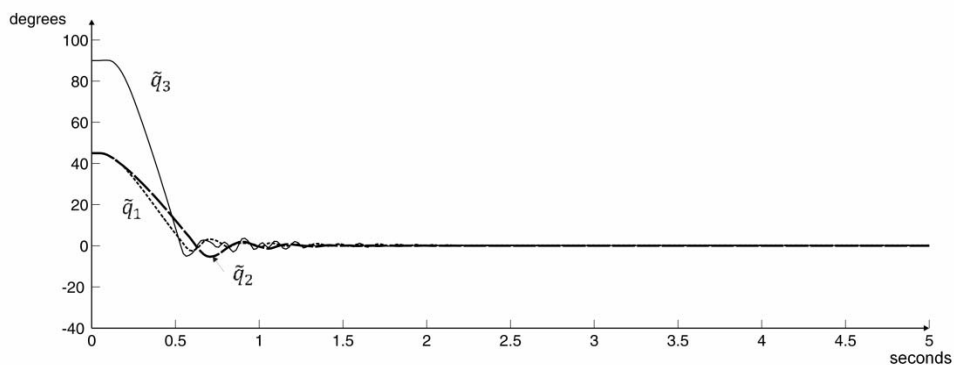


Figura 3. Error de posición del controlador E2H

Figura 3 y 4, corresponde al controlador E2H. La posición en estado estable inicia aproximadamente a $t = 2$ seg. y $[\tilde{q}_{d1}, \tilde{q}_{d2}, \tilde{q}_{d3}]^T = [0.0258, 0.184, 0.1038]^T$ grados

La figura 5 y 6, corresponde al controlador E3H. El estado estable inicia aproximadamente a $t = 1.5$ seg., y $[\tilde{q}_{d1}, \tilde{q}_{d2}, \tilde{q}_{d3}]^T = [0.0110, 0.1804, 0.100]^T$ grados.

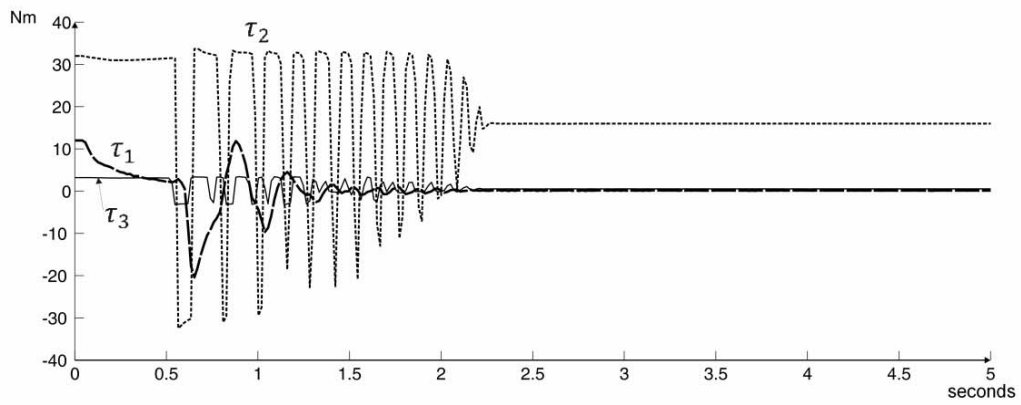


Figura 4. Torque aplicado al controlador E2H.

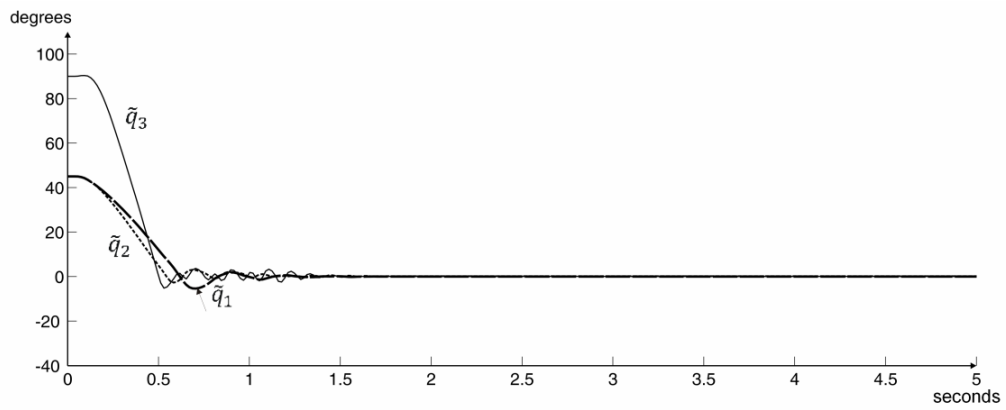


Figura 5. Error de posición para el controlador E3H

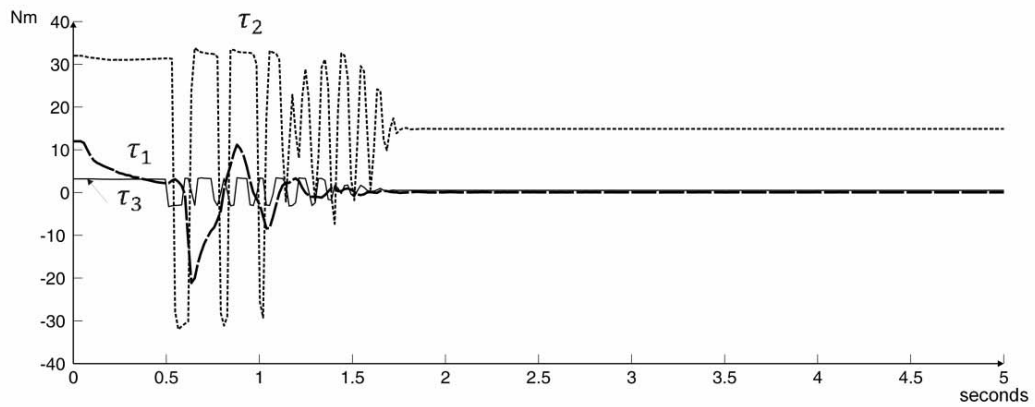


Figura 6. Torque aplicado al controlador E3H

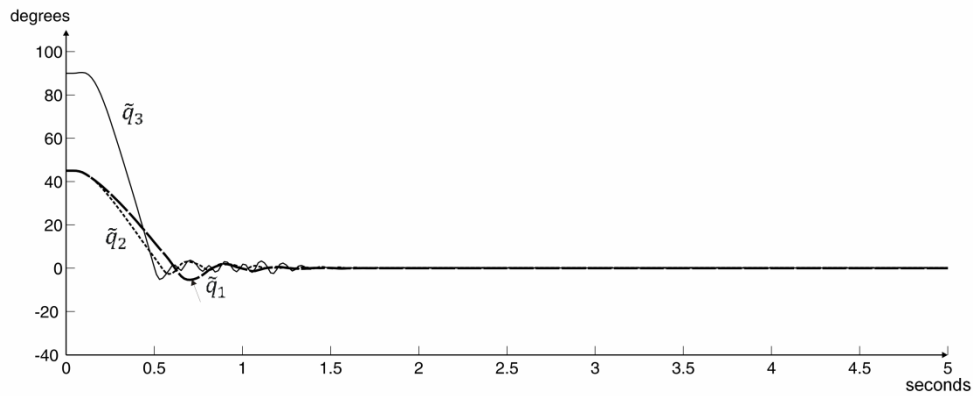


Figura 7. Error de posición del controlador E4H

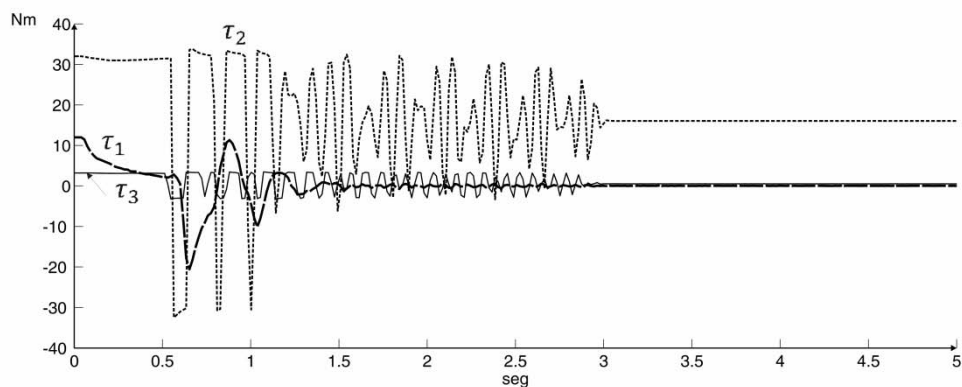


Figura 8. Torque aplicado al controlador E4H

Las figuras 7 y 8, corresponden al controlador E4H. La posición de estado estable inicia a $t = 3$ seg., y $[\tilde{q}_{d1}, \tilde{q}_{d2}, \tilde{q}_{d3}]^T = [0.0027, 0.1811, 0.1027]^T$ grados.

4. RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LOS CONTROLADORES TANGENTE HIPERBÓLICA Y PD

Esta sección presenta los resultados de los controladores Tangente Hiperbólica y PD, la posición deseada y condiciones iniciales son las mismas que en la sección previa. Las figuras 9 y 12 contienen los resultados experimentales de esta parte. Los controladores TANH y PD para los tres grados de libertad del robot son dados por las siguientes ecuaciones.

$$\tau_{TANH1} = K_{p1} \tanh(\tilde{q}_1) + K_{v1} \tanh(\dot{q}_1)$$

$$\tau_{TANH2} = K_{p2} \tanh(\tilde{q}_2) - K_{v2} \tanh(\dot{q}_2) + 1.0z \sin(q_2) + 0.2 \sin(q_2 + q_3)$$

$$\tau_{TANH3} = K_{p3} \tanh(\tilde{q}_3) - K_{v3} \tanh(\dot{q}_3) + 0.2 \sin(q_2 + q_3) \tag{19}$$

$$\begin{aligned}
 \tau_{PD1} &= K_{p1}(\dot{q}_1) + K_{v1}(\dot{q}_1) \\
 \tau_{PD2} &= K_{p2}(\dot{q}_2) - K_{v2}(\dot{q}_2) + 1.02 \sin(q_2) + 0.2 \sin(q_2 + q_3) \\
 \tau_{PD3} &= K_{p3}(\dot{q}_3) - K_{v3}(\dot{q}_3) + 0.2 \sin(q_2 + q_3)
 \end{aligned}
 \tag{20}$$

Donde $(\tau_{TANH1}, \tau_{PD1}), (\tau_{TANH2}, \tau_{PD2})$ and $(\tau_{TANH3}, \tau_{PD3})$ representa los torque aplicados a la base, hombro y codo respectivamente. Múltiples experimentos fueron llevados a cabo con los controladores TANH y PD para seleccionar sus ganancias así como también el menor tiempo de respuesta sin sobretiro y mínimo error de posición sin entrar en la zona de saturación del torque del actuador. Las ganancias del TANH y del PD fueron seleccionadas así:

$K_{pi} = 80\% \frac{\tau_{imax}}{qd_i}$ y $k_{vi} \ll k_{pi}$. Después de un procedimiento de prueba y error, las ganancias proporcional y derivativa fueron seleccionadas convenientemente para no entrar en la zona de saturación. Los valores de K_{pi} y K_{vi} para la TANH y el PD se muestran en la Tabla 3 y 4, respectivamente.

La Figura 9 contiene resultados experimentales de error de posición para el TANH. El error de posición estable inicia aproximadamente entre $t = 1.5$ seg. y 2 seg. y $[\theta_{e1}, \theta_{e2}, \theta_{e3}]^T = [0.0027, 0.1811, 0.1027]^T$ grados.

La figura 10 y 12 muestran el torque aplicado con El TANH y PD controlador para la base, hombro y codo. Estas curvas están dentro de los límites de torque de sus respectivos actuadores más no en su zona de saturación. La figura 11 contiene los resultados experimentales del error de posición de controlador PD. La posición estable inicia a $t = 2.5$ seg. y $[\theta_{e1}, \theta_{e2}, \theta_{e3}]^T = [0.8108, 11.9658, 27.1879]^T$ grados.

Tabla 3 Valores de K_{pi} y K_{vi} para TANH

K_p	[Nm]	k_v	[Nm]
k_{p1}	4	k_{v1}	6E-4
k_{p2}	32	k_{v2}	1E-2
k_{p3}	3.2	k_{v3}	1E-3

Tabla 4 Valores de K_{pi} y K_{vi} para PD

k_p	[Nm]	k_v	[Nm]
k_{p1}	0.3	k_{v1}	6E-4
k_{p2}	0.9	k_{v2}	1E-2
k_{p3}	0.045	k_{v3}	1E-3

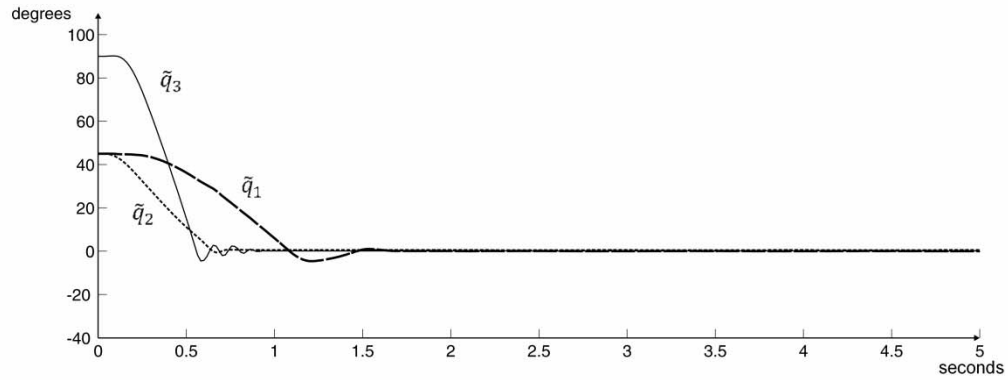


Figura 9. Torque aplicado al controlador E4H

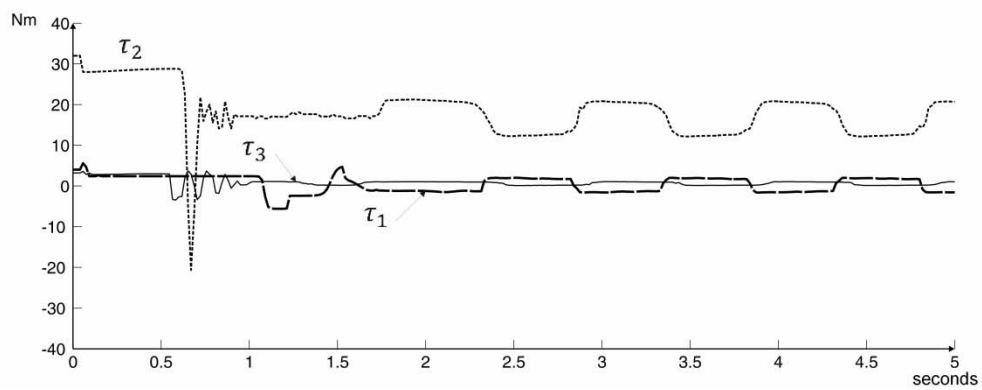


Figura 10. Torque aplicado al controlador TANH

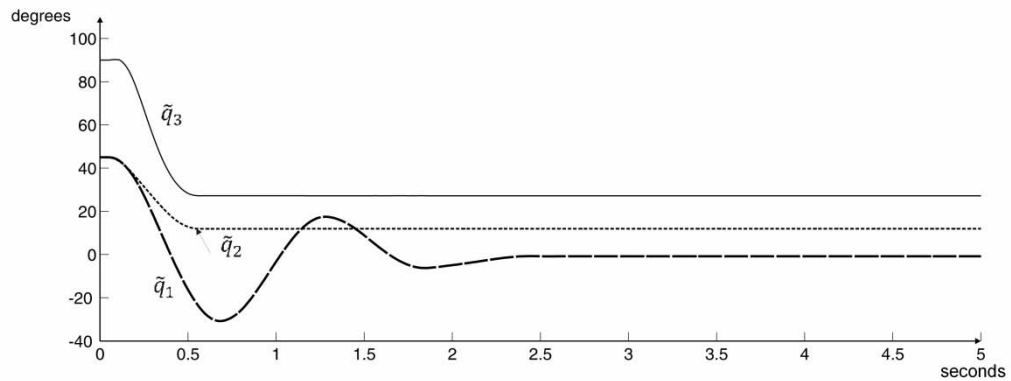


Figura 11. Torque aplicado al controlador PD

5. ÍNDICE DE DESEMPEÑO

Los robots manipuladores son sistemas mecánicos muy complejos, debido a la no linealidad y multivariable naturaleza de su comportamiento dinámico. Por esta razón, en la comunidad de robótica hay un criterio no bien establecido aún para la apropiada evaluación de los controladores de robots.

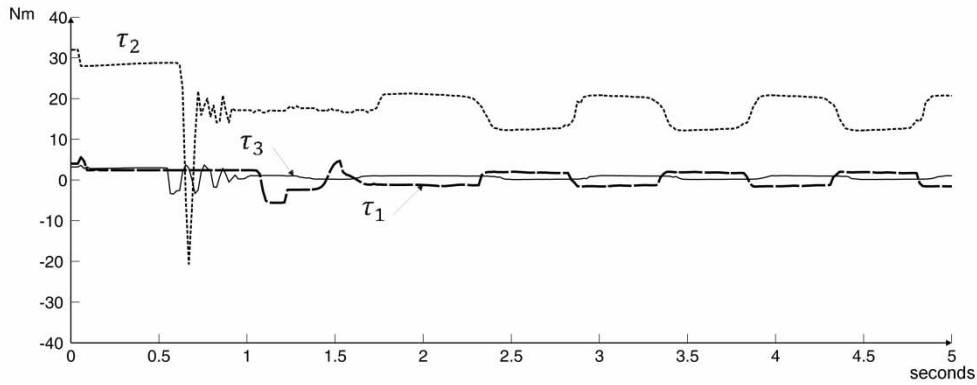


Figura 12. Torque aplicado al controlador PD

Sin embargo, en la práctica es aceptado para comparar el desempeño de controladores usando la norma \mathcal{L}^2 que es un valor escalar que sirve como referencia del error total de la curva. Whitcomb et al. (1993) De Jager & Banens (1994) Berghuis et al (1995) Jaritz & Spong (1996). La norma \mathcal{L}^2 mide el promedio de la raíz cuadrada del error de posición \tilde{q} que es dado por:

$$\mathcal{L}^2[\tilde{q}] = \sqrt{\frac{1}{t - t_0} \int_{t_0}^t \|\tilde{q}\|^2 dt}$$

Donde $t_0, t \in \mathbb{R}_+$ son los tiempos inicial y final respectivamente. Un pequeño \mathcal{L}^2 representa pequeños errores de posición y es el mejor desempeño del controlador evaluado. Los datos son comparados con respecto a los controladores TANH y al PD. El promedio de la norma \mathcal{L}^2 para varias pruebas son los siguientes: 26.22, 26.13, 26.00, 28.25, 37.94 grados para E2H, E3H, E4H, TANH y PD respectivamente.

La totalidad de resultados están resumidos en la Figura 13 que incluye los índices de desempeño de todos los controladores. Para promediar las influencias estocásticas, los datos presentados en esta Figura representa el promedio del error de posición de diez corridas. En general el controlador propuesto tiene un mejor desempeño que los controladores TANH y PD en aproximadamente 7.5% y 31% respectivamente. El desempeño d los tres miembros de la familia propuesta (E2H, E3H E4H) son casi los mismos.

Los resultados entre las diferentes corridas fueron tabulados y el promedio fue de: 0.5%, 0.7%, 0.1%, 0.11% 0.43% para E2H, E3H, E4H, TANH y PD respectivamente, lo cual resalta la repetitibilidad del experimento.

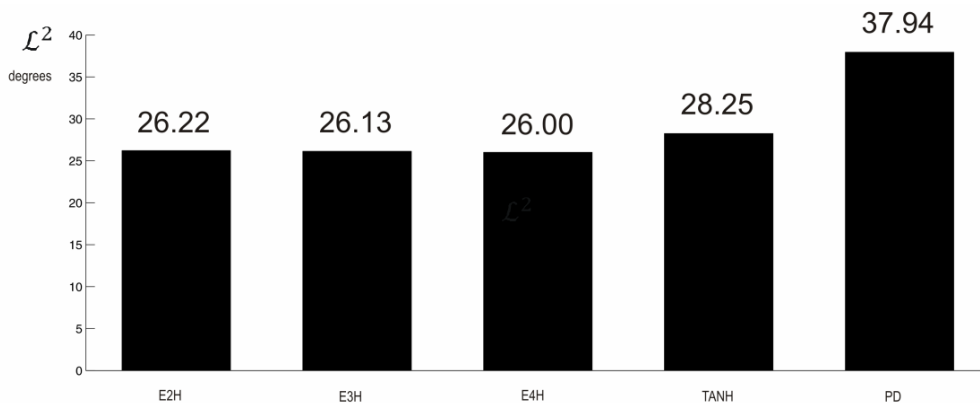


Figura 13. Índice de desempeño del estado transiente y estacionario

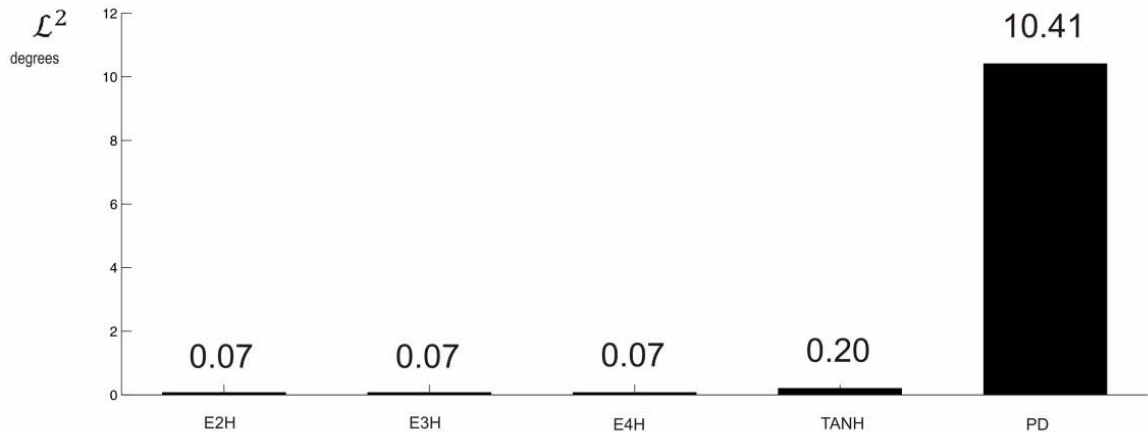


Figura 14. Índice de desempeño del estado estacionario

Con el fin de comparar el error, los valores de la norma \mathcal{L}^2 para estado estacionario han sido obtenidos (Figura 14). Estos valores son tomados en el último segundo para cada prueba, entre el cuarto y quinto segundo, y son los siguientes: 0.07, 0.07, 0.07, 0.2 y 10.41 grados para E2H, E3H, E4H, TANH y PD, respectivamente. La Figura 14 muestra los resultados y evidencia el pobre resultado del controlador PD en el estado estacionario.

La norma \mathcal{L}^2 para el estado estacionario para el controlador propuesto es 0.13 grados menor que TANH que representa el 65%. Con respecto al controlador PD es 10.34 grados

6. CONCLUSIONES

- En este artículo un nuevo esquema de control de posición para robots manipuladores fue introducido, esto es, la familia de controladores Exponencial Hiperbólica. Esta soportada por un riguroso análisis de estabilidad y los resultados establecen condiciones para asegurar globalidad.
- El desempeño del nuevo esquema fue comparado con otros controladores como la TANH y el PD usando un experimento de comparación en tiempo real en un robot de tres grados de libertad. Los resultados experimentales del nuevo esquema fueron suficientes para probar un mínimo error en estado estacionario en comparación con el TANH y el PD que mostraron ser menos robustos que la familia propuesta.
- Esta nueva familia muestra la menor norma \mathcal{L}^2 , por lo tanto el mejor desempeño entre los controladores evaluados y la menor norma \mathcal{L}^2 para el estado estacionario, que indica el mínimo error entre los controladores evaluados. Por esta razón, se puede concluir que la familia propuesta representa un esquema atractivo desde un punto de vista práctico para aplicaciones por ejemplo en manufactura.

7. REFERENCIAS

- Adamy J. 2005. Implicit Lyapunov functions and isochrones of linear systems. *IEEE Transactions on Automatic Control*. 50(6): 874 – 879.
- Alvarez J., Kelly R. & Cervanes I. 2003. Semiglobal stability of saturated linear PID control for robot manipulators. *Automatica*. 39(6): 989 – 995.
- Arai H. & Tachi S. 2002. position control of manipulator with passive joints using dynamic coupling. *IEEE Transactions on Robotic and Automation*. 7(4): 528 – 534.
- Arimoto S. and Miyazaki F. 1986. Stability and robustness of PD feedback control manipulator. *Robotics: Theory and Application DSC*, F. W. Paul and D. Youceg – Toumi Eds. 3: 67 – 72
- Armstrong B. & Hoelouvy 1995. *Control of Machines with Friction*. Kluwer Academic Publisher 1991.

- Berguins H., Roebbers H. & Nijmeijer H. 1995. Experimental comparison of parameter estimation methods in adaptative control, *Automatica*. 31(9): 1275 – 1285.
- Canudas C., Siciliano B. & Bastin G., *Theory of Robot Control*. Springer, 1996
- De Jager B. & Banens. 1994. Experimental evaluations of robotic controllers. Proceedings of the 33rd. Conference on Decision and Control Lake Buena Vista, FL. USA, pp. 363 – 368.
- Ho M. & Tu Y. 2006. Position control of a single link flexible manipulator using based PID control. *IEEE Transactions Control Theory and Applications*. 153(5): 615 – 622.
- Hsia T. C. 1994 Robustness analysis of a PD controller with approximate gravity compensation for robot manipulator control. *Journal of Robotic System*. 11(6): 517 – 521.
- Hu T., and Lin Z. 2003. Composite Quadratic Lyapunov functions for constrained control systems. *IEEE Transactions o Automatic Control*. 48(3): 440 – 450.
- Jaritz A. & Spong M. 1996. An experimental comparison of robust control algorithms on a direct drive manipulator. *IEEE Transactions on Control Systems Technology*. 4(6): 363 – 368.
- Jarzebowska E. 2006. Control oriented dynamic formulation for robotic systems with program constraints. *Robotica*, Cambridge University Press. 24: 61 – 73.
- Kelly R. & Carelli R. 1996. A class of nonlinear PD – Type controllers for robot manipulators. *Journal of Robotic Systems*. 13(12): 793 – 802.
- Kelly R. 1999. Regulation of manipulators in generic task space: An energy shaping plus damping injection approach. *IEEE Transactions on Robotics and Automation*. 15(2): 381 – 386.
- Kelly R. 1995. A tuning procedure for stable PID control of robot manipulators. *Robotica*, Cambridge University Press. 13: 141 – 148.
- Khalil H. K., *Nonlinear Systems*. Prentice Hall, 2002
- Koditscheck , D. 1984. Natural motion for robot arms. Proceeding of the 1984 IEEE Conference on Decision and Control. Las Vegas. pp. 733 – 735
- Koditschek D. 1998. Strict global Lyapunov function for mechanical systems. Pceedings of the IEEE American Control Conference. Atlanta GA. pp. 1770 – 1775.
- Loria A., Lefeber E. & Nijmeijer H. 2000. Global asymptotic stability of robot manipulators with linear PID and PI2D control. *Journal on Stability and Control: Theory and Applications SACTA*, 3(2): 138 – 148.
- Mazenc F. & Malisof M. 2006. Further constructions of Control – Lyapunov Functions and Stabilizing Feedback for systems Satisfying the Jurdjevic – Quin Conditions. *IEEE Transactions on Autoatic Control*. 51(2): 360 – 365.
- Mazenc F. & Nescic D. 2004. Strong Lyapunov functions for systems satisfying the conditions of La Salle. *IEEE Transactions on Automatic Control*. 49(6): 1026 – 1030.
- Nersesov S.G. & Haddad W.M. 2006. On the stability and control of nonlinear dynamic systems via Vector Lyapunov Functions. *IEEE Transactions on Automatic Control*. 51(2): 203 – 215.
- Ortega R. & Spong M. 1998. Adaptative Motion Control of Rigid Robots: A tutorial. *Automatica*. 25(6): 877 – 888.
- Paden B. & Panja R. 1998. Globally asymptoticably stable PD controller for robot manipulator. *International Journal of Control*. 47(6): 1697 – 1712
- Reyes F. & Kelly R. 1997. Experimental evaluation of identification scheme on a direct drive robot. *Robotica*, Cambridge university Press. 15: 563 – 571.
- Reyes F. and Rosado A. 2005. Polynomial family of PD – Type controllers for robot manipulators. *Control Engineering Practice*, El – servier Ed. 13, pp. 441 – 450
- Santibanez V., Kelly R. & Reyes F. 1998 A new set point controller with bounded torques for robot manipulators. *IEEE Transactions on Industrial Electronics*. 45(1): 126 – 133.
- Santibanez V., Kelly R. and Llana M. 2005 A novel global asymptotic stable set point fuzzy controller with bounded torques for robot manipulators. *IEEE Transactions on Fuzzy Systems*. 13(3): 362 – 372.
- Santibanez V., Kelly R 1997. Strict Lyapunov Functions for control of robot manipulators. *Automatica*. 33(4): 675 – 682.
- Sciavicco L. & Siciliano B., *Modeling and Control of Robot manipulators*, The McGraw Hill Companies, Inc. 1996
- Seraji H. 1998. A new class of nonlinear PID controllers with robotic applications, *Journal of Robotics Systems*. 15(3): 61 – 81.
- Spong M. W. & Vidyasagar M., *Robot Dynamics and Control*. John Wiley and Sons, 1989
- Su Y., Sun D., Ren L. and Mills J. K. 2006. Integration of Saturated PI Synchronous Control and PD Feedback for control of parallel manipulators. *IEEE Transactions on Robotics*. 22(1): 202 – 207.
- Sun M., Ge S. S., and Mareels I. M. Y. 2006. Adaptive Repetitive Learning Control of Robotics Manipulators Without The Requirement for Initial Repositioning. *IEEE Transactions on Robotics*. 22(3): 563 – 568.
- Takegaki M. & Arimoto S. 1981. A new feedback method for dynamic control of manipulators. *J. Dyn. Syst. Meas. Control Transactions*. ASME. 103: 119 – 125.
- Tomei P. 1991. Adaptative PD Controller for robot manipulators, *IEEE Transactions on Robotics and Automation*, RA -7, pp. 564 – 570.
- Wang W., Lu S, & Hsu C. 2002. Experiments on the position control of a one – link flexible robot arm. *IEEE Transactions on Robotics and Automation*. 5(3): 373 – 377.
- Wen J.T., Delgado K. and Bayard D. 1992. Lyapunov function based control laws for revolute robots arms: tracking control, robustness and adaptative control. *IEEE transactions on Automatic Control*, AC – 37, pp. 231 – 237.
- Whitcomb L.L., Rizzi A. A. & Koditscheck D.E. 1993. Comparative experiments with a new adaptative controller for robot arms, *IEEE Transactions on Robotics and Automation*, 9(1): 59 – 69.