

Revista

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

Diagramación : DG Carlos Merino Salom

Impresión : CM Ideas Diseño e Imagen Gráfica

PRESENTACIÓN

La generación de conocimiento y su aplicación en el desarrollo de la tecnología ha permitido que la humanidad tenga mejor calidad de vida. La casi extinción de enfermedades fulminantes como la malaria, el paludismo, el cólera, etc. Los viajes espaciales, las comunicaciones inalámbricas de gran velocidad, el descubrimiento del genoma humano, la nanodosificación de medicinas a órganos específicos del cuerpo humano, son ejemplos de la inmensa contribución de la ciencia y de la transferencia tecnológica. Sin embargo, aun existe una gran disparidad en el abordaje de temas sobre investigación científica e innovación tecnológica en la academia y en centros de investigación en el mundo. Por ejemplo la difusión de nuevas teorías, procedimientos, productos y otras creaciones es limitada por las restricciones que imponen las casas editoriales de revistas especializadas y también por los costos de participación en eventos de alto nivel científico.

En el Ecuador se dispone de pocos espacios de difusión de la ciencia por falta de políticas sobre investigación científica e innovación tecnológica a largo plazo y por el reducido número de eventos o medios de publicación científica existentes en las universidades, escuelas politécnicas y centros de investigación. Adicionalmente, los científicos ecuatorianos no siempre publican los resultados de sus investigaciones, perdiéndose de esta manera sus invaluable contribuciones a la generación de nuevo conocimiento. Situación que además provoca la repetición trabajos o la innecesaria ejecución de protocolos que ya fueron probados en otras investigaciones.

En este contexto, la Revista Ciencia y Tecnología ESPE será un medio de difusión escrita para promover la socialización de la investigación científica y de la innovación tecnológica realizada en la Escuela Politécnica del Ejército. La Revista abordará temáticas relacionadas con agricultura, biotecnología, riego naturales, energía y mecánica, electrónica, tecnologías de información y comunicación, tecnologías para remediación de aguas y suelos contaminados, etc.

Revista

CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Sumario

Volumen 1, número 1, 2008

Reducción de los problemas de torsión en estructuras mono simétricas con aisladores de base elastoméricos.

Roberto Aguiar, Jorge Cevallos

Intrusion Detection System location for real time network protection

Arturo De la Torre

Módulo electrónico de entradas/salidas análogas y discretas para la gestión remota de procesos sobre la red GPRS

Andrés Estrella, Rodrigo Silva, Hugo Ortiz.

Evaluación de plataformas de virtualización para experimentación de servicios multimedia en redes IP

Walter Fuertes, J. E. López de Vergara

Medios de inducción, control de oxidación y contaminación en el cultivo *in vitro* de *Polylepis microphylla*

Alfonso Jaramillo, Karina Proaño, Mónica Jadán, Claudia Segovia

Evaluación de Protocolos de Enrutamiento usados en las Redes Móviles AdHoc (MANET), utilizando el software Network Simulator NS2.

Román Lara, Gonzalo Olmedo

Genética poblacional de *Polylepis pauta* y *P. incana* en el Páramo de Papallacta

Valeria Ochoa, Patricia Jiménez, Karina Proaño, C. Segovia

Diseño e implementación de un equipo de alta frecuencia e iontoforesis

Beatriz Pazmiño, Ramiro Ríos, David Andrade.

Reconocimiento de voz utilizando modelos ocultos de Markov

Luis M. Rodríguez, Rubén León, Julio Larco.

Método de estimación para Arquitecturas de Software mediante modelos conceptuales y generación de prototipos

Geovanny Raura, Tatiana Gualotuña, T. Valenzuela, H. Muñoz

Quitosano impregnado con óxidos de Fe (III) usado como material sorbente para la remoción selectiva de arsénico desde aguas sintéticas y naturales.

Marcelo M. Zúñiga, Luis H. Cumbal

Revista semestral de la Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí.

Reducción de los problemas de torsión en estructuras mono simétricas con aisladores de base elastoméricos

Aguilar, R.

Centro de Investigaciones Científicas, Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador.

Cevallos, J.

Centro de Post Grado, Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador.

RESUMEN: Cuando las estructuras tienen irregularidad en planta, es decir son asimétricas, debido a espacio irregular para construir o diseños arquitectónicos especiales, se genera un efecto producto de la interacción sismo-estructura, llamado “torsión en planta”. La manifestación física de este efecto se lo cuantifica en este artículo mediante la diferencia de desplazamientos entre los pórticos extremos de los últimos pisos de las estructuras aquí analizadas. Se analizan estructuras con y sin aisladores de base elastoméricos sin núcleo de plomo con varios parámetros estructurales y para varios tipos de acelerogramas sísmicos. Se utilizan 28 acelerogramas artificiales que representan los cuatro tipos de suelo bajo la estructura, S1, S2, S3, S4, también tres sismos reales, ocurridos en Chile 1985, México 1985 y en la ciudad de El Centro en California, 1940

ABSTRACT: When structures have story irregularity, this means, they are asymmetric due to irregular space constructions or especial architect’s designs, it generates a seismic effect called “plant torsion”. The physical manifestation of this effect is quantified in this paper with the difference in displacements between extremes edges in the last floor of the structures under analysis. The analyzed structures are with and without elastomeric base isolated system without lead core, under varied structural parameters and various seismic registers. It is employed 28 artificial registers which represent the four types of soils under structure as well as three existent seismic registers that occurred in 1985 in Chile, 1985 in México and 1940 in El Centro city, California.

Palabras claves: Balance Torsional, Elastoméricos, Aisladores de base, Super estructura.

1 INTRODUCCIÓN

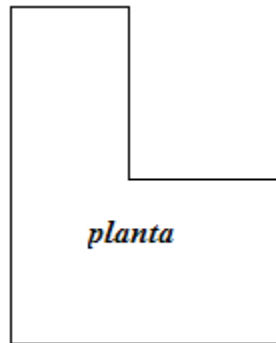
Luego de que ha transcurrido 10 años del sismo que afectó a Bahía de Caráquez, el 4 de agosto de 1998 y que tuvo una magnitud $M_s = 7.1$, vale la pena mostrar, como están actualmente, cuatro edificios de Bahía de Caráquez que tuvieron problemas de torsión y que fueron construidos en la forma clásica sin sistemas de control.

En la Figura 1 se muestran fotos del hotel “Italia” que sufrió daños que afectaron su integridad estructural, para su reparación se tuvieron que colocar varias columnas extras con macizado para reforzar el edificio, como se aprecia en la Figura 1A. En la Figura 1B se observa una viga fisurada aún sin reparar y en la Figura 1C se muestra la geometría en planta del hotel.



Aa

Ba



CB

Figura 1 Vista del Hotel Italia en el 2008.

En las Figura 2 se muestra fotos del Hospital “Miguel Alcívar”, se observan las irregularidades en planta y en elevación del mismo, en la parte inferior se tiene una vista de la irregularidad en planta. No se observa daño ya que al ser una estructura de mucha importancia, fue reparado en su totalidad.

En la parte inferior de la Figura 2 se aprecia la geometría en planta de la estructura original del hospital, se nota que está conformada por dos bloques en forma de “L” y un bloque estructural en forma de “T”. Es sabido que esta configuración estructural no es adecuada para zonas de alta peligrosidad sísmica ya que tienen problemas de torsión.

Durante el sismo de 1998, todas las columnas perimetrales tuvieron bastante daño y estuvo a punto de colapsar el hospital. Aguiar *et al.* (1998), Aguiar (1998). En los años 1999 y 2000 se reparó y reforzó la estructura del hospital. Para no tener los dos bloques en forma de “L” y el bloque en forma de “T”, las columnas de los bloques adyacentes se unieron mediante un encamisado de esta manera se tiene en planta un solo bloque rectangular, con lo que se mejora notablemente los problemas de torsión. Por otra parte, se colocaron nuevos elementos estructurales (muros de corte) con lo que se elevó la capacidad sísmica de la estructura.

En la Figura 3 se observa el edificio Mendoza, en el cuál ocurrió el colapso de los dos últimos pisos. La estructura en planta es en forma de “L”. Es un edificio esquinero y tiene volados de más de 2 metros en cada uno de los sentidos.

De tal manera que este edificio tuvo varios problemas que llevaron a que la estructura tenga un mal comportamiento durante el sismo de 1998. Esos problemas se resumen en: edificio abierto que de por sí repercute en los problemas de torsión, planta en forma de “L” con lo que se incrementa la torsión y volados muy grandes. Aguiar *et al* (1998).

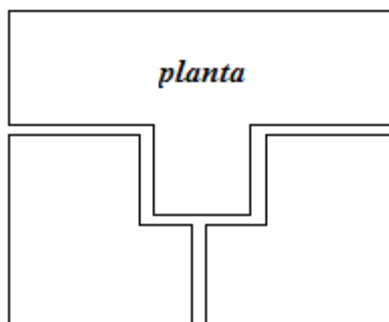


Figura 2 Hospital Miguel H. Alcívar en 2008, en la parte superior y configuración en planta en 1998.

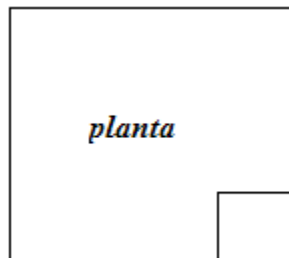
En la Figura 3 se aprecia el estado en el que se encuentra el edificio Mendoza, se aprecia parte de las columnas que no colapsaron; el edificio no ha sido reparado y parece ser que no está siendo utilizado.



Figura 3 Edificio Mendoza en 2009 con columnas que no colapsaron en la cubierta.



A



CB

Ba

Figura 4 Edificio Cabo Coral en el 2008.

En la Figura 4 se muestra lo que permanece de una de las estructuras más costosas que tiene Bahía de Caráquez, se trata del Edificio “Cabo Coral” que tenía departamentos con muy buenos acabados, con vista al mar. En Figura 4A se observa de manera global el gran daño que sufrió este edificio en elementos no estructurales como paredes, enlucidos, etc., en la Figura 4B se observa un gran muro de corte fisurado debido a la acción sísmica, y en la Figura 4C se observa una vista en planta del edificio. Diez años después del sismo el Edificio Cabo Coral, no ha sido reparado como se observa en la Figura 4.

Los cuatro edificios presentados tuvieron problemas de torsión, durante el sismo de 1998. Esos problemas de torsión pudieron minimizarse si se diseñaban con disipadores de energía. Aguiar y Zevallos (2008) o si se diseñaban con aisladores de base. Pan y Kelly (1983); Zayas *et al* (1987); Tena y Gómez (2002); Tena y Escamilla (2006).

Efectivamente, los problemas de torsión se disminuyen notablemente si se introducen en la estructura sistemas de control, como los indicados en el párrafo anterior.

2 ESTRUCTURAS CON BASE EMPOTRADA

En la Figura 5 se presenta una estructura de un piso sin dispositivos de control. Los resortes representan la rigidez lateral de cada uno de los pórticos de la estructura. Se indica la ubicación del Centro de Masa (C.M.), y del Centro de Rigidez (C.R.), existe una sola excentricidad estática, denominada e_x ya que se trata de una estructura mono simétrica. Los pórticos que se hallan a la derecha del C.R., en sentido Y, son *pórticos fuertes* ya que tienen una gran rigidez en comparación con los pórticos que se hallan en el otro sentido a los que se denomina *pórticos débiles*. La diferencia de rigidez que existe entre estos dos tipos de pórticos, es lo que origina que los pórticos fuertes tengan desplazamientos pequeños y los débiles grandes generando los

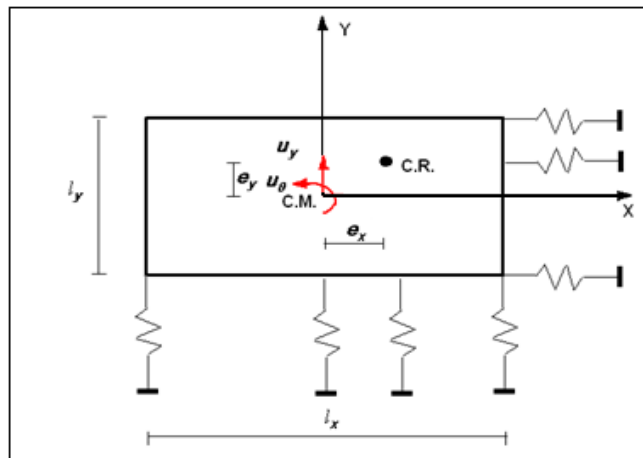


Figura 5 Estructura mono simétrica con base empotrada

En el modelo numérico de cálculo se han considerado dos grados de libertad, que son u_y que es la componente de desplazamiento horizontal según el eje Y., y u_θ la torsión. En el capítulo 7 del libro *Análisis Sísmico de Edificios*, Aguiar (2008), se presenta en forma detallada la deducción del siguiente sistema de ecuaciones diferenciales que gobierna el comportamiento dinámico de la estructura de la Figura 5.

$$\begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & \frac{1+\alpha^2}{12} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \ddot{u}_y \\ \ddot{u}_r \end{bmatrix} + \frac{\hat{C}}{m} \begin{bmatrix} \dot{u}_y \\ \dot{u}_r \end{bmatrix} + w_y^2 \begin{bmatrix} 1 & \hat{e}_x \\ \hat{e}_x & \hat{e}_x^2 + \left(\frac{\rho_s}{l_x}\right)^2 w_\theta^2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} u_y \\ u_r \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -\ddot{u}_g \\ 0 \end{bmatrix} \quad (1)$$

Donde: $\alpha = l_y / l_x$ es la relación de luces de la planta; $u_r = l_x u_\theta$ se ha cambiado la variable u_θ por u_r para ello se multiplica por la longitud l_x ; \hat{C} es la matriz de amortiguamiento en el nuevo sistema de coordenadas; m es la masa total de la planta; $w_y^2 = K_{YY} / m$ es la frecuencia natural de la estructura simétrica, K_{YY} es la suma de la rigidez lateral de los pórticos en sentido Y; $\hat{e}_x = e_x / l_x$ es la excentricidad estática normalizada con respecto a la distancia l_x ; $\rho_s = \sqrt{K_{\theta\theta}^{CR} / K_{YY}}$ siendo $K_{\theta\theta}^{CR}$ la rigidez a torsión con respecto al CR; $w_\theta^2 = K_{\theta\theta}^{CR} / m \rho^2$; $\rho = \sqrt{(l_x^2 + l_y^2) / 12}$; \ddot{u}_g es la aceleración del suelo.

La ecuación (1) puede escribirse en función de Ω_θ que relaciona las frecuencias, $\Omega_\theta = w_\theta / w_y$ de la siguiente manera:

$$\begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & (1+\alpha^2) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \ddot{u}_y \\ \ddot{u}_r \end{bmatrix} + \hat{C} \begin{bmatrix} \dot{u}_y \\ \dot{u}_r \end{bmatrix} + w_y^2 \begin{bmatrix} 1 & \hat{e}_x \\ \hat{e}_x & \frac{\Omega_\theta^2 (1+\alpha^2)}{12} + \hat{e}_x \end{bmatrix} \begin{bmatrix} u_y \\ u_r \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -\ddot{u}_g \\ 0 \end{bmatrix} \quad (2)$$

3 ESTRUCTURAS CON AISLADORES DE BASE

En la Figura 6 se indica una estructura de un piso sobre aisladores de base elastoméricos. El sistema de ecuaciones diferenciales que gobierna el problema, es el siguiente pero antes se debe manifestar que la estructura puede ser de varios pisos.

$$\mathbf{M}^{(t)} \ddot{\mathbf{q}} + \mathbf{C}^{(b)} \dot{\mathbf{q}} + \mathbf{K}^{(b)} \mathbf{q} = -\mathbf{M}^{(t)} \mathbf{r}^{(b)} \ddot{u}_g - \mathbf{r}^{(s)t} \mathbf{M}^{(s)} \ddot{u} \quad (3)$$

$$\mathbf{M}^{(s)} \ddot{\mathbf{u}} + \mathbf{C}^{(s)} \dot{\mathbf{u}} + \mathbf{K}^{(s)} \mathbf{u} = -\mathbf{M}^{(s)} \mathbf{r}^{(s)} \left[\ddot{\mathbf{q}} + \mathbf{r}^{(b)} \ddot{u}_g \right] \quad (4)$$

Donde $\mathbf{M}^{(t)}$ es la matriz de masa total de la estructura completa como cuerpo rígido; $\mathbf{C}^{(b)}$ es la matriz de amortiguamiento del sistema de aislamiento; $\mathbf{K}^{(b)}$ es la matriz de rigidez del sistema de aislamiento; $\mathbf{r}^{(b)}$ es un vector de colocación de $\ddot{\mathbf{u}}_g$ en los grados de libertad de la base; $\mathbf{M}^{(s)}$, $\mathbf{C}^{(s)}$ y $\mathbf{K}^{(s)}$, son las matrices de masa, amortiguamiento y rigidez de la superestructura; $\mathbf{r}^{(s)}$ es la matriz de colocación de $\ddot{\mathbf{u}}_g$ en los grados de libertad de la estructura; $\ddot{\mathbf{u}}$ es la aceleración en la superestructura. \mathbf{u} es un vector que contiene los grados de libertad de la super estructura y q del sistema de aislamiento de base.

Los métodos de solución del sistema de ecuaciones diferenciales definidos por las ecuaciones (3) y (4) están descritos en Aguiar (2007), De la Llera *et al* (2005), Seguí (2007), Almazán *et al* (2007).

Lo importante es notar que la ecuación (3) está relacionada con el sistema de aislamiento aunque en su formulación aparece a la derecha el vector $\ddot{\mathbf{u}}$ pero se puede ignorar este vector, claro está que esto es aproximación. Por otra parte, la ecuación (4) está más relacionada con los grados de libertad de la superestructura, aunque en esta ocasión aparece el término \ddot{q} .

4 ESTRUCTURA MONO SIMÉTRICA CON AISLADORES

Al no considerar la aceleración de la superestructura $\ddot{\mathbf{u}}$ y para el caso de estructuras de un piso, mono simétrica, ver Figura 7. El sistema de ecuaciones diferenciales que se obtiene a partir de la ecuación es el siguiente:

$$\begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & (1 + \alpha^2) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \ddot{q}_y \\ \ddot{q}_r \end{bmatrix} + \hat{\mathbf{C}}^{(b)} \begin{bmatrix} \dot{q}_y \\ \dot{q}_r \end{bmatrix} + w_y^{(b)2} \begin{bmatrix} 1 \\ \hat{\mathbf{e}}_{sx}^{(b)} \end{bmatrix} \frac{\Omega_\theta^{(b)2} (1 + \alpha^2)}{12} + \hat{\mathbf{e}}_{sx}^{(b)2} \begin{bmatrix} q_y \\ q_r \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -\ddot{u}_g \\ 0 \end{bmatrix} \quad (5)$$

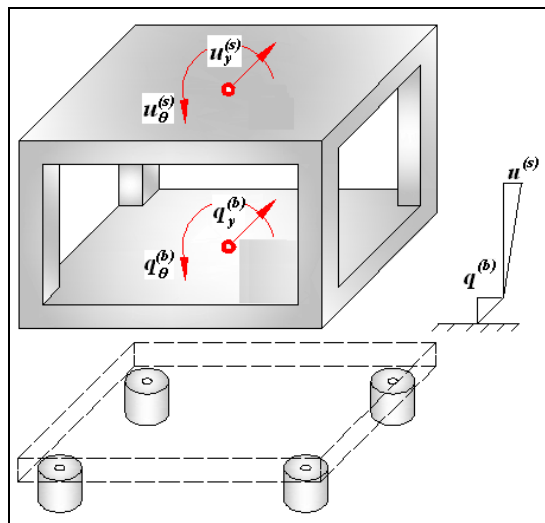


Figura 6 Grados de libertad de una estructura con aislamiento de base.

El significado de las variables es similar al de las ecuaciones (1) y (2) pero esta vez referido al sistema de aislamiento, así: α es la relación de luces, ya definido: $\hat{C}^{(b)}$ es la matriz de amortiguamiento que en el trabajo se halla empleando el algoritmo de Wilson y Penzien (1982); $w_y^{(b)}$ es la frecuencia desacoplada del sistema de aislamiento; $\hat{e}_{sx}^{(b)}$ es la excentricidad normalizada del sistema de aislamiento; $\Omega_\theta^{(b)}$ es la relación de frecuencias $w_\theta^{(b)} / w_y^{(b)}$; q_y es el desplazamiento horizontal del sistema de aislamiento en sentido Y; $q_r = l_x q_\theta$, siendo q_θ el giro de torsión del sistema de aislamiento de base; en la figura 7, se presentan los grados de libertad considerados.

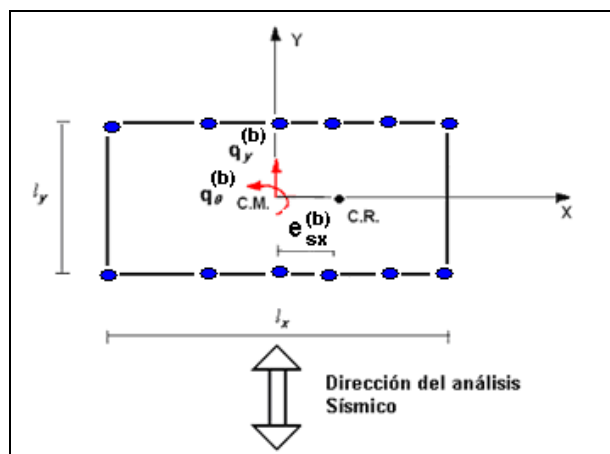


Figura 7 Grados de libertad para sistema mono simétrico, del sistema de aislamiento.

5 SISMOS DE ANÁLISIS

Para el estudio, se utilizarán dos tipos de registros, el primer tipo son acelerogramas sísmicos sintéticos para los cuatro perfiles de suelo del Código Ecuatoriano de la Construcción CEC-2000: S1, S2, S3, S4, se obtuvieron 7 sismos artificiales para cada perfil de suelo, dando un total de 28 sismos artificiales y son compatibles con el espectro del CEC-2000 para una aceleración máxima del suelo en roca de 0.4 g. Cevallos (2008).

El segundo tipo de acelerogramas corresponden a sismos reales, el primero se registró el 18 de mayo de 1940 en California, se trabaja con un acelerograma de El Centro que tuvo una aceleración máxima de 0.348 g.; este es un sismo de alta frecuencia. El segundo corresponde al sismo de Chile del 3 de marzo de 1985, se trabaja con un registro de Viña del Mar que tuvo una aceleración máxima de 0.363 g. también es de alta frecuencia. El tercero se registró el 19 de septiembre de 1985 en la ciudad de México, se trabaja con el registro de la Secretaría de Comunicaciones y Transporte que tuvo una aceleración máxima de 0.184 g, este es de baja frecuencia. Para el estudio se los denominará CEN, CHI, MEX, respectivamente.

En la Figura 8 se presentan los espectros de los 28 sismos artificiales, y con línea más gruesa se indica la curva del espectro promedio, para cada tipo de suelo. Nótese el parecido del espectro promedio con el espectro del CEC-2000; esto se debe a que los sismos artificiales que se obtuvieron fueron compatibles con los espectros del CEC-2000.

En la Figura 9 se muestran los acelerogramas de los sismos reales considerados en el estudio, el sismo de CEN tiene su fase intensa al inicio del registro, los sismos de CHI y MEX tienen su fase intensa muy cerca en la mitad del registro. Los datos para los acelerogramas de CEN y MEX vienen

dados en un incremento de tiempo de 0.02 segundos, mientras que los datos del sismo CHI vienen cada 0.005 segundos.

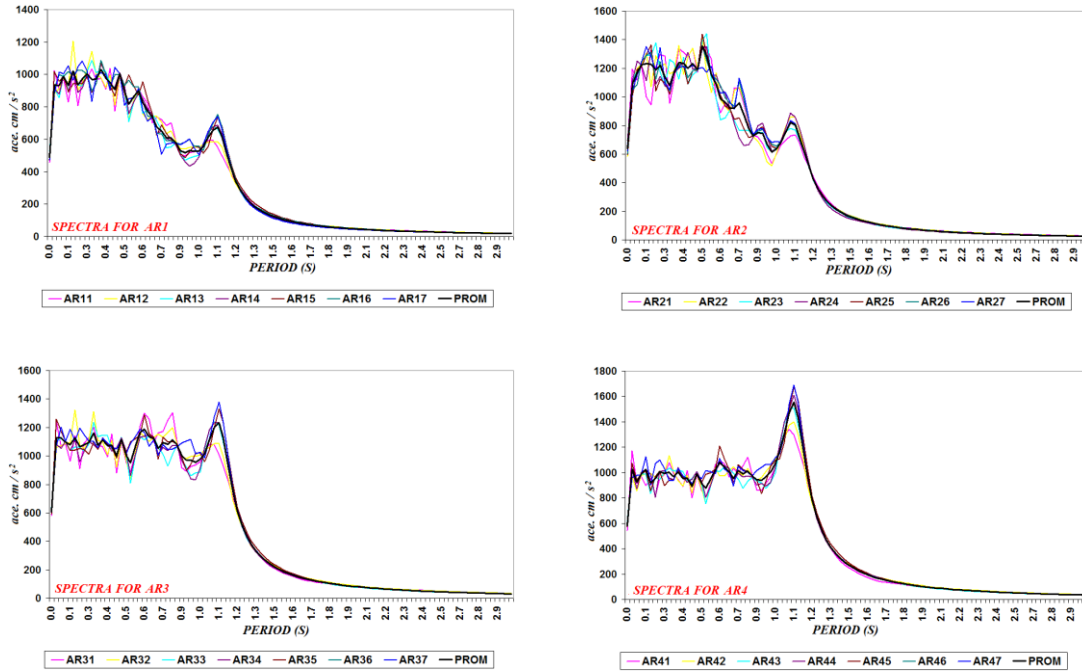


Figura 8 Espectros de respuesta de sismos artificiales.

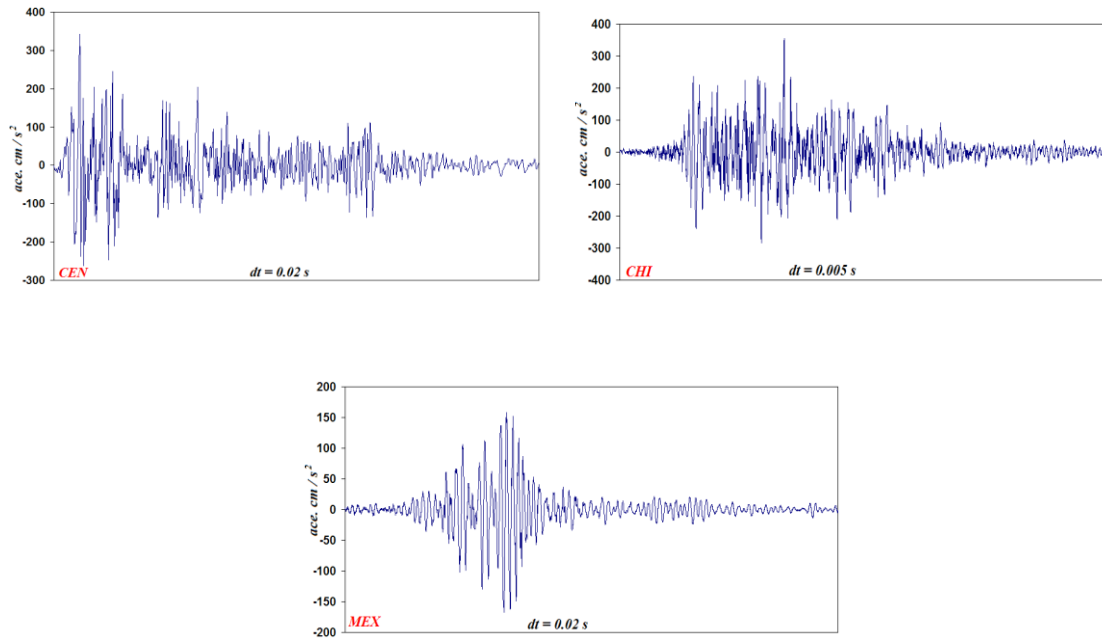


Figura 9 Acelerogramas de sismos reales.

En la Figura 10 se presentan los espectros de respuesta elástico de los sismos reales: Nótese que las aceleraciones espectrales máximas de los sismos CEN y CHI, se producen para períodos cortos; en ambos la máxima aceleración es aproximadamente 900 gals. En el espectro de MEX, las aceleraciones máximas se producen para períodos altos y tiene una aceleración espectral máxima que está alrededor de los 1000 gals. Esto se debe a que el acelerograma fue registrado en suelo blando.

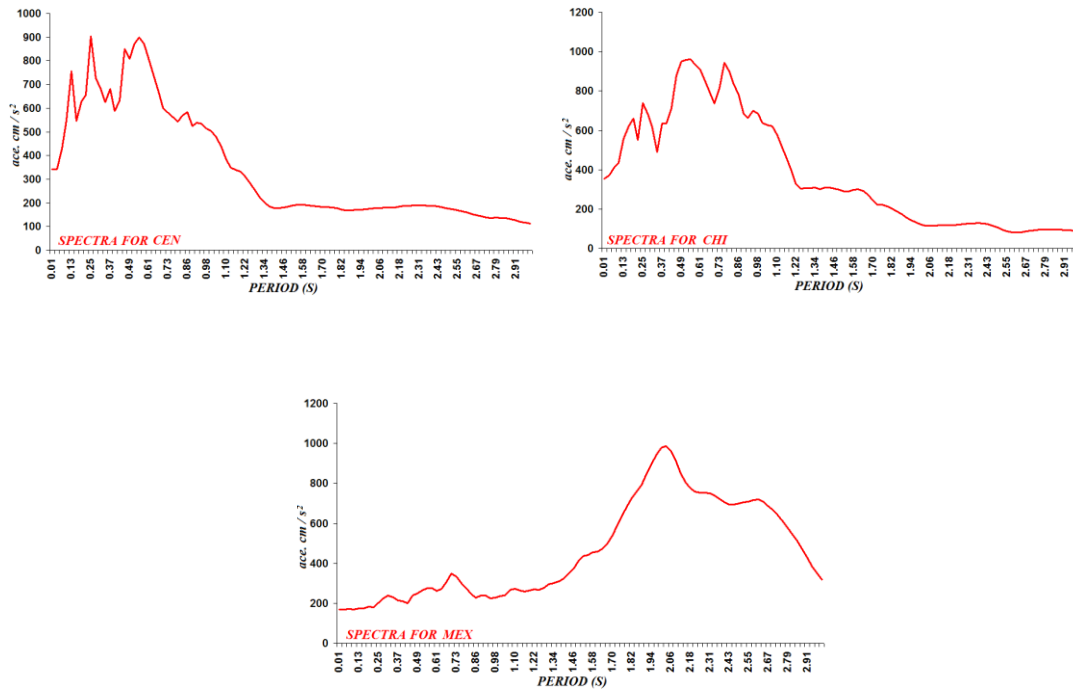


Figura 10. Espectros de respuesta de sismos reales utilizados en el estudio.

6 ESTRUCTURAS DE ANÁLISIS CON BASE EMPOTRADA

En una estructura con $\alpha = 0.5$, $T_y^{(s)} = 0.22 \text{ s.}$, $\Omega_\theta^{(s)} = 1.40$ y $\xi = 0.05$ se analiza la variación de la respuesta sísmica para el caso en que la excentricidad estática normalizada, varía desde -0.5 a 0.5. De igual manera se halla la respuesta para el caso en que la estructura es cuadrada en planta es decir $\alpha = 1$. En este apartado se presentan los resultados con el propósito de observar la gravedad del problema sísmico especialmente si se tienen grandes excentricidades en planta y la estructura no tiene aisladores de base.

Interesa ver la respuesta de los pórticos externos en sentido Y, que corresponde al pórtilo fuerte, que se halla muy cercano al C.R. y del pórtilo débil. Se encontró la respuesta en el tiempo ante todos los sismos indicados en el apartado anterior pero únicamente se presentan alguno de los resultados hallados con un sismo artificial denominado AR1, para suelo S1, en la Figura 11

Las respuestas en el tiempo han sido normalizadas con respecto al desplazamiento lateral máximo de la estructura completamente simétrica, sin excentricidad estática. En una estructura con $\hat{e}_{sx}^{(s)} = 0$

el desplazamiento en el CM., es igual a los desplazamientos de los pórticos extremos pero en una estructura con $\hat{e}_{sx}^{(s)} \neq 0$ estos desplazamientos son diferentes.

En el gráfico superior de cada subfigura de 11, se presenta con línea llena el desplazamiento normalizado del pórtico fuerte y la línea segmentada representa el desplazamiento normalizado del pórtico débil. Como se indicó en el párrafo anterior, el desplazamiento normalizado es la respuesta en el tiempo del desplazamiento del pórtico en estructura asimétrica dividido para la máxima respuesta en el tiempo del mismo pórtico pero en estructura simétrica. Para lograr esto primero se analiza para $\hat{e}_{sx}^{(s)} = 0$, encuentra la máxima respuesta y luego vuelve a analizar con un valor de $\hat{e}_{sx}^{(s)}$ que varía desde 0.00 hasta 0.50.

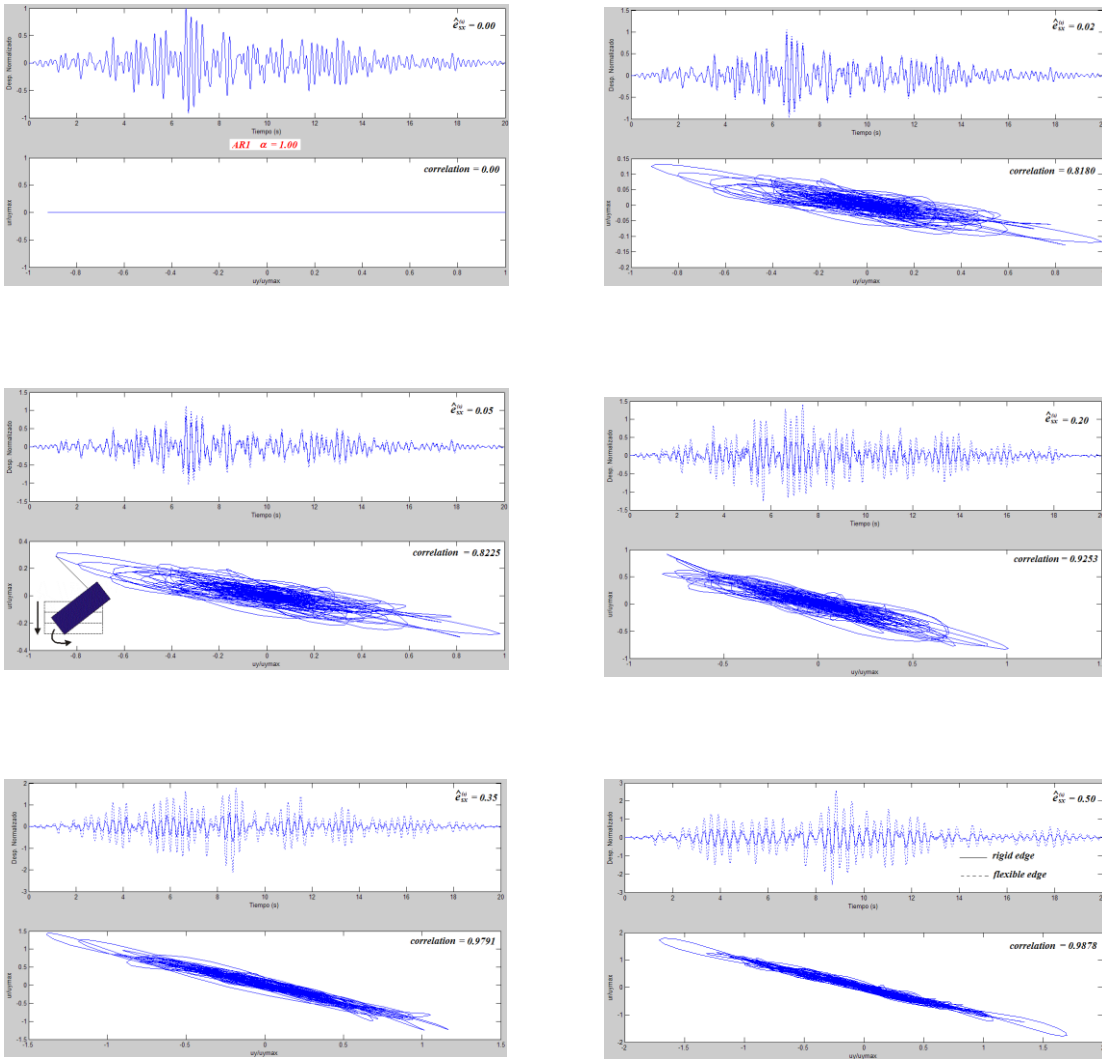


Figura 11 Balance torsional para sismo artificial en estructura con planta cuadrada $\alpha = 1$.

Los desplazamientos normalizados en la forma indicada corresponden al *factor de amplificación* que tendría el pórtico fuerte o el pórtico débil, según sea el caso.

El gráfico inferior de cada subfigura muestra el coeficiente correlación entre el desplazamiento normalizado en el centro de masas (eje horizontal) y la rotación normalizada en el centro de masas (eje vertical). La rotación normalizada es igual a la respuesta torsional en el tiempo calculada en estructura asimétrica dividida para la máxima respuesta torsional calculada en estructura simétrica.

En estructuras simétricas esta correlación vale cero, esto significa que los movimientos están desacoplados. Precisamente, la primera gráfica ubicada en la parte superior izquierda corresponde a una estructura simétrica $\hat{e}_{sx}^{(s)} = 0$, se puede observar en el gráfico del coeficiente de correlación que es una línea recta.

Cuando la estructura empieza a tener excentricidades estáticas normalizada así sea un valor muy pequeño, hay acoplamiento entre los desplazamientos y la torsión, manifestado en el coeficiente de correlación y en el gráfico ya no es una línea recta. Al tomar un punto del gráfico si este está del lado derecho significa que se desplaza en sentido *Y* hacia arriba, si está del lado izquierdo se desplaza en sentido *Y*, hacia abajo. Si el punto está en el lado derecho significa que rota en sentido antihorario, si está del lado izquierdo significa que rota horario. En la Figura 11 se aprecia que cuando la $\hat{e}_{sx}^{(s)}$ aumenta con signo positivo, el desplazamiento normalizado del pórtico débil aumenta y el del pórtico fuerte disminuye ya que hay más rigidez del lado derecho; cuando $\hat{e}_{sx}^{(s)}$ aumenta con signo negativo ocurre lo contrario, es decir más desplazamiento normalizado tiene el pórtico fuerte y menos el débil.

7 CURVAS DE CORRELACIÓN EN ESTRUCTURA SIN AISLADORES

En la Figura 12 se presentan las curvas de correlación para los sismos artificiales AR1, AR2, AR3, AR4 que corresponden a suelos S1, S2, S3, S4, para el caso de $\alpha = 1$. Para los sismos reales de México, Chile y Centro, se presenta la variación del coeficiente de correlación para $\alpha = 1$ en la Figura 13. Similares resultados se hallaron para el caso de $\alpha = 0.5$

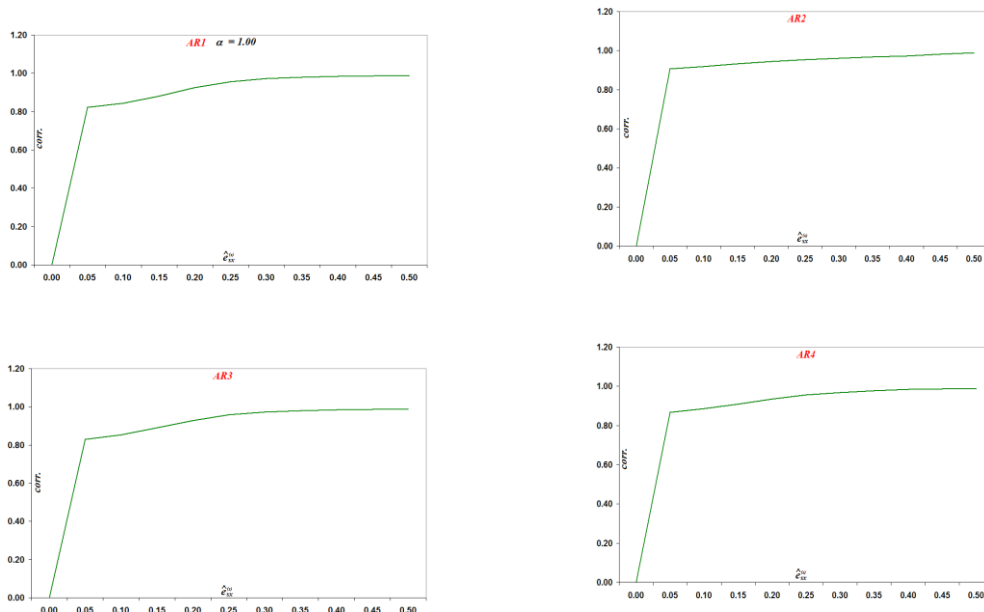


Figura 12. Coeficientes de correlación para sismos artificiales con $\alpha = 1$

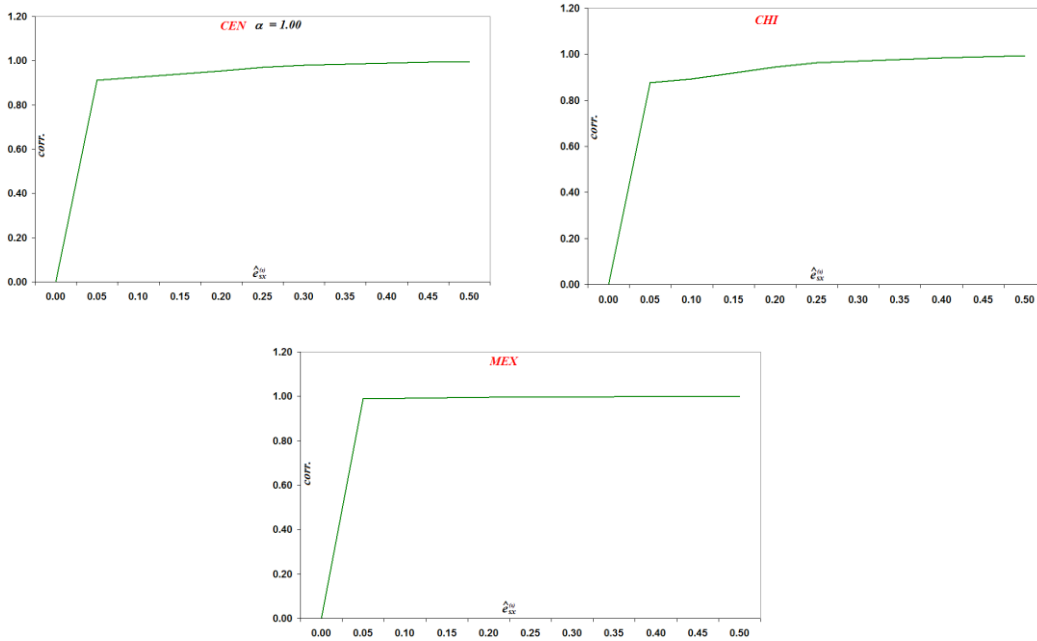


Figura 13. Coeficientes de correlación para sismos reales en planta cuadrada, $\alpha = 1$

En base a los resultados presentados en las Figuras 12 y 13 se puede concluir que con una mínima excentricidad estática normalizada ya existe acoplamiento entre el desplazamiento y la torsión en planta. El valor de correlación para base empotrada nunca es menor que 0.80 en estructuras con excentricidad estática normalizada igual o mayor a 0.05.

8 RESPUESTA EN EL TIEMPO

Para encontrar la respuesta en el tiempo se aplicó el método cusiestático, De la Llera *et al* (2005), Segúin (2007). Para el efecto se debe resolver en primer lugar el sistema de ecuaciones diferenciales para el sistema de aislamiento con la ecuación (3) sin considerar la aceleración en la super estructura, así se encuentra la respuesta en el tiempo q del sistema de aislamiento.

Luego en una segunda etapa, se encuentra el vector de aceleración total resultante que recibirá la estructura por medio de la siguiente expresión:

$$\tilde{a}(q, \dot{q}) = M^{(t)-1} (C^{(b)} \dot{q} + K^{(b)} q) \quad (6)$$

Con la aceleración resultante se encuentran las fuerzas en el CM., de cada piso de la estructura con la ecuación:

$$F^{(s)} = M^{(s)} r^{(s)} \tilde{a}(q, \dot{q}) \quad (7)$$

Posteriormente, se encuentran los desplazamientos en el CM., resolviendo el siguiente sistema de ecuaciones lineales.

$$\mathbf{K}^{(s)} \mathbf{u} = \mathbf{F}^{(s)} \tag{8}$$

Finalmente, para hallar la respuesta en cada pórtico se utiliza la matriz de compatibilidad de deformaciones $\mathbf{A}^{(j)}$ que relaciona las coordenadas laterales $\mathbf{p}^{(j)}$ y las coordenadas de piso \mathbf{u} . La letra j representa cualquier pórtico j. Aguiar (2007).

$$\mathbf{p}^{(j)} = \mathbf{A}^{(j)} \mathbf{u} \tag{9}$$

9 BALANCE TORSIONAL

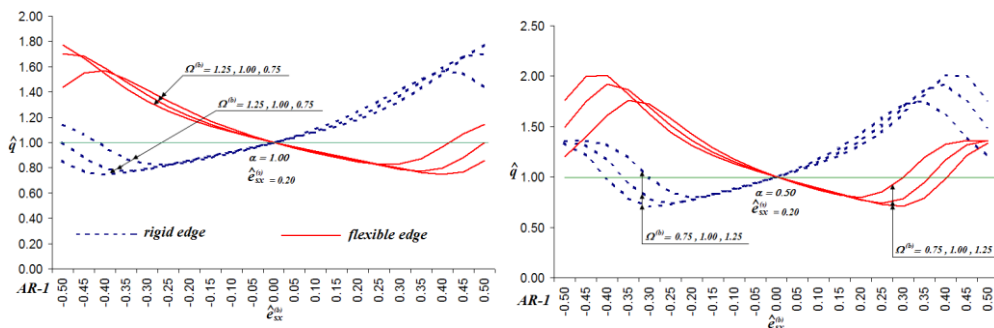
El objeto de este estudio es el análisis e interpretación de la interacción dinámica entre el sistema de aislamiento y la superestructura. Con el análisis de esta interacción se puede entender mejor el efecto de torsión y de esa manera tratar de minimizarlo, con la selección y colocación estratégica de los aisladores de base.

Para mostrar la reducción de los problemas de torsión se consideran dos estructuras, la una tiene una planta cuadrada $\alpha = 1$ y la otra una planta rectangular $\alpha = 0.5$. Para los dos casos se tiene: $\hat{e}_{sx}^{(s)} = 0.20$, $T_y^{(s)} = 0.22$ seg., $\Omega_\theta^{(s)} = 1.40$ y $\xi = 0.05$.

Para el sistema de aislamiento se considera que el período objetivo es de 2 s., $T_y^{(b)} = 2$, el factor de amortiguamiento $\xi^{(b)} = 0.15$. Se consideran tres tipos de aisladores que tienen las siguientes propiedades $\Omega_\theta^{(b)} = 0.75, 1.0, 1.25$. Para encontrar la posición óptima se colocarán los aisladores desde $\hat{e}_{sx}^{(b)} = -0.50$ hasta 0.50 con un incremento de 0.05 .

Las dos estructuras en consideración estará sometida a sismos en el sentido Y, ya que solo tienen excentricidad $\hat{e}_{sx}^{(b)}$.

Cada estructura se analizó para los 28 sismos artificiales correspondientes a los 4 tipos de suelos del CEC-2000, con los resultados obtenidos se hizo un promedio y son estos últimos valores los que se presentan en la Figura 14. De igual manera se analiza para los sismos de Centro, Chile y México, ya descritos.



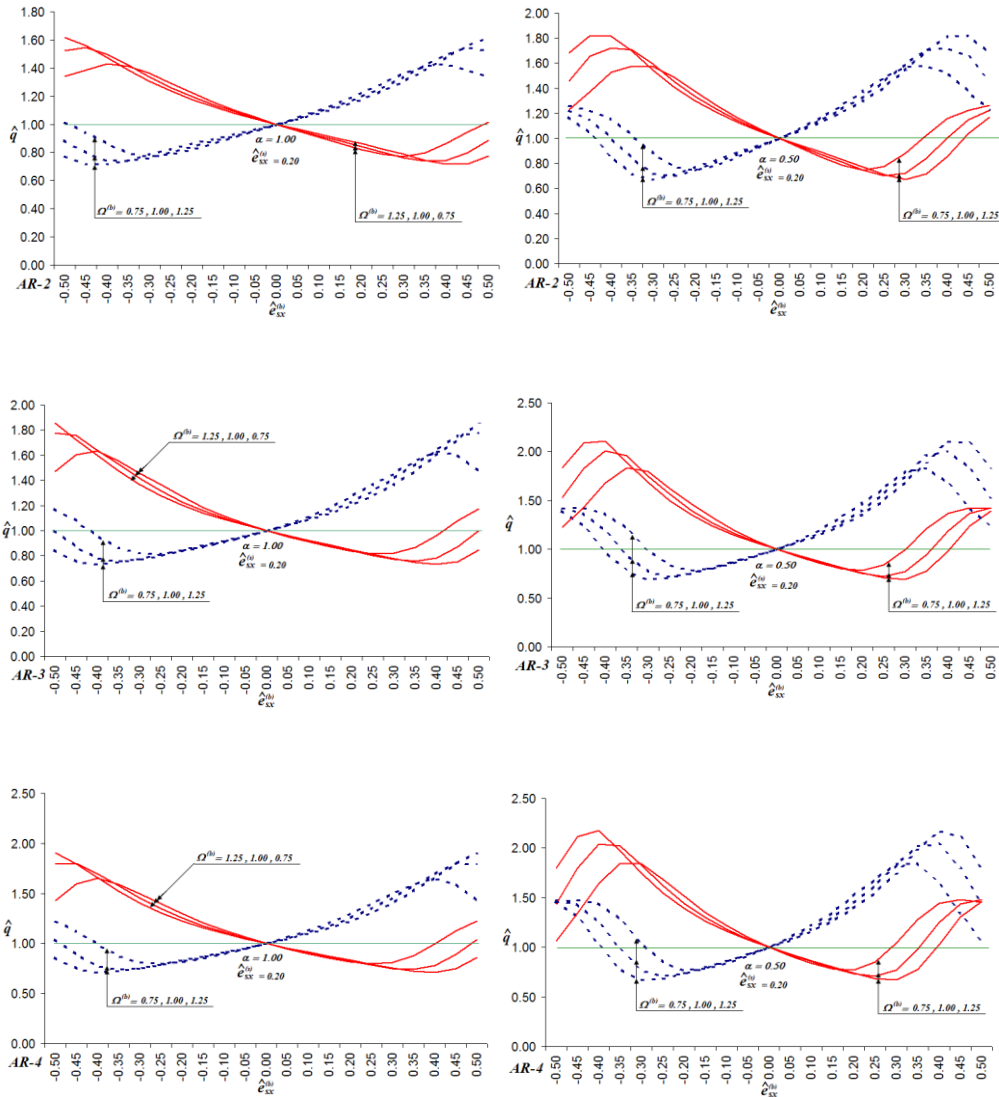


Figura 14 Curvas de Balance torsional para sismos artificiales

En la Figura 14 se tienen las curvas de balance torsional para el sistema de aislamiento, para el promedio de cada tipo de suelo de los 28 sismos artificiales y el comportamiento es similar entre ellos. En el eje horizontal se tiene la excentricidad estática normalizada que varía desde -0.50 hasta 0.50. Es decir se fue desplazando el centro de rigidez del sistema de aislamiento desde el extremo izquierdo hasta el extremo derecho, para cada uno de estos casos se halló la respuesta en el tiempo.

En el eje vertical se tienen los factores de amplificación para el desplazamiento lateral \hat{q} para los tres casos de aisladores. Las figuras de la columna izquierda corresponden a la planta cuadrada y las de la columna derecha a la planta rectangular.

Del análisis de la Figura 14 se concluye que el mejor comportamiento para el sistema de aislamiento se obtiene cuando la excentricidad estática normalizada en la base es cero.

En los acelerogramas artificiales al tratar de beneficiar a un pódico en la base variando la excentricidad estática normalizada en la misma, se estaría logrando todo lo contrario, es decir este tendrá amplificación. Por esta razón se recalca que lo mejor es tener excentricidad en la base del sistema de aislación cero.

Para explicar mejor los resultados, en la Figura 15 se presentan la respuesta en el tiempo para una planta cuadrada con tres casos de ubicación de los aisladores, la primera si los aisladores se colocan con $\hat{e}_{sx}^{(b)} = -0.20$, grafica superior izquierda; la segunda si $\hat{e}_{sx}^{(b)} = 0$, grafica superior derecha y tercera si $\hat{e}_{sx}^{(b)} = 0.20$, grafica inferior. Para estos tres casos se ha trabajado con un aislador que tiene $\Omega_{\theta}^{(b)} = 1$.

Para cada uno de los casos de los tres casos de la figura 15 se presenta en la parte superior la respuesta normalizada del sistema de aislamiento y en la parte inferior de la superestructura. En cada gráfica se presenta la respuesta en el tiempo de los pórticos exteriores y del CM.

Para el caso de $\hat{e}_{sx}^{(b)} = 0$, los pórticos extremos y el CM., del sistema de aislación se mueven lo mismo de ahí que en la gráfica superior derecha se tiene una sola figura. En la parte inferior se aprecia que en la super estructura, los desplazamientos de los pórticos externos y del CM., se aproximan bastante bien con lo que se minimiza la torsión.

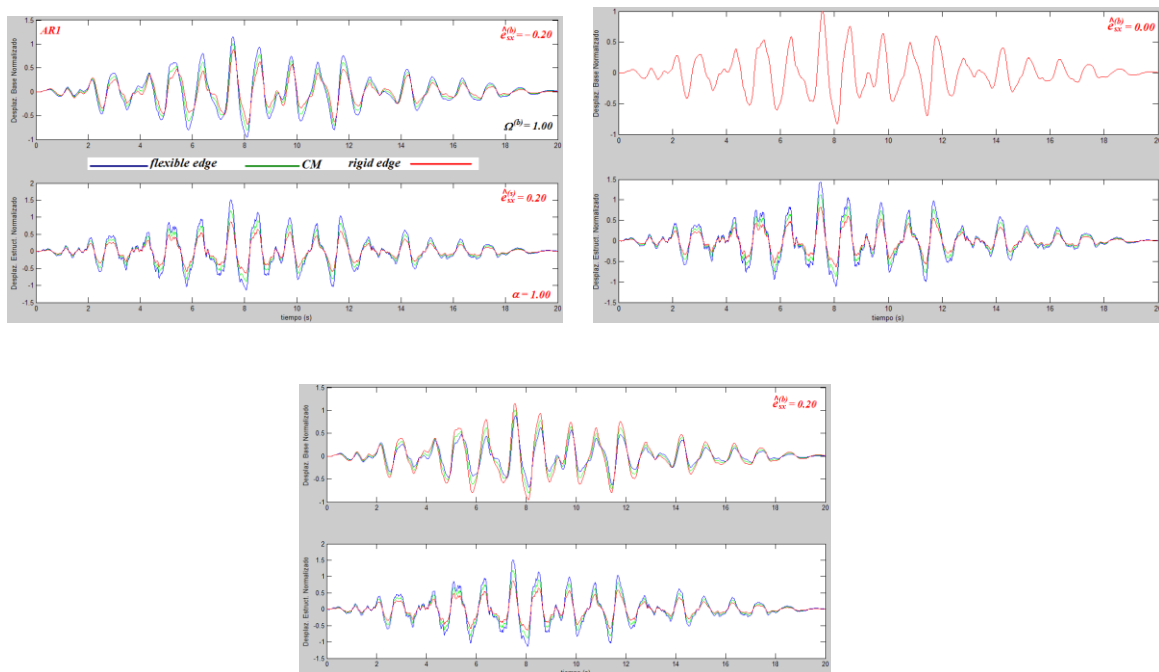


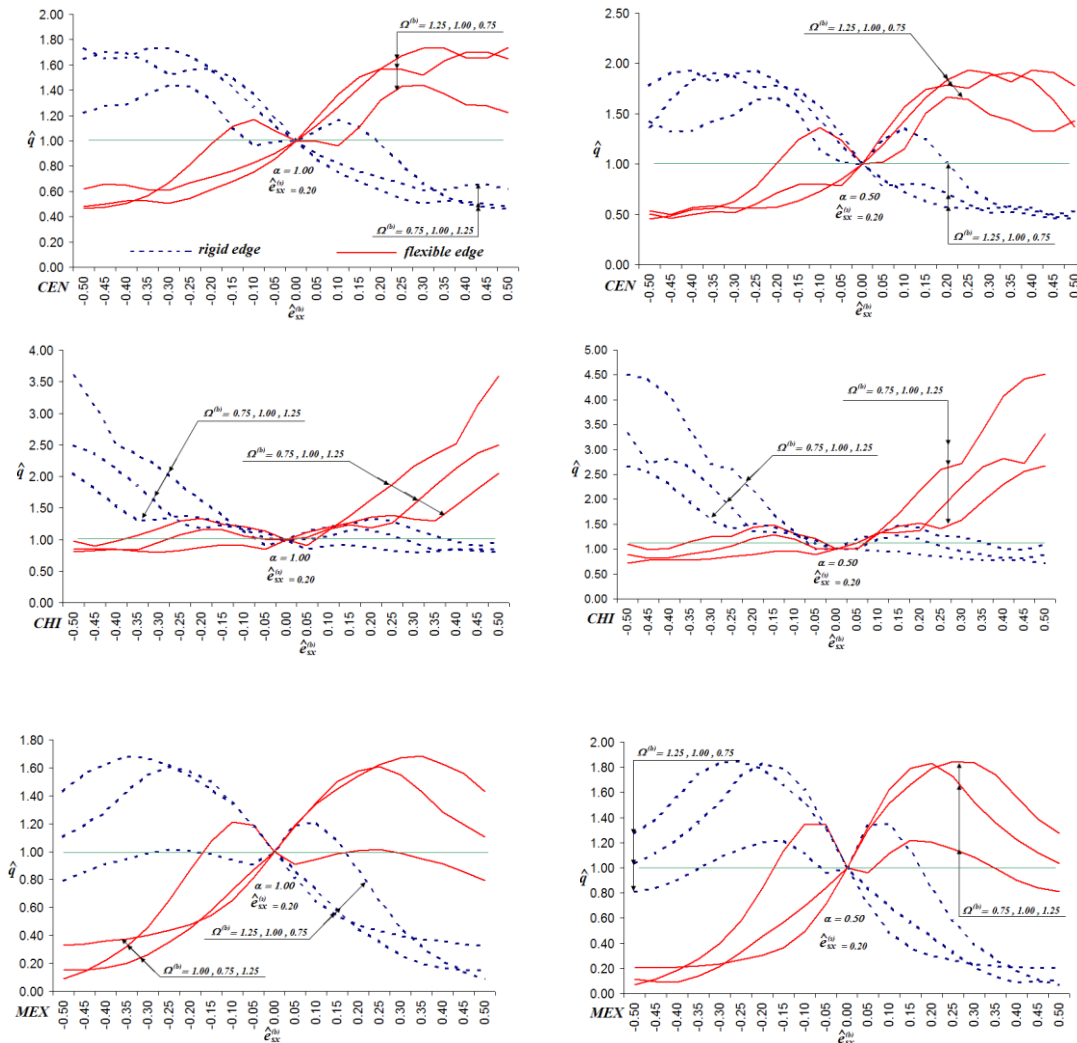
Figura 15 Desplazamientos relativos entre sistema de aislamiento y estructura para AR1.

En la Figura 16 se observa el balance torsional para los sismos reales utilizados en este estudio, Centro, Chile y México respectivamente para α igual a 1.00 y 0.50.

El comportamiento de balance torsional en el sistema de aislamiento para Centro y México es contrario a los sismos artificiales, es decir tiene un comportamiento que parece muy lógico, ya que al darle mayor rigidez a un borde en la base, este se amplifica menos y el extremo se amplifica mas, llegando a un factor de amplificación máximo de 2.00 según el valor de $\hat{e}_{sx}^{(b)}$.

El sismo de Chile tiene un comportamiento muy particular, al cambiar la excentricidad estática normalizada en la base tratando de beneficiar a un pórtico en la misma, se logrará lo mismo en ese pórtico pero se corre el riesgo de amplificar hasta 4.50 veces el pórtico extremo. En este caso con mucha mayor razón se deben colocar los disipadores con una $\hat{e}_{sx}^{(b)}$ igual a cero.

La figura 17 es similar a la Figura 15 pero en este caso la acción sísmica es la correspondiente al sismo del Centro de 1940. El comportamiento es similar de tal manera que en este estudio se ha encontrado que la posición óptima de colocar los aisladores de base es cuando $\hat{e}_{sx}^{(b)} = 0$.



Figuras 16 Curvas de Balance torsional para sismos reales.

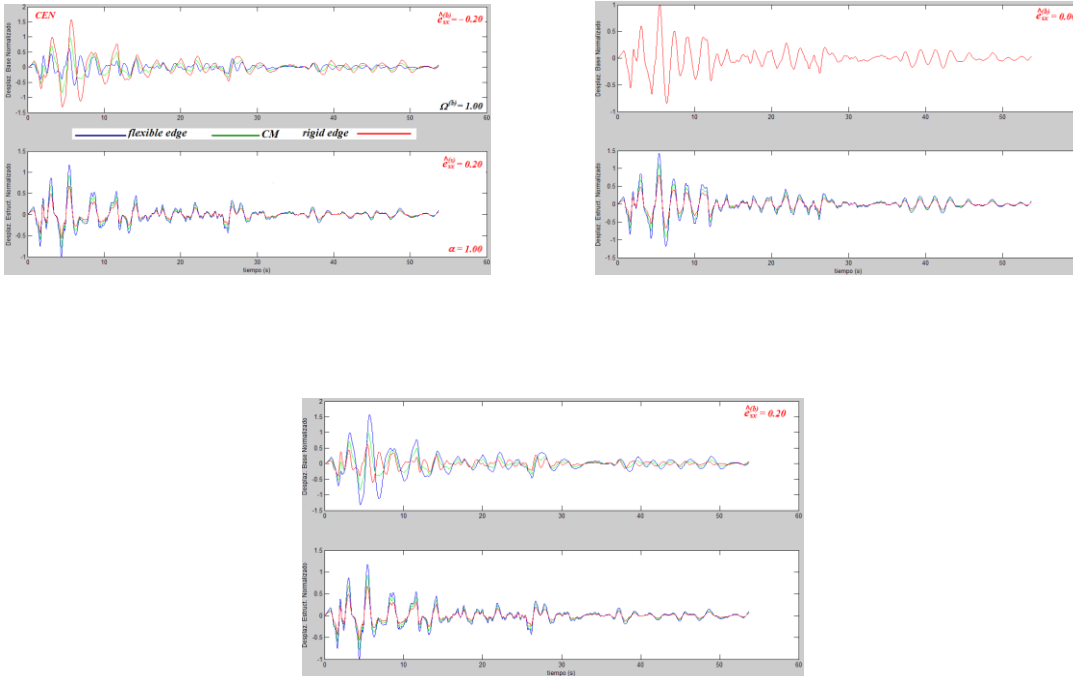


Figura 17 Desplazamientos relativos entre sistema de aislamiento y estructura para sismo El Centro.

10 CONCLUSIONES

Se han analizado dos estructuras una con planta cuadrada $\alpha = 1$ y otra con planta rectangular $\alpha = 0.5$, que tienen una excentricidad estática del 20% de la longitud de la planta. Por consiguiente tienen problemas de torsión si se construyen sin aisladores de base. En estas estructuras se han colocado tres tipos de aisladores de base elastoméricos, sin núcleo de plomo y se ha encontrado la respuesta sísmica ante 28 sismos artificiales, compatibles con los espectros del CEC-2000 y tres registros de sismos reales: El Centro de 1940, El de Chile de 1985 y el de México de 1985, los dos primeros son de alta frecuencia y el tercero de baja frecuencia.

Los aisladores fueron colocados desde una excentricidad normalizada igual a -0.5, que corresponde colocarlo en el pórtico débil hasta una excentricidad normalizada de 0.5 que representa colocarlo en el pórtico fuerte. Se fueron colocando con un incremento de excentricidad de 0.05. El objetivo del estudio era ver en qué posición y con qué propiedades de los aisladores se reducen los problemas de torsión en las estructuras analizadas. Del estudio realizado se desprenden las siguientes conclusiones:

- En las estructuras con aisladores de base se minimiza el problema de torsión en la superestructura debido fundamentalmente a que los desplazamientos laterales son muy pequeños.
- Los problemas de torsión en planta se minimizan si el CM coincide o está muy próximo al CR en el sistema de aislación.
- A más de que el CM coincida con el CR, si las propiedades dinámicas del sistema de aislación son apropiadas se reduce aun más la torsión de la superestructura.

11 REFERENCIAS

1. Aguiar, R. Romo, M. Torres M. y Caiza P. *El Sismo de Bahía de Caráquez*, 125 p. Sangolquí. Editorial Ediespe, 1998.
2. Aguiar, R. Daño sísmico del hospital de Bahía de Caráquez, *Revista SIGMA Colegio de Ingenieros Civiles de Pichincha*, **6**, 16-18 (1998).
3. Aguiar, R. Tres modelos de análisis sísmico en estructuras espaciales con aislamiento de base elastomérico, *Revista Ciencia. Centro de Investigaciones Científicas. Escuela Politécnica del Ejército*, **10**, 1, 35-50 (2007).
4. Aguiar, R. y Zevallos M. Balance Torsional en estructuras mono simétricas con disipadores de energía visco elásticos, *Revista Ciencia. Centro de Investigaciones Científicas. Escuela Politécnica del Ejército*, **11**, 1, 1-12 (2008).
5. Aguiar, R. *Análisis Sísmico de Edificios*, 340 p. Sangolquí. Editorial Ediespe.
6. Almazán, J. L. Seguí, C. y De la Llera, J.C. 2007. Recomendaciones para el control torsional en estructuras asimétricas por medio de disipadores de energía y aisladores sísmicos, *VII Encuentro de Investigadores y Profesionales Argentinos de la Construcción, VII EIPAC*, 14 p., Salta, Argentina, 2008.
7. Cevallos JTorsión en estructuras con y sin aisladores de base. Tesis de Maestría para obtener título de Master en Ciencias en Estructuras. Universidad Técnica de Manabí, 110. p, Portoviejo, 2008..
8. De la Llera, J. C. Almazán J. L. and Vial, I. J. Torsional balance of plan asymmetric structures with frictional dampers: analytical results, *Earthquake Engineering and Structural Dynamics*, **34**, 9, 1089-1108 (2005).
9. Pan, T. C. and Kelly, J. M. Seismic response of rotationally coupled base isolated structures, *Earthquake Engineering and Structural Dynamics*, **11**, 6, 749-770 (1983).
10. Seguí, E. *Torsión en sistemas aislados sísmicamente con dispositivos elastoméricos*. Tesis Doctoral Ph.D. Escuela de Ingeniería. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago de Chile, 240 p., 2007
11. Tena, A. and Gómez, L. Torsional response of base-isolated structures due to asymmetries in the superstructure, *Engineering Structures*, **25**, 72-83 (2002).
12. Tena, A. and Escamilla, C. Torsional amplifications in asymmetric base-isolated structures. *Engineering Structures*, **29**, 237-247 (2006).
13. Zayas, V. Low, S. and Mahin S. *The FPS earthquake resisting system: experimental report*, Earthquake Engineering Research Center. University of California at Berkeley, Report N. UCB/EERC-87/01, Berkeley, 1987

Intrusion Detection System location for real time network protection

C.A. de la Torre

Department of Computer Science, Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador

ABSTRACT: This paper explores issues that arise in the design and implementation of efficient computer network systems, for mission critical applications; where bandwidth is a limited good and consequently traffic is filtering. In a computer network system some routes could have installed Intrusion Detection System (IDS), so those routes in which traffic is forwarded from these devices to others nodes must be optimal after eliminating all garbage traffic. Because, the efficient distributions of IDS in a route path usually are a NP-complete problem, this paper tries to show the benefits of an efficient IDS location.

RESUMEN: El amplio uso del Internet permitió que las tecnologías desarrolladas para la red sean utilizadas en beneficio social. Lamentablemente junto con la masificación de los servicios que últimamente se han desarrollado, aparecieron graves problemas inherentes al inadecuado uso del ancho de banda corporativo. La protección de los sistemas críticos en contra de acciones indeseadas, que puedan ser desarrolladas por parte de ciber-criminales, ha obligado al perfeccionamiento de nuevas tecnologías de seguridad y protección informática. La saturación de los canales de comunicación, obligo a desarrollar nuevos algoritmos que facilitan la prevención y detección del tráfico de red no deseado, por lo que en este ensayo se plantea una solución para determinar la localización óptima de los Sistemas Detectores de Intrusos, favoreciendo su ubicación en puntos críticos de la red corporativa o Internet, cuya función principal es optimizar el tráfico general de los datos y priorizar para los usuarios el acceso a las aplicaciones más críticas.

1. INTRODUCTION

An intrusion into an information system tries to compromise the security of the system. Besides, an Intrusion Detection System (IDSs) attempt to detect these intrusions, so optimal allocation of Intrusion Detection Systems is essential to improve network security. Knowing what is being accessed on the network and how it is being accessed is key to providing a secure and compliant network. The ability to find a few key frames in large stream of data is necessary to determine the source of unauthorized access. However, it is as important to ensure the internal security of a network as it is to ensure the external security. In this paper, discusses the problem of finding the optimal location of a set of Intrusion Detection Systems in a network, so that these IDSs could detect unauthorized network traffic, improve security in devices that support SNMP and detect restricted documents transfers.

2. PRINCIPAL CAUSES of Security Risk

Streaming media, file downloads and chat applications not only can steal bandwidth from mission critical applications, but also pose a security risk, because could occult unauthorized data transfers.

The Lack of User Access List in devices to limit the set of IP addresses that could access critical elements using SNMP can be a serious risk for many corporate networks. For instance, the use of default SNMP community strings in the configuration of devices that can be accessed from unauthorized nodes seriously compromise the network security.

The installation of devices inside corporate networks, without the supervision of network staff, may also be an open door to network resources for cyber-criminal groups. Besides, some network devices might be improperly configured, thus allowing only authorized access to the network. Such network devices could be exploited by crackers for cybercriminal actions.

2.1. *Intrusion Detection Systems*

A typical hacker attack is not a simple, one-step procedure. It is rare when hackers can gain full access on a remote computer applying only one method. It is more likely that the attacker will need a combination of several techniques to bypass the many layers of protection standing between them and root administrative access. There are many technologies to prevent a security break-up in the systems, like Intrusion Detection Systems, Honey-pots and Firewalls. In this paper will analyze the benefits of determining optimal location for IDS. Intrusion Detection Systems can be classified into three main categories: host-based IDSs, network-based IDSs as well as router-based IDSs.

Host-based IDSs are usually deployed on individual host-machines to monitor activities on host machines. Hence, their implementation is machine-dependent, and deprives much of the computer power from the users of the host machines. If a host becomes a victim of an intrusion, then its IDS will be brought down along with the host machines. Moreover, separate Intrusion Detection Systems on individual host machines do not provide a direct, as well as complete, picture of the distribution of intrusion attempts against a network, making it difficult for the SSA (Security System Administrator) to take corrective actions. The main advantage of the host-based Intrusion Detection Systems is that they can detect intrusions targeting the host machines from both insiders and outsiders.

Network-based Intrusion Detection Systems are usually set up in computers of strategic importance for the network, to keep an eye on information packets sent amid the hosts. Network-based Intrusion Detection Systems can detect breaches in the network security policy, but may be unable to analyze, not just the header part of the packets, but also the information part; manipulate information like not only the header part though also the information part, in order to precisely detect certain intrusive activities. Furthermore, the huge amount of network traffic makes it difficult to effectively analyze all this information.

Router-based Intrusion Detection Systems are setup on routing devices to scrutinize information packets going through routers, thus thwarting intrusive information packets from inflowing the network inside the router. Router-based Intrusion Detection Systems are similar to network-based Intrusion Detection Systems, as well as thus suffer from similar problems.

2.2 *The problem*

In a general wide area network, any node may act as a router, as a server and as a client. However, the purpose of our research is focused on the elimination of dangerous and undesired packets from the network, in order to make the network more secure, and at the same time to improve performance, trying to detect those dangerous packets as soon as possible. So they consume a few network resources as possible before they are discarded.

It is impossible to control the sources of undesired packets. However, Intrusion Detection Systems may be used by Internet Access Providers, to filter undesired traffic. Since this filtering requires huge computation time, this task should be distributed throughout the network. At the same time, since it consumes huge resources, it might degrade the performance of the network increasing the latency of a link. Hence, wise optimal IDS location will be essential to improve the overall network security and performance.

In order to simplify the problem all IDSs to locate will have the same characteristics. Hence, they are interchangeable. Placed somewhere in the network, any of them will be able to detect the same packets as disposable. We will assume that IDSs are located in some routers of the network.

3. DEFINITIONS

In this section, present the principal definitions required to state the IDS location problem. The network will be composed of a set of n communication agents $A = \{a_1, a_2, a_3, \dots, a_n\}$, which may act as a client or servers in a communication section, and a set of p routers (gateways) $W = \{w_1, w_2, \dots, w_n\}$ that interconnect those agents.

Thus the network may be modeled as a direct graph $N=(V,R)$, where the vertices of the graph are $V = A \cup W$, and the set of arcs $R \subseteq V \times V$ represents network connections. These links are considered directed for the sake of generality since, although connections will be most probably bidirectional, and the bandwidth in links are different for each way (asymmetric).

For each ordered pair of communications agents, a static route (path in the graph G) is computed according to some rules, and considered static throughout our study. Although routes may be recomputed at any time, they are not likely to change frequently. Thus, our assumption seems reasonable, and simplifies the formalization of the problem.

Let $a_i, a_j \in A$ be two communications agents. The (static) route from a_i to a_j will be denoted as $\text{Route}(a_i, a_j)$. This route is assumed to include at least one router. Hence, the route between two agents will be a sequence of vertices of the graph G that start with agent a_i ends with agent a_j and includes at least one router $w_k \in W$

4. THE FORMAL MODEL

For each ordered pair of agent nodes $a_i, a_j \in A$, all the IDSs will have the same hit detection ratio $H_r(a_i, a_j)$. This determines how many of the packets that reach a router, in which there is an IDS running, are discarded and not forwarded to their destination. The configuration and maintenance of the IDSs is out of the scope of this paper. So their behavior is assumed to be optimal.

The brute average traffic that goes from agent a_i to agent a_j is the amount of packets in the network that are originated in node a_i and have a node a_j as destination. For convenience, this traffic is measured in packets/seconds, and it will be denoted as $\text{BruteTr}(a_i, a_j)$. The net average traffic that goes from agent a_i to agent a_j is:

$$\text{NetTr}(a_i, a_j) = \text{BruteTr}(a_i, a_j) - H_r(a_i, a_j) * \text{BruteTr}(a_i, a_j)$$

Thus

$$\text{NetTr}(a_i, a_j) = \text{BruteTr}(a_i, a_j) (1 - H_r(a_i, a_j))$$

The cost of delivering a packet from a node a_i to another node a_j depends on the cost of transmitting the packet through all the links (arcs) in its route (path) from the source to destination node. Although the packets found in the Internet differ in size, most of them have the same size. Thus is assumed that all the packets are of the same size, so this assumption helps to computing the cost of transmitting a packet through a path.

Although in practice the cost of transmitting a packet trough different links might differ, for simplicity reasons assumes that it is a constant value (taking that cost as a unit of cost). We will use C to denote the cost of transmitting a packet through a link. Thus, the cost of transmitting a packet through a route will only depend on the length of the route. Otherwise, routes will be at least of length 2 according to our premises.

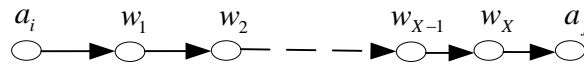


Figure 1. Sample route from agent a_i to a_j

Let us consider the route from agent a_i to a_j shown in figure 1. Let $\text{Route}(a_i, a_j) = (a_i, w_1, w_2, \dots, w_x, a_j)$. In this case, there are x routers in the path from a_i to a_j .

The cost of transmitting a packet trough the complete route is $(x+1)C$. Besides, the cost of transmitting the brute traffic demand from node a_i to a_j would be:

$$\text{BruteTr}(a_i, a_j) (x+1)C$$

However, putting IDS in router w_1 (the first one in the route from a_i to a_j .), then transmission cost could be:

$$\begin{aligned} & \text{BruteTr}(a_i, a_j)_{C+x} - \text{NetTr}(a_i, a_j)_C = \\ & \text{BruteTr}(a_i, a_j)_{C+x} - (\text{BruteTr}(a_i, a_j)_{(1-H_r(a_i, a_j))})_C = \\ & \text{BruteTr}(a_i, a_j)_{(x+1)C} - \text{BruteTr}(a_i, a_j)_{H_r(a_i, a_j)}_xC \end{aligned}$$

This yield a benefit of $\text{BruteTr}(a_i, a_j)_{H_r(a_i, a_j)}_xC$ from the absence of IDSs in the route from a_i to a_j . If the IDS were placed in the last router in the path the benefit would have been of only $\text{BruteTr}(a_i, a_j)_{H_r(a_i, a_j)}_C$ (x times less). This shows how important it is to locate the IDS near the source of traffic. Note also that installing more than one IDS per route does not discard more packets, so the benefit is the benefit yield by the IDS nearest to the source. The other IDS will consider valid all the packets the first IDS consider valid.

5. SOLUTION

The benefit from installing an IDS on a specific router will depend on several aspects: the number of routes that go through it, the traffic, and its relative position on each of the routes that go through it.

Let $a_i, a_j \in A$, and let $w \in \text{Route}(a_i, a_j)$. The relative position of router w in route from a_i to a_j will be denoted as $\text{RelPos}(w, a_i, a_j)$. Let $\text{LenRoute}(a_i, a_j)$ be the numbers of routers in that route. Then, the benefit obtained from installing an IDS in router w for route $\text{Route}(a_i, a_j)$ is:

$$\text{Benefit}(w, a_i, a_j) = \text{BruteTr}(a_i, a_j)_{H_r(a_i, a_j)} (\text{LenRoute}(a_i, a_j) - \text{RelPos}(w, a_i, a_j))_C$$

Let $I \subseteq W$ be a set of routers where an IDS has been Installed. Then the benefit obtained from installing this set of IDSs in the network N will be:

$$\text{Benefit}(I, N) = \sum_{a_i, a_j \in A} \left(\max_{\{w \in I \cap \text{Route}(a_i, a_j)\}} \text{Benefit}(w, a_i, a_j) \right)$$

6. CONCLUSIONS

Network Intrusion Detection Systems do a good job controlling which traffic is forwarded to flow in Internet, However, it is inevitable that some traffic that is allowed to flow are malicious in nature or are garbage, so each network into Internet needs a second layer of defense, composed of firewall and content filter (http, ftp, etc). For instance, the efficiency of this kind of NIDS depends of distance counted in hops to flow source, so undesired flows could be blocked before saturate critical network links.

7. REFERENCE

1. Allen, J., Christie, A., Fithen, W., McHugh, J., Pickel, J., and Stoner, E., State of the Practice of Intrusion Detection Technologies. CMU/SEI-99-TR-028, Carnegie Mellon University, Software Engineering Institute, January 2000.
2. Anderson, James P., Computer Security Threat Monitoring and Surveillance. James P. Anderson Co., Fort Washington, Pa., 1980.
3. AIDE Manual , <http://www.cs.tut.fi/~rammer/aide/manual.html>.
4. Bace, Rebecca Gurley. (2000). Intrusion detection. Indianapolis, IN: Macmillan Technical Publishing.
5. Bace, Rebecca. Mell, Peter. Intrusion Detection Systems. NIST Special Publication on Intrusion Detection Systems.

Módulo Electrónico de Entradas/Salidas Análogas y Discretas para la Gestión Remota de Procesos sobre la Red GPRS

Andrés Estrella T., Rodrigo Silva T., Hugo Ortiz T.

Departamento de Eléctrica y Electrónica, Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador

RESUMEN: La red General Packet Radio Service (GPRS) ofrece la posibilidad de transmitir datos desde unidades fijas ó móviles hacia un centro de gestión remoto. En este artículo se plantea un método para la transmisión de datos de telemetría desde la unidad móvil hacia una red privada o INTERNET. Se utiliza un MODEM M2M GPRS de localización vehicular para integrar el sistema a una plataforma existente de administración de flotas de vehículos basada en un Global Positioning System (GPS) y se desarrolla un módulo electrónico de entradas/salidas discretas y análogas con comunicación serial RS-232 para adquisición de datos. El software de administración se desarrolla con Visual Basic 2005 y con el Measurement Studio 8.0 del National Instruments. El sistema se implementa en un servidor central que actúa como interfaz entre los dispositivos móviles y la aplicación remota de gestión y administración. Además, se describe el protocolo GEOSKYBUS desarrollado sobre la plataforma existente para permitir la comunicación aplicación-aplicación.

ABSTRACT: The General Packet Radio Service (GPRS) network offers the possibility to transmit data from fixed or mobile units to a remote management center. In this study is designed a method for transmission of telemetry data from mobile unit to a private network or INTERNET. It is used a vehicle locator GPRS MODEM M2M to link the system to an existing platform of vehicle fleet management with a Global Positioning System (GPS) and it is designed an electronic module of discrete and analogous input/output signals with RS-232 serial communication for data acquisition. Software for management is designed using Visual Basic 2005 and Measurement Studio 8.0 from National Instruments. The system is implemented in a central server which performs as an interface between the mobile devices and the management remote application. In addition, it is described the GEOSKYBUS protocol created on the existing platform to allow the applied-applied communication.

1 INTRODUCCION

La industria ecuatoriana exige un sistema de gestión remota de los diferentes procesos que suceden en sus unidades móviles con el fin de optimizar y administrar eficientemente el transporte de bienes. Inicialmente, se contaba con un sistema de administración de flotas de vehículos basado en localización GPS únicamente, que dejaba de lado la medición y gestión de variables importantes en un sistema de administración completo. Dado el amplio espectro de variables y procesos que maneja la industria fue indispensable desarrollar un sistema que permita la conexión de cualquier tipo de sensor así como de varios actuadores usando estándares industriales [1]. De esta forma, el

módulo desarrollado es flexible para su implementación en cualquier aplicación fija ó móvil tomando en cuenta solamente el tipo de sensor y/o actuador necesarios.

En este trabajo se describe la arquitectura usada para la implementación del sistema, el dispositivo electrónico de adquisición de datos desarrollado y el protocolo de comunicaciones GEOSKYBUS sobre el cual se realiza la transmisión de datos desde y hacia el módulo electrónico.

2 ARQUITECTURA

El sistema está basado en la arquitectura de red mostrada en la Figura 1.

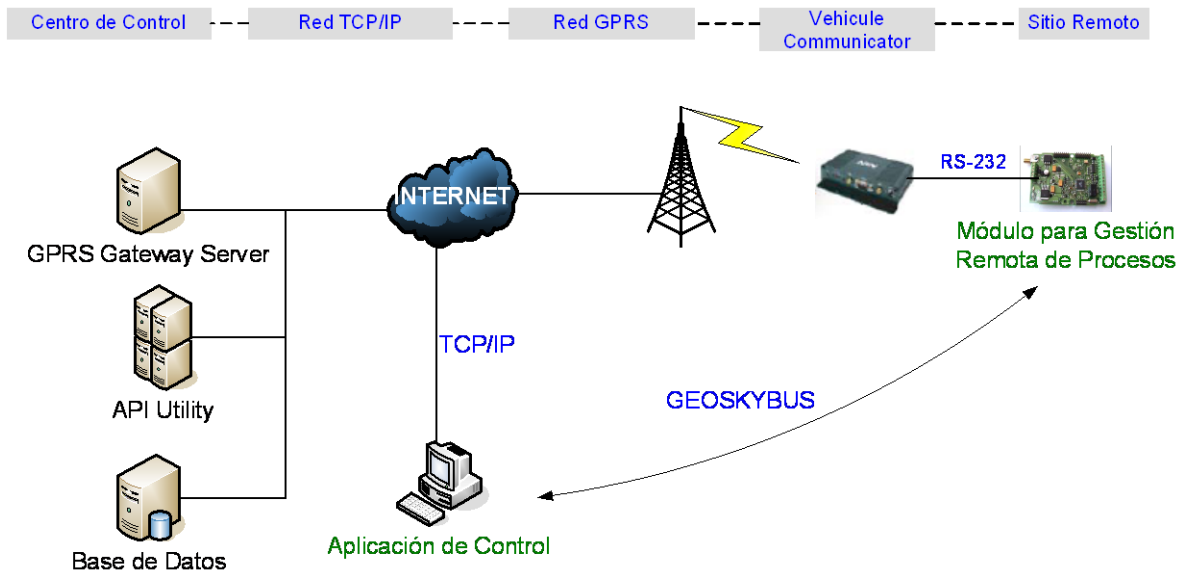


Figura 1. Arquitectura del sistema de gestión remota

La arquitectura observa cinco zonas diferenciadas como: Sitio Remoto, Vehicle Communicator, Red GPRS, Red TCP/IP y Servidor Dedicado.

Sitio Remoto: Es la unidad móvil donde se encuentra el dispositivo electrónico de adquisición de datos y el MODEM GPRS GV-310 de marca NXN [2]. La comunicación entre los dos dispositivos se realiza a través del protocolo RS-232 y un cable tipo null modem.

Vehicle Communicator: El MODEM GPRS envía las cadenas de caracteres recibidas por el puerto serial hacia el GPRS Gateway Server ubicado en el Servidor Dedicado y viceversa. Utiliza la red GPRS para realizar una conexión TCP/IP con el GPRS Gateway Server.

Red GPRS: Es la red de conmutación de paquetes del estándar Global System for Mobile Communications (GSM) que permite la comunicación de datos hacia redes TCP/IP de dispositivos móviles sobre la red de telefonía móvil.

Red TCP/IP: Puede ser una red privada o el Internet y ofrece el canal de comunicación entre la red GPRS y el GPRS Gateway Server. Además, permite a la aplicación de control conectarse con el API para gestionar el proceso en el sitio remoto.

Servidor Dedicado: En esta zona se encuentra el GPRS Gateway Server que es una aplicación interfaz que gestiona la comunicación con cada uno de los MODEMS GPRS funcionando en el sistema. Existe una aplicación API que interactúa con el GPRS Gateway Server para enviar y recibir mensajes American Standard Code for Information Interchange (ASCII) desde y hacia el puerto serial del MODEM. Permite, además, la comunicación con una o más aplicaciones de

control. Finalmente, almacena en una base de datos [3] los comandos entrantes desde el sitio remoto para análisis y referencia.

3 DISPOSITIVO ELECTRÓNICO

Se desarrolló un dispositivo electrónico de entradas/salidas discretas y análogas para adquisición de datos y excitación de sensores. El diagrama de bloques se muestra en la Figura 2.

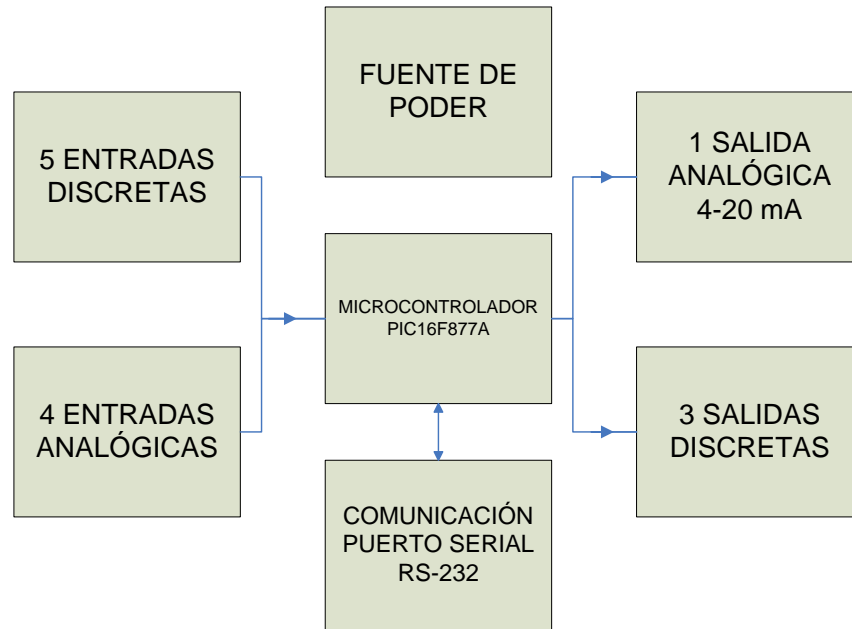


Figura 2. Diagrama de Bloques del Dispositivo Electrónico de Adquisición de Datos

Fuente de Poder: La fuente de poder utiliza el regulador conmutado LM2576-5 y el timer LM555 para producir una salida a 5 VDC y otra a -5 VDC. El voltaje de entrada puede variar entre 9 y 30 VDC.

Microcontrolador PIC16F877A: El dispositivo está basado en el microcontrolador PIC16F877A [4] aprovechando su estabilidad y diversidad de puertos I/O. El programa gestiona las comunicaciones activando los comandos GEOSKYBUS.

Salida Análoga: Cuenta con una salida analógica a 4-20 mA [5] y una resolución de 8 bits.

Salidas Discretas: Posee 3 salidas discretas con relé. Cada una puede manejar cargas hasta 280 W.

Entradas Discretas: 5 entradas discretas 12-24 VDC optoacopladas.

Entradas Análogas: 4 entradas análogas a 4-20 mA con impedancia de entrada de 250 Ohms y 10 bits de resolución.

Comunicación Serial: La comunicación serial se realiza a través del Universal Synchronous/Asynchronous Receiver/Transmitter (USART) del microcontrolador y el C.I. MAX232CPE. El dispositivo electrónico posee un terminal DB9 macho.

4. PROTOCOLO DE COMUNICACIONES GEOSKYBUS

Para la comunicación con el módulo electrónico para gestión remota de procesos, se ha desarrollado un protocolo de nivel aplicación, capa 7 del modelo Open System Interconnection (OSI). Se ha

tomado como modelo el protocolo MODBUS [6], pero ajustando sus particularidades a requerimientos específicos y únicos del desarrollo en cuestión. Es un protocolo para comunicación cliente/servidor entre dispositivos conectados en diferentes redes. El protocolo es llamado GEOSKYBUS. La Figura 3 muestra el ámbito de comunicaciones.

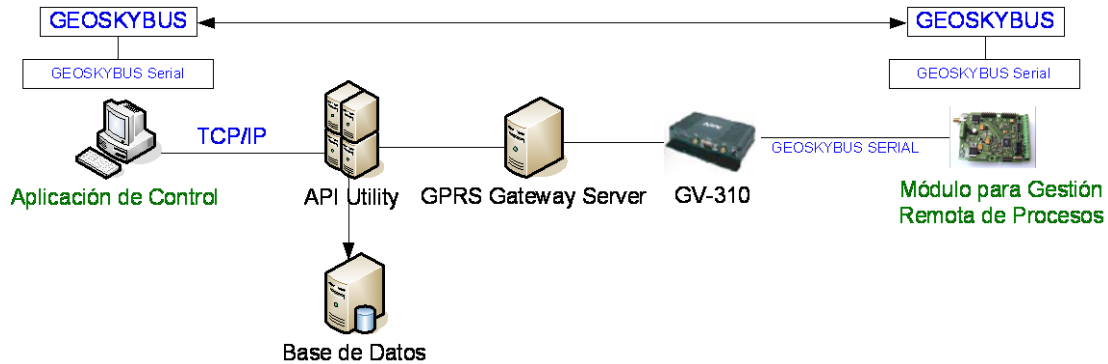


Figura 3. Comunicación con el protocolo GEOSKYBUS

4.1 Descripción

El protocolo GEOSKYBUS define un Protocol Data Unit (PDU) independiente de las capas de comunicación inferiores. La vinculación del protocolo GEOSKYBUS en buses o redes específicas introduce campos adicionales para formar el Application Data Unit (ADU). La estructura se muestra en la Figura 4.

El ADU es construido por el cliente que inicia la transacción GEOSKYBUS. La función indica al servidor que acción realizar. El protocolo de aplicación GEOSKYBUS establece el formato de la solicitud iniciada por el cliente. El campo de función de la unidad de datos GEOSKYBUS es codificado en un nibble. Los códigos validos están en el rango de 0...15 decimal. Cuando un mensaje es enviado desde el cliente al dispositivo servidor el campo del código de función indica que acción realizar.

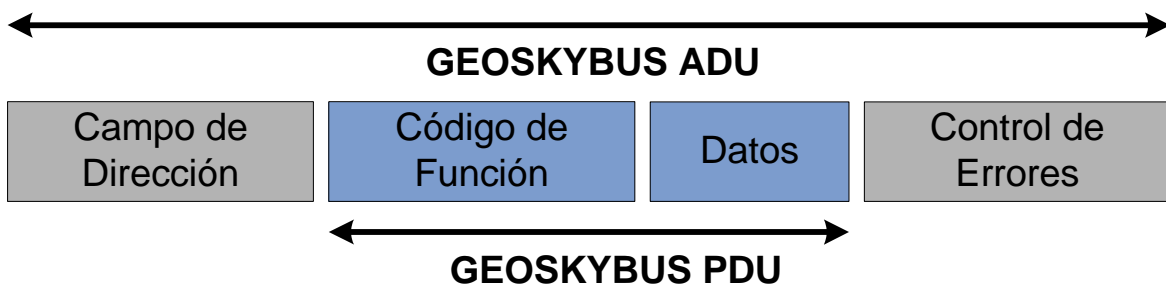


Figura 4. Trama GEOSKYBUS

El campo de datos de los mensajes enviados desde el cliente al dispositivo servidor contiene información adicional que el servidor usa para realizar la acción definida por el código de función. Puede incluir ítems como direcciones de salidas discretas o analógicas, y el valor a escribir en un registro o bit. El campo de datos puede estar vacío en ciertos tipos de solicitud donde el servidor no requiere información adicional para realizar la acción pedida. Una transacción GEOSKYBUS es como se muestra en la Figura 5.

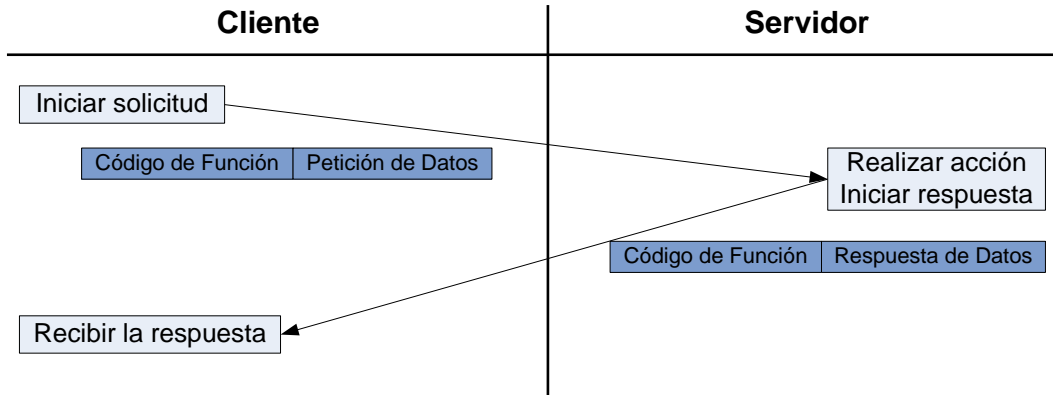


Figura 5. Transacción GEOSKYBUS

4.2 Códigos de Función

Los códigos de función implementados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Códigos de Función GEOSKYBUS

				Código (hex)	
Acceso a Datos	Acceso a bits	Salidas Discretas	Leer Salida Discreta	3	3
			Escribir Salida Discreta	4	4
	Acceso a bytes	Salida Analógica	Leer Registro	5	5
			Escribir Salida Analógica	6	6
		Entradas Analógicas	Leer Registro	5	5
		Entradas Discretas	Leer Entradas Discretas	2	2
Otros		Reset	1	1	

5 SOFTWARE

Para la gestión remota se desarrolló una aplicación de control en Visual Basic 2005 [7] y el Measurement Studio 8.0 de National Instruments [8]. Es una aplicación desktop que se comunica mediante un socket TCP/IP a la aplicación API en el servidor dedicado. De esa forma puede enviar y recibir mensajes GEOSKYBUS hacia el dispositivo electrónico en el sitio remoto. Además, formatea mensajes GEOSKYBUS y muestra en pantalla la información recibida del estado de entradas y salidas en el dispositivo electrónico activo. La Figura 6 muestra el formulario principal.

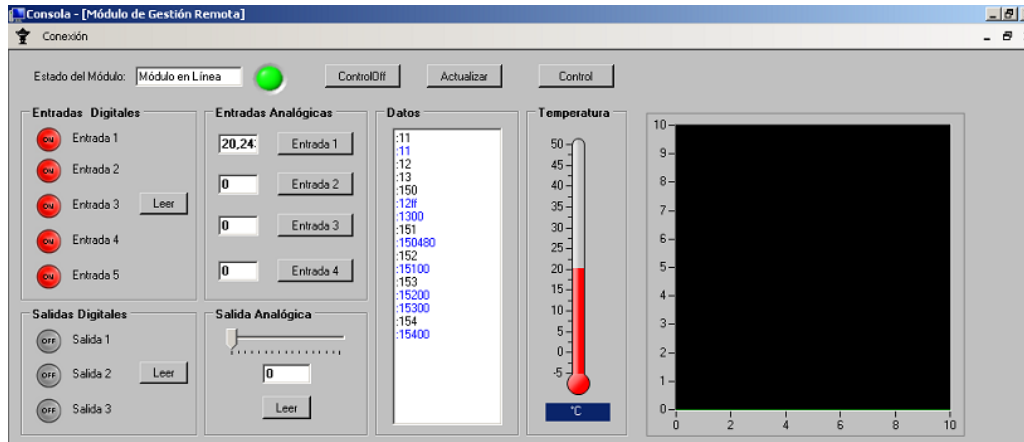


Figura 6. Formulario Principal de la Aplicación de Control

6 RESULTADOS

Se realizaron dos tipos de pruebas para caracterizar el sistema. La primera en el dispositivo electrónico en cuanto a parámetros de entradas y salidas, y la segunda en el desempeño de la red de comunicaciones.

6.1 Velocidad de Respuesta Salidas Discretas

En primer lugar se realizó la medición del tiempo que toma el hardware en activar y desactivar efectivamente una carga conectada a la salida discreta con la ayuda de un osciloscopio. Las figuras 7 y 8 muestran los resultados. Se puede apreciar que el tiempo de subida bordea los 6 ms y el tiempo de bajada los 430 μ s. El tiempo de procesamiento en el microcontrolador se midió con la ayuda de la herramienta StopWatch de MPLAB IDE 7.5 y se obtuvo un valor de 62.4 μ s en subida y 62.2 μ s en bajada medidos desde que llega el mensaje GEOSKYBUS.

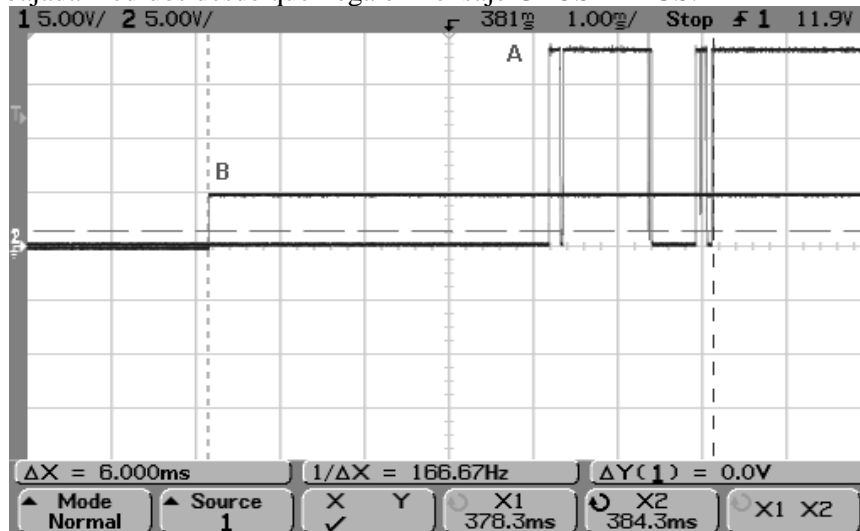


Figura 7. Velocidad de Respuesta de Salidas Discretas OFF/ON

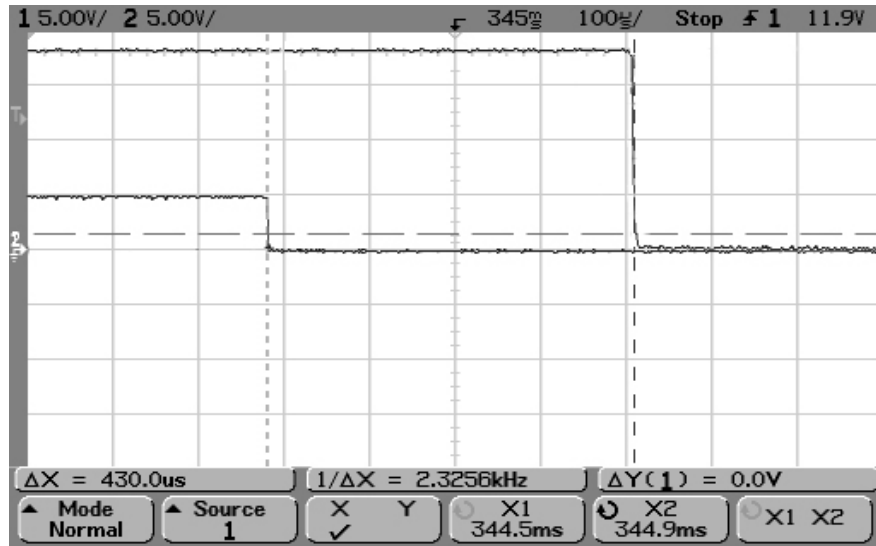


Figura 8. Velocidad de Respuesta de Salidas Discretas ON/OFF

En conclusión el tiempo de subida de la salida discreta es de 6.0624 ms y el tiempo de bajada es de 492.4 μs

6.2 Rango y Tiempo Mínimo de Cambio de Estado en Entradas Discretas

Una entrada discreta debe mantenerse dentro de los rangos mostrados en la Tabla 2 durante un tiempo mayor a 21.34 ms para que el cambio de estado sea detectado bajo cualquier circunstancia. La impedancia de entrada es de 14.7 Kohms.

Tabla 2. Rangos de Voltaje para Entradas Discretas

Entradas Discretas			
OFF-ON		ON-OFF	
VDC	ESTADO	VDC	ESTADO
0-6.08	OFF	24-6.03	ON
6.08-24	ON	6.03-0	OFF

6.3 Linealidad y Resolución de Salida Analógica

La salida analógica tiene una resolución de 8 bits. La prueba se prepara colocando valores múltiplos de 8 a la entrada del Digital Analog Conversor 0808 (DAC0808) desde 0 hasta 255 y midiendo el valor de corriente a la salida. De los datos medidos se realiza una regresión lineal y se obtiene un error de 0.5% con respecto a la curva ajustada.

6.4 Respuesta de la Red de Comunicaciones

Para la prueba de comunicaciones aplicación-aplicación se utilizó un analizador de tráfico TCP en el servidor remoto y se registra el tiempo promedio que toma a una transacción GEOSKYBUS

culminar exitosamente. La prueba muestra un tiempo promedio en 100 mediciones de 4.14 seg. Es decir, desde que se envía el mensaje GEOSKY-BUS al sitio remoto hasta que se recibe la confirmación, demora 4.14 seg en promedio.

6.5 Demostración del Prototipo

La Figura 9 muestra la plataforma de prueba construida para emular una planta industrial remota equipada con el módulo electrónico y que requiere control de temperatura ON-OFF más supervisión de compuertas. El sensor de temperatura utilizado es una termocupla tipo J conectada a un transmisor 4-20 mA en una entrada analógica del módulo electrónico. Para supervisar la apertura y el cierre de la compuerta se utiliza un sensor magnético conectado en una entrada discreta. Para variar la temperatura del ambiente se utilizó un ventilador operado con corriente continua y una lámpara incandescente como fuente de calor, los dos elementos conectados a salidas discretas.

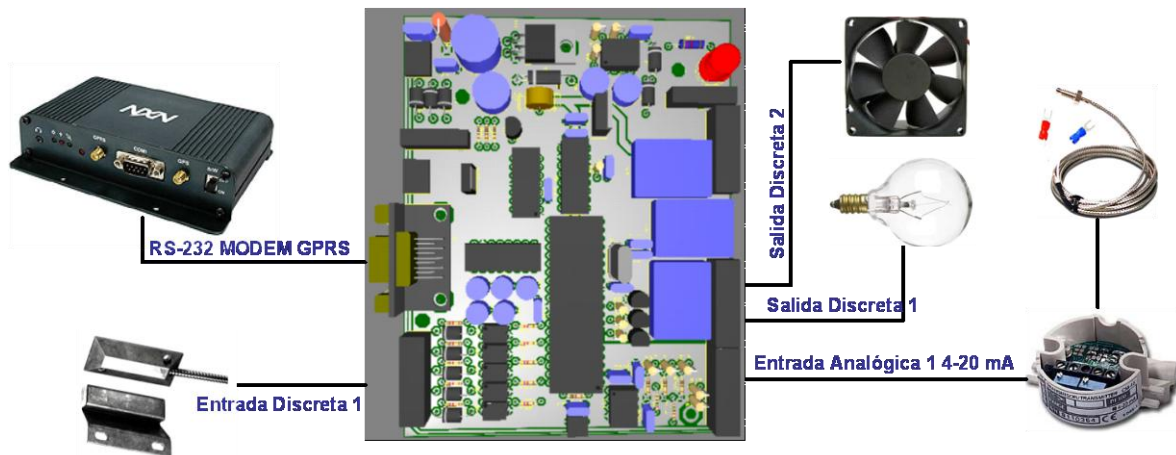


Figura 9. Plataforma de emulación

La gestión del módulo electrónico puede realizarse de forma local ó también de forma remota a través de una consola como la mostrada en la figura 10. La consola puede estar instalada en un PC local conectado directamente al módulo vía puerto serial ó puede estar en un PC remoto con acceso al internet a través de una aplicación instalada en un servidor web. La comunicación del módulo electrónico con el centro de gestión requiere del enlace GEOSKYBUS implementado sobre la plataforma GPRS de una de las operadoras locales de servicios móviles.

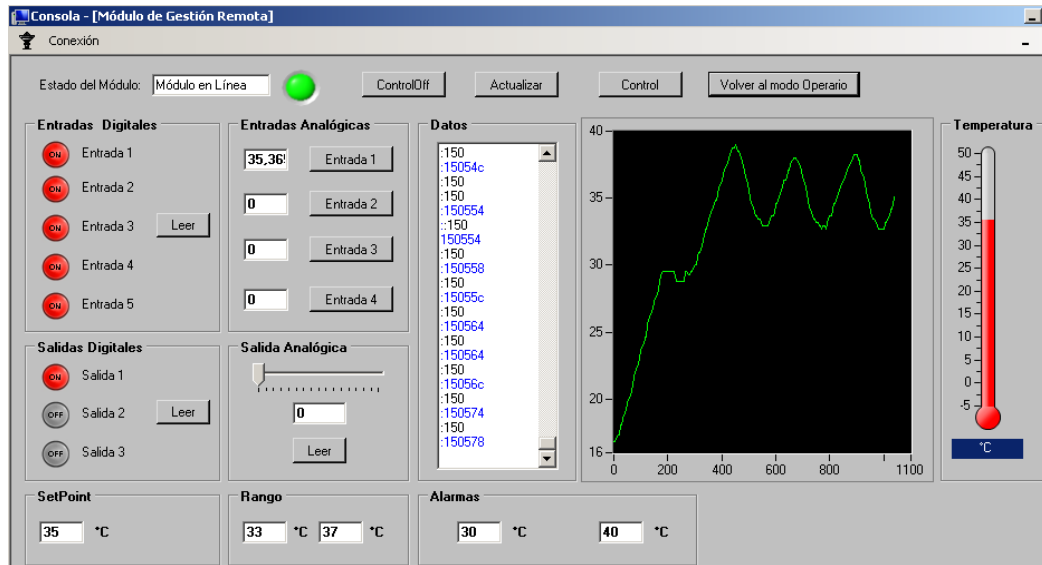


Figura 10. Consola de gestión del sistema

7 CONCLUSIONES

De los puntos propuestos en el objetivo inicial de este trabajo, resaltan las siguientes consideraciones:

- El prototipo ha demostrado un funcionamiento estable y confiable en una aplicación real, a pesar del retardo intrínseco que la comunicación a través de conmutación de paquetes sobre la red GPRS introduce al sistema.
- Los resultados de la evaluación son satisfactorios en cuanto a gestión remota de procesos se refiere.
- El uso de estándares industriales para comunicación de sensores y datos abre un amplio espectro de posibilidades en variables a medir, siendo limitado únicamente por la disponibilidad de los sensores y la velocidad de cambio de la variable a medir debido al retardo en la comunicación.
- El protocolo de comunicación a nivel aplicación GEOSKYBUS ha adicionado valor en cuanto a confiabilidad se refiere gracias a su estructura maestro-esclavo y fácil encapsulación sobre capas subyacentes de transmisión de datos, lo que abre las puertas al sistema a funcionar sobre cualquier plataforma de comunicaciones y no solamente la proporcionada por el sistema GEOSKY-SAF.
- El dispositivo tiene un comportamiento adecuado de acuerdo a los alcances del proyecto para locaciones remotas fijas y móviles. Sin embargo, el retardo en la comunicación limita la aplicación a variables de cambio lento como temperatura. La integración del módulo con un MODEM GPRS dedicado a comunicación de datos mejorar a ostensiblemente la capacidad del módulo para gestionar variables de cambio rápido como flujo al reducir el retardo.
- La cobertura de red del sistema está supeditada a la cobertura de la operadora celular que presta el servicio de transmisión de datos. Por lo que el sistema podrá funcionar en cualquier

lugar donde exista cobertura celular GPRS y la gestión remota se puede realizar desde cualquier punto a nivel mundial donde exista conexión al Internet.

8 REFERENCIAS

1. William C. Dunn, Fundamentals of Industrial Instrumentation and Process Control, McGraw-Hill Companies Inc., 2005.
2. NXN Technology CO., "Nprobe gv-310," <http://www.nxn.com.tw/GV-310.php>, 2004.
3. Robin Dewson, Beginning SQL Server 2005 for Developers, Apress, 2006.
4. Microchip Inc., "Pic16f87xa datasheet," <http://ww1.microchip.com/downloads/en/DeviceDoc/39582b.pdf>, 2003.
5. Building Automation Products Inc., "Designing 4-20 ma current loops," <http://www.bapihvac.com/CatalogPDFs/App Notes/Designing Current Loops.pdf>, 2006.
6. Modbus IDA, "Modbus application protocol specification v1.1a,"
7. <http://www.modbus.org/docs/Modbus Application Protocol V1.1a.pdf>, 2004.
8. Thearon Willis y Bryan Newsome, Beginning Visual Basic 2005, Wiley Publishing, Inc., 2006.
9. National Instruments Corporation, "Measurement studio user manual," <http://www.ni.com/pdf/manuals/373392c.pdf>, 2008.
10. Bonnie C. Baker, Techniques that Reduce System Noise in ADC Circuits, Microchip Technology Inc., 2004.

Medios de inducción, control de oxidación y contaminación en el cultivo *in vitro* de *Polylepis microphylla*

P. Jaramillo, K. Proaño & M. Jadán

Carrera de Ing. En Biotecnología, Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador

C. Segovia

Universidad de Florida, Gainesville, USA

RESUMEN: Los bosques de *Polylepis* contienen una parte importante de la biodiversidad de Sudamérica, controlan los procesos erosivos, protegen las cuencas, la calidad de los suelos y del agua. En el Ecuador, *Polylepis microphylla* es la única especie de este género con una distribución muy restringida y cuya población ha disminuido drásticamente debido al incremento de las áreas de pastoreo y de sembríos. Por lo cual es necesario desarrollar iniciativas que promuevan la conservación de esta especie, siendo una alternativa el uso de técnicas de cultivo de tejidos vegetales, como es la micropropagación, que permite reproducir cientos de clones de una misma especie. La finalidad de este estudio es determinar los mejores medios de establecimiento y multiplicación, que son las primeras fases de la micropropagación. Se evaluaron tres tiempos de inmersión (10, 20 y 30 min.) y tres concentraciones (10, 20 y 30%) de cloro comercial (5,25% de hipoclorito de sodio). El tratamiento de 10 min en cloro comercial al 20% mostró uno de los menores porcentaje de contaminación (13%), menor oxidación del medio (37%), mayor sobrevivencia de los explantes (60 %) y el mayor número de brotes en la fase de establecimiento ($p=0,0001$). El mejor método de control de oxidación fue una modificación de la concentración de nutrientes del medio (K, N, FeSO_4 y sacarosa) minimizando la oxidación fenólica, y permitiendo mayor sobrevivencia de los tejidos ($p=0,00060$). El lavado con 4g/L de cisteína permitió una menor oxidación y mayor sobrevivencia ($p=0,00067$). La manipulación también fue un factor muy importante para el establecimiento de los explantes permitiendo una sobrevivencia del 94,4% al eliminar los primordios foliares antes de inocularlos ($p=0,0002$). En la fase multiplicación no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p=0,71$), pero el mejor balance hormonal fue de 1,5 mg/L de BAP, 1,5 mg/L de GA_3 y 0,5 mg/L de AIB, con un promedio de 4 brotes por explante a los 40 días, en el medio basal Chu *et al.* (1975) modificado.

ABSTRACT: *Polylepis* forests hold an important part of biodiversity in South America, control erosion processes, protect watersheds, and soil and water quality. In Ecuador, *Polylepis microphylla* is the unique specie of this genus with a highly restricted distribution, whose population has been shrunk due to anthropogenic forces. For this reason, is necessary the development of initiatives that promote the conservation of this species, being an alternative the use of plant tissue culture techniques. The purpose of this study was to determine the best method of disinfection, oxidation control, establishment, multiplication and initiation of the phase of rooting in the in vitro culture. There were assessed three immersion times (10, 20, and 30 min) and three concentrations of commercial chlorine (5.25 % of sodium hypochloride). The 10 min treatment in chlorine at 20% showed one of the lowest percentages of contamination (13%), less oxidation of the medium (37%), higher survival of the explants (60%) and the major number of outbreaks in the establishment phase ($p=0,0001$). The best method of controlling oxidation was a modification of nutrients concentration (K, N, FeSO₂, and sucrose) that decreases the environmental phenolic oxidation and allowing the best survival of tissues ($p=0,00060$). Washing with 4g/L of cysteine allowed less oxidation and increased survival ($p=0,00067$). It is obtained a survival of 94.4% at removing leaves of apical buds before their inoculation ($p=0,0002$). For phase propagating the best hormonal balance was 1.5 mg / L BAP, 1.5 mg / L of GA₃ and 0.5 mg / L of AIB, in the medium Chu et al. (1975) with modifications.

1 INTRODUCCIÓN

Polylepis microphylla es una especie leñosa del páramo andino del Ecuador, cuya presencia ha sido reportada únicamente al este de la Provincia del Chimborazo con una distribución geográfica y hábitat restringido. En los últimos años ha sufrido una alarmante disminución poblacional debido a distintos factores antropogénicos como la tala del bosque, la extracción de leña, la introducción de otras especies y el incremento de las áreas de pastoreo y sembríos en la zona, lo cual está llevando a la especie a un proceso de extinción local (Jameson & Ramsay, 2007; Boza *et al.*, 2005; Kessler, 2006; Renison & Cingolani, 2002).

En el Ecuador, los bosques de *Polylepis* se distribuyen en el páramo hasta los 4000 m.s.n.m., siendo uno de los géneros más importantes en los ecosistemas altoandinos. En Ecuador existen 8 especies del género *Polylepis*, una de ellas es *P. microphylla* cuya distribución actual al igual que la de otras especies ha sido disminuida de manera alarmante por procesos antropogénicos (ECOAN, 2005).

Los bosques de *Polylepis* cumplen importantes funciones ecológicas como: contener una parte importante de la biodiversidad de Sudamérica, albergar especies endémicas, diferentes formas de vida vegetal (Fjeldså, 1993) y numerosas especies herbáceas que incrementan la diversidad de mamíferos e insectos (Vega *et al.*, 2007). Además, regulan la escorrentía, controlan los procesos erosivos, aumentan el aporte hídrico mediante la condensación de neblina en sus hojas, protege las cuencas, la calidad de los suelos y del agua (Renison & Cingolani, 2002; Kessler, 2006), por lo que su pérdida generaría un impacto negativo al ambiente y a la biodiversidad, por lo que es uno de los ecosistemas prioritarios para la conservación (Vega *et al.*, 2007).

Esta especie presenta dificultades de propagación vegetativa tradicional y baja viabilidad de semillas, frente a estos problemas una alternativa biotecnológica, es la micropropagación, pero para estandarizar y desarrollar esta técnica hay que enfrentar varios problemas, uno es la presencia de microorganismos contaminantes, hongos y bacterias, durante el establecimiento *in vitro* de explantes procedentes de esta especie, sobretodo adultas y cuyas muestras provengan directamente del campo (Echenique *et al.*, 2004).

Algunas plantas, en especial leñosas, producen exudados de color marrón o negro, la presencia de estos compuestos se encuentra asociada con tejidos vegetales sometidos a situaciones de estrés (deseccación, daños mecánicos, daños en la desinfección, cambios en los potenciales hídrico, salino

y osmótico al ser incubados en el medio de cultivo, cambios de pH) (Echenique *et al.*, 2004; Pierik, 1990).

Las plantas leñosas son consideradas ricas en sustancias derivadas del metabolismo secundario como los polifenoles, los cuales están involucrados en la defensa ante microorganismos y depredadores, estos exudados son compuestos del tipo polifenol oxidados y taninos (Batista, 1999).

En condiciones *in vitro* se produce un estrés fisiológico que de igual manera hace que el tejido biosintetice estos metabolitos y se produzca la oxidación fenólica siendo este el principal problema en la fase de establecimiento, que generalmente hacen imposible el crecimiento y desarrollo en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (Echenique *et al.*, 2004; Pierik, 1990). Por esta razón la importancia del control de la oxidación al trabajar con leñosas y una de las maneras en que se puede minimizar es haciendo una modificación del medio de cultivo o una reducción del potencial redox.

En la modificación del medio de cultivo se puede reducir las concentraciones de nitrógeno, potasio, FeSO₄ y sacarosa, esto favorece para una menor síntesis de polifenoles y oxidación fenólica. En la modificación del potencial redox se puede emplear soluciones antioxidantes como el ácido cítrico, ácido ascórbico y cisteína HCl (Batista, 1999).

Los objetivos de este trabajo fueron evaluar y determinar el tratamiento óptimo de desinfección; evaluar el uso de antioxidantes, la manipulación y la modificaciones del medio de cultivo para el control de la oxidación y evaluar distintas concentraciones de BAP, AIB y GA₃ para la multiplicación de brotes durante el cultivo *in vitro* de explantes de *P. microphylla*.

2 METODOLOGÍA

2.1 Área de estudio

La colección del material vegetal se realizó al este de la Provincia del Chimborazo, cantón Alausí, parroquia Achupallas, Vía Achupallas–Lagunas de Osogoche km 15, las coordenadas del bosque son 75° 56' 98 E, 97° 49' 56,1 N, las altitudes oscilaron entre los 3650 a los 4000 m. (Romoleroux, 1989).

2.2 Toma de muestras

La metodología para esta fase de campo fue obtenida de un estudio realizado en Bolivia con *Polylepis tomentella* (Vega *et al.*, 2007). Se tomaron muestras de yemas apicales y laterales extraídas de plantas ubicadas en la Provincia del Chimborazo, cantón Alausí, parroquia Achupallas a los 3800 m.s.n.m., mediante una selección *in situ* de plantas proveedoras de ramas, las cuales tuvieron las mejores características fenotípicas, como número renuevo de yemas apicales, follaje perenne y denso, libres de enfermedades y hongos.

Una vez colectadas las muestras, se colocaron en bolsas de polietileno, con 100 mL de agua destilada y estéril a fin de evitar la pérdida de humedad y mantener su estado fisiológico; las bolsas se empacaron en un cooler para evitar daños mecánicos durante su transporte al laboratorio.

2.3 Identificación de la especie

Para verificar la identidad taxonómica del material vegetal colectado, se contó con la ayuda de especialista del Herbario de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

2.4 Manejo del material vegetal

Las yemas apicales y laterales fueron cortadas de las ramas con una longitud de 4-5 cm, retirando hojas y partes muertas de los explantes. Estas luego fueron colocadas en un vaso de precipitación con agua destilada para conservar el material en buen estado y poder iniciar con la fase de desinfección.

2.5 Medios de cultivo

El medio de cultivo que se utilizó en la fase de establecimiento fue el medio basal Chu *et al.*, (1975) con las vitaminas de Kao y Michayluk (1975) en base a estudios realizados en *P. tomentella* y *P. racemosa* en Bolivia (Quezada & Rocabado, 2005; Vega *et al.*, 2007), este medio se lo modificó, variando las concentración de Nitrógeno, Potasio, FeSO₄ y sacarosa debido a que en los primeros ensayos hubo una alta oxidación y como medida preventiva para esto se empleó a la mitad de la concentración los compuestos enunciados anteriormente, disminuyendo así las sales del medio, el hierro y la sacarosa que están involucrados o son causantes de inducir procesos de oxidación fenólica en los explantes (Batista, 1999).

En la fase de establecimiento la concentración de agar fue de 8 g/L; 25 mg/L de azúcar y de reguladores de crecimiento fueron: 1 mg/L de BAP, 1mg/L de GA₃ y 0,5 mg/L de AIB.

Los reguladores de crecimiento y las vitaminas usadas en el medio de cultivo fueron esterilizados con filtros milipore de 0,22 um, dentro de la cámara de flujo laminar y añadidos cuando el medio tenía una temperatura de 50-60°C, este procedimiento se realizó debido a que las vitaminas son termolábiles y parte de la actividad de los reguladores de crecimiento se pierde al ser esterilizados en el autoclave (Pierik, 1990; Roca & Mroginski, 1991).

2.6 Desinfección del material vegetal

Para la desinfección del material vegetal (yemas), se inició con una lavado con 3 g de detergente comercial por cada treinta yemas en un volumen de agua destilada de 500 ml, el detergente debe ser disuelto con agitación antes de usarlo, las yemas se lavaron por 10 min con el detergente y con agitación, luego se realizaron 3 lavados con agua destilada para eliminar los restos de detergente.

Después de eliminar el detergente, las yemas se lavaron con alcohol al 70% por 1 min, dejando completamente cubiertos los explantes, finalizado este tiempo de inmersión se eliminó el alcohol. Luego se evaluaron tres concentraciones de cloro comercial (5,25%) al 10%, 20% y 30% y tres tiempos de inmersión (10, 20 y 30 min), generando 9 tratamientos. Para cada tratamiento de desinfección se realizaron tres enjuagues consecutivos con agua destilada estéril, cada uno de cinco minutos, dentro de las cámaras de flujo laminar (Sánchez & Salaverría, 2004; Vega *et al.*, 2007).

Dentro de la cámara de flujo laminar, se seccionaron los explantes axénicos eliminando algunos foliolos. Los explantes desinfectadas fueron sembradas en tubos de ensayo que contenían 8 ml del medio de cultivo que contenía: 1mg/L de BAP, 1 mg/L de GA₃ y 0,5 mg/L de AIB.

Cada tratamiento de desinfección tuvo 10 repeticiones y las observaciones para evaluar la contaminación, sobrevivencia, nivel de oxidación y número de brotes se realizaron a los 30 días de iniciado el experimento, dando valores de 1 a los explantes contaminados y 0 a los no contaminados, con respecto a la sobrevivencias se dio valores de 1 a los explantes vivos y 0 a los explantes muertos.

Para el porcentaje de oxidación la evaluación se realizó según el nivel de oxidación del medio de cultivo (0=5%, 1= 30%, 2=60%, 3=90% y 4=100%) y para la variable número de brotes la evaluación se realizó contando los brotes obtenidos por explante (yema).

2.7 Control de la oxidación mediante modificación del potencial redox

En esta fase se evaluaron soluciones antioxidantes filtradas, aplicándolas en forma de lavados antes de inocular los explantes al medio de cultivo.

Se midió el porcentaje de oxidación de los medios a los 30 días de iniciada la prueba. Se evaluaron cuatro tratamientos de lavado: de ácido cítrico 300 mg/L, ácido ascórbico 300 mg/L, cisteína HCl 4 g/L y en combinación ácido cítrico y ácido ascórbico 300 mg/L.

2.8 Control de la oxidación mediante modificación del medio de cultivo

También se realizaron pruebas cambiando la composición del medio de cultivo como se indico anteriormente evaluándose el efecto de la disminución de N, K, Fe y sacarosa versus el medio de cultivo con las concentraciones normales. Se midió el porcentaje de oxidación de los medios de cultivo y la sobrevivencia a los 30 días de iniciada la prueba.

2.9 Control de oxidación mediante manipulación

Otra alternativa que se empleó para el control de la oxidación en la fase de establecimiento fue la manipulación del explante, que consistió en determinar el efecto de la eliminación de todos los primordios foliares de las yemas antes de la inoculación. Se midió el porcentaje de oxidación de los medios de cultivo y la sobrevivencia a los 30 días de iniciada la prueba.

2.10 Condiciones del cultivo

Para la fase de establecimiento la temperatura promedio del cuarto de incubación fue 24°C, con una humedad relativa de 53%, inicialmente el material estuvo con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 oscuridad controlado por un temporizador automático y con una intensidad de luz de 1200 lux.

2.11 Fase de multiplicación

En la fase de multiplicación se usaron los explantes que lograron establecerse, evaluando diferentes concentraciones de BAP, GA₃ y AIB, para la inducción de brotes, generando 4 tratamientos (Tabla 1).

La relación que se mantiene entre los reguladores de crecimiento es importante para los procesos morfogénicos, de esta forma se pretende determinar si existe alguna influencia sobre las combinaciones de citoquininas, giberelinas y auxinas, en la inducción de brotes de las yemas establecidas. Los datos para esta fase fueron tomados a los 40 días de iniciada esta fase.

El medio de cultivo que se utilizó en esta fase fue el mismo medio de cultivo de Chu *et al.*, (1975) con las vitaminas de Kao y Michayluk (1975), solo se modificó las concentración de Nitrógeno, Potasio, mientras que la concentración de FeSO₄ fue normal y de sacarosa 30 g/L.

Para la fase de multiplicación la temperatura promedio del cuarto de incubación fue 25°C, con una humedad relativa de 50%, con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 oscuridad controlado por un temporizador automático y con una intensidad de luz de 1500 lux.

2.12 Análisis estadístico

Con los datos obtenidos de oxidación, contaminación y sobrevivencia se realizó la prueba de χ^2 (chi-cuadrado) para determinar la asociación o independencia entre las variables. Para determinar diferencias entre los tratamientos de control de oxidación y multiplicación de brotes se usó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba a posteriori de tukey ($\alpha= 0.05$). La información se analizó empleando el programa estadístico SPSS 11.5.

Tabla 1. Tratamientos de la fase de multiplicación de brotes

Tratamientos	Reguladores de crecimiento		
	GA3	BAP	AIB
	mg/L	mg/L	mg/L
T1-B	1	1.5	0.5
T2-B	1.5	1	0.5
T3-B	1	1.5	0.5
T4-B	1.5	1	0.5

3 RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Desinfección del material vegetal

Al analizar los datos de los tratamientos de desinfección, no se encontró diferencias significativas ($\chi^2=10,15$; $p=0,25$) entre el tiempo de inmersión, la concentración de cloro y la contaminación, esto indica que las variables posiblemente son independientes con respecto a los tratamientos evaluados, aunque se puede diferenciar una tendencia; a mayor concentración de cloro y tiempo de inmersión menor contaminación y viceversa (Fig. 1 y 2).

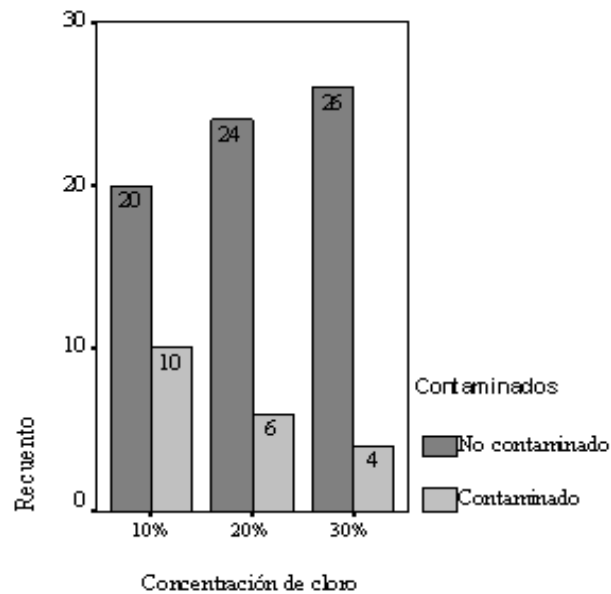


Figura 1. Frecuencia de contaminación de los explantes por cada nivel de concentración de cloro, evaluado a los 30 días.

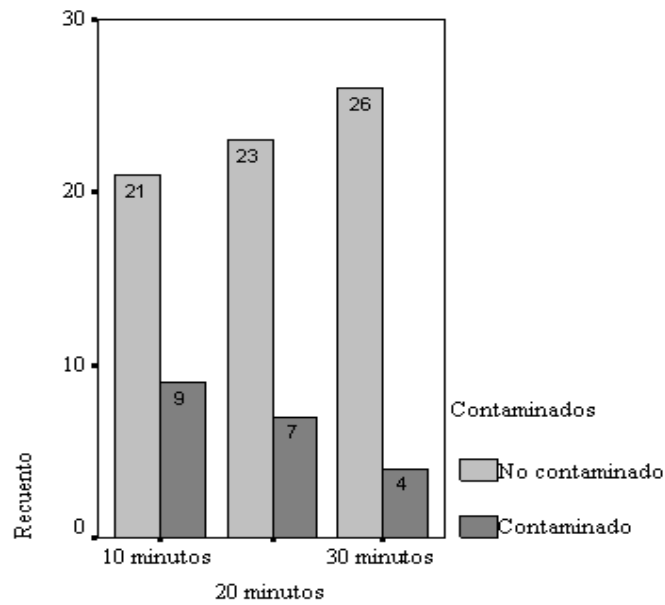


Figura 2. Frecuencia de contaminación de los explantes por cada tiempo de inmersión, evaluado a los 30 días.

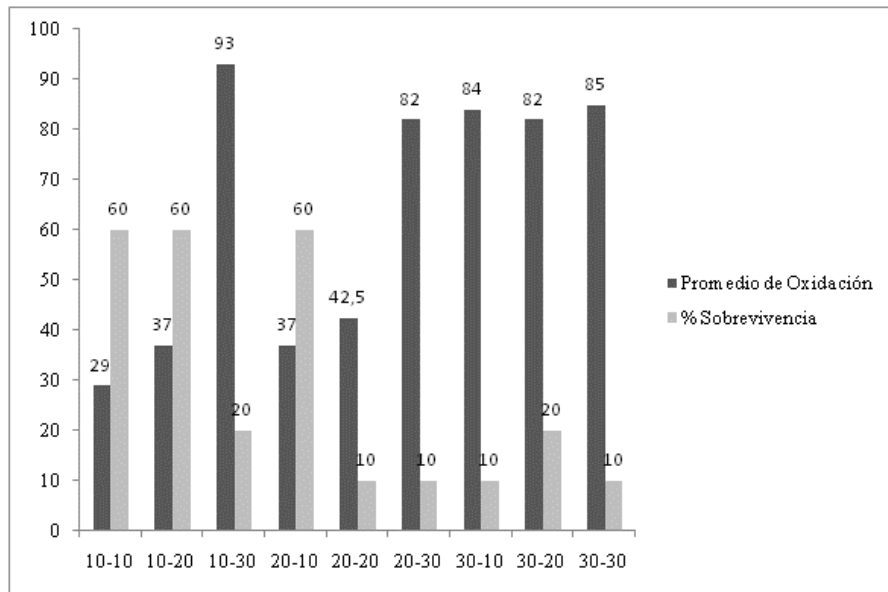


Figura 3. Porcentaje de sobrevivencia y promedios de oxidación de los nueve tratamientos de desinfección a los 30 días.

Al analizar el efecto de los tratamientos de desinfección sobre la sobrevivencia de los explantes se encontró diferencias significativas ($x^2=21,85$; $p=0,005$), por lo que es probable que la concentración de cloro y el tiempo de inmersión influyan sobre la sobrevivencia de los explantes (Pedroza, 2007). Como se puede apreciar en la Figura 3 a menor concentración de cloro y tiempo de inmersión, hay mayor sobrevivencia de los explantes, siendo los tratamientos (tiempo-cloro) 10-10, 10-20, 20-10, los que presentan mayor porcentaje de sobrevivencia (60%).

Un factor a tomar en cuenta es la pubescencia del tejido (Villalobos & Pérez, citado por Sánchez *et al.*, 2004), si el tejido es pubescente, debe hacerse un prelavado con detergente o etanol al 70% durante 30 s para romper la tensión superficial y permitir que la superficie sea más accesible a la acción de los agentes desinfectantes. Por esta razón, después del lavado con el detergente se sumergió el tejido en alcohol al 70% por un minuto a los explantes de *P. microphylla*.

Los métodos de desinfección utilizados no siempre eliminan las poblaciones de bacterias asociadas a los tejidos de las plantas *in vivo*; muchas son capaces de permanecer latentes en el interior de las células, en los espacios intercelulares o en los haces conductores quedando protegidas, de esta manera, de los agentes químicos. Esto podría explicar los resultados obtenidos en cuanto a la dificultad de eliminar por completo la contaminación (Vega *et al.*, 2007).

De acuerdo al ANOVA se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de oxidación entre los 9 tratamientos de desinfección ($F=15,23$; $gl=8$; $p=0,00012$). Al realizar la prueba de Tukey y las comparaciones múltiples se determinaron dos grupos de significancia (Tabla 2) siendo los tratamientos (tiempo-cloro) 10-10, 10-20, 20-10 y 20-20 los que presentaron menores niveles de oxidación (Fig. 4). Esto es el resultado de emplear bajas concentraciones de cloro (10% y 20%) y bajos tiempos de inmersión (10 y 20 min.) que permiten disminuir el estrés fisiológico y con esto una disminución de la oxidación fenólica y un aumento de la sobrevivencia del tejido (Sánchez & Salaverría, 2004).

Tabla 2. Subconjuntos homogéneos para los 9 tratamientos de desinfección evaluando la variable dependiente oxidación.

Tiempo-Cloro	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
10-10 T ₁	10	a	1,90
10-20 T ₄	10	a	2,20
20-10 T ₂	10	a	2,20
20-20 T ₅	10	a	2,40
20-30 T ₈	10		b 3,80
10-30 T ₇	10		b 4,00
30-20 T ₆	10		b 4,00
30-30 T ₉	10		b 4,10
30-10 T ₃	10		b 4,30
Sig.		,902	,902

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

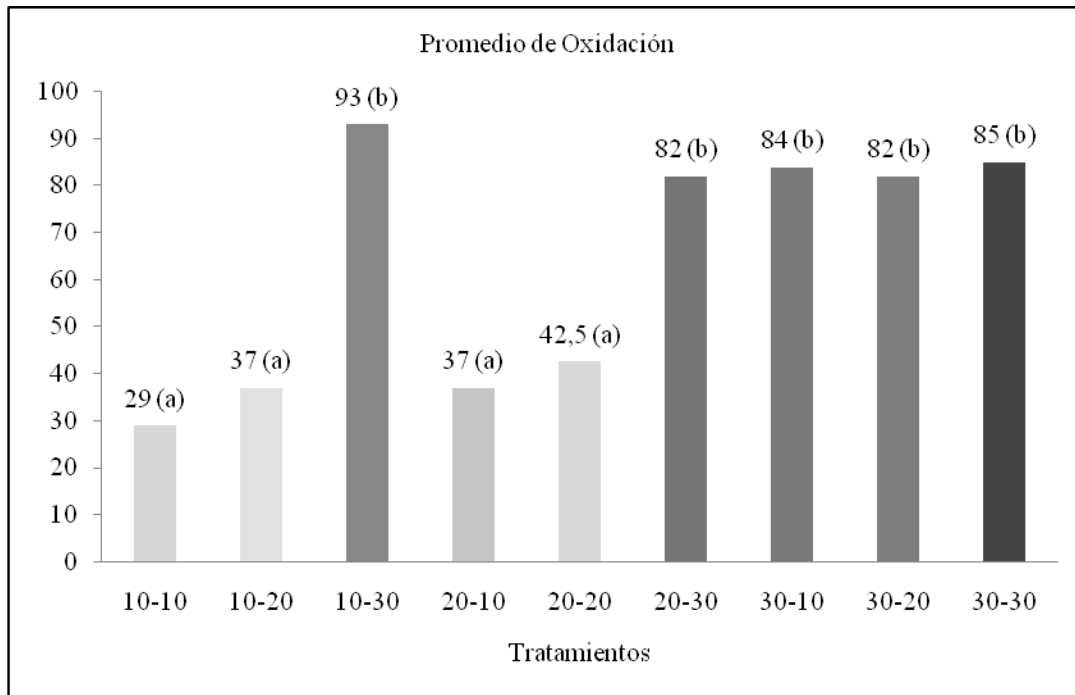


Figura 4. Porcentaje de oxidación en los 9 tratamientos de desinfección, se muestran los grupos de significancia, (a) muestran menores promedios de oxidación, (b) presentan mayores promedios de oxidación.

Al realizar una prueba de chi-cuadro entre la sobrevivencia, la oxidación y los tratamientos de desinfección (Tabla 3), se encontró diferencias significativas ($\chi^2=57,67$; $p=0,004$), ($\chi^2=53,73$; $p=0,009$), lo que posiblemente indica que existe asociación entre las variables, por lo tanto los tratamientos de desinfección muy agresivos (altas concentraciones y tiempos de inmersión muy prolongados), pueden inducir mayor oxidación fenólica, mayor toxicidad y con esto menor sobrevivencia (Pierik, 1990).

Se encontraron diferencias significativas en el número de brotes entre los tratamientos de desinfección ($F= 4,69$; $gl= 8$; $p= 0,0001$). Al realizar la prueba de Tukey y las comparaciones múltiples se determinaron tres grupos de significancia. Siendo los tratamientos 10-10, 10-20 y 20-10, los que presentaron un mejor estado de los explantes y con esto un mayor número de brotes con respecto a los otros tratamientos (Tabla 4).

Tabla 3. Prueba de chi-cuadrado, para sobrevivencia, nivel de oxidación y los 9 tratamientos de desinfección (tiempo-cloro).

Sobrevivencia		Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Muerto	Chi-cuadrado de Pearson	57,673(a)	32	0,004
	Razón de verosimilitud	66,178	32	0,000
	Asociación lineal por lineal	17,246	1	0,000
	N de casos válidos	64		
Vivo	Chi-cuadrado de Pearson	53,733(b)	32	0,009
	Razón de verosimilitud	45,625	32	0,056
	Asociación lineal por lineal	7,243	1	0,007
	N de casos válidos	26		

Tabla 4. Rangos de significancia para la variable número de brotes

Tratamientos		Promedio	Rangos de Significancia	
Tiempo - cloro				
		1,3	a	
10-20	T ₄	1	a	b
10-10	T ₁	0,8	a	b
20-10	T ₂	0,2		b c
30-10	T ₃	0,2		b c
10-30	T ₇	0,1		b c
30-30	T ₉	0,1		b c
20-30	T ₈	0,1		b c
20-20	T ₅	0		c
30-20	T ₆			c

A medida que se incrementan las concentraciones del hipoclorito de sodio, aunque el control de los agentes infecciosos es muy bueno, las condiciones fisiológicas de los explantes son fuertemente

alteradas, generando la necrosis y la muerte de los tejidos cultivados (Pedroza *et al.*, 2007), por esta razón para determinar el mejor método de desinfección se debe tomar no solo en cuenta el tratamiento que menos contaminación tiene, sino, el que permite mayor sobrevivencia con menor contaminación (Sánchez & Salaverría, 2004).

3.2 Control de oxidación

En el proceso de aislamiento, desinfección e inoculación en el medio de cultivo siempre se generan en mayor o menor medida situaciones de estrés, provocando la estimulación del metabolismo de los compuestos fenólicos y la exudación al medio de cultivo de estos productos (Pedroza *et al.*, 2007)

3.3 Modificación del potencial Redox

Para el control de oxidación mediante una modificación del potencial redox, se evaluaron 4 tratamientos con soluciones antioxidantes, los niveles más bajos de oxidación se los pudo obtener con cisteína 4 g/L, permitiendo también mayor sobrevivencia del tejido vegetal (Fig. 5).

Se encontró diferencias significativas en el promedio de oxidación entre los tratamientos de lavado ($F= 7,17$; $gl= 2$; $p= 0,00067$), por lo tanto es probable que los antioxidantes empleados en el lavado pueden actuar de diferente forma para el control de la oxidación. Las concentraciones de los antioxidantes (ácido cítrico y ácido ascórbico) posiblemente no fueron las adecuadas, debido a que solo la cisteína permitió controlar la oxidación (Gómez *et al.*, 1995).

La cisteína, de acuerdo con George y Sherrington (citado en Sánchez *et al.*, 2004), no previene la oxidación, sino que actúa en la rápida remoción de cualquier quinona que se forma. Además, como es un aminoácido, pudo haber inducido un rápido desarrollo de los explantes al ofrecer nitrógeno orgánico, rápidamente biodisponible, para suplir sus requerimientos.

3.4 Modificación del medio de cultivo.

Se encontró diferencias significativas en el promedio de oxidación entre los dos tratamientos, ($F= 14,91$; $gl= 1$; $p=0,00060$), siendo el mejor, el medio de Chu *et al.*, (1975) modificado con un promedio de oxidación de 24,4 (Fig. 6).

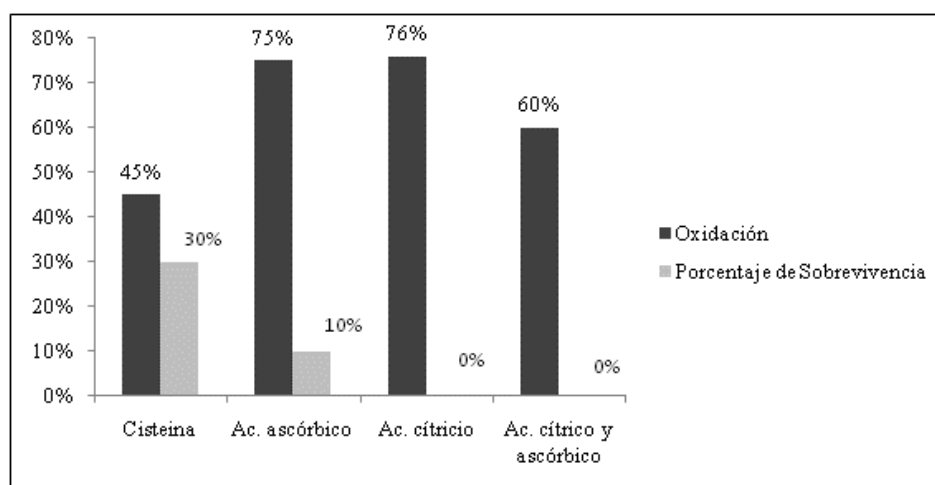


Figura 5. Porcentaje de oxidación y sobrevivencia en los 4 tratamientos de lavado en la fase de establecimiento.

Para el control de la oxidación mediante la modificación de la concentración de nutrientes, al disminuir el nitrógeno, potasio, FeSO_4 y sacarosa, se logró minimizar la síntesis de polifenoles y oxidación fenólica, permitiendo una mayor sobrevivencia de los tejidos y formación de brotes (Batista, 1999).

La modificación del medio, disminuyendo sales, es una forma muy efectiva de controlar la oxidación, ya que se disminuye el estrés fisiológico generado por el potencial osmótico y salino. Y de esta forma se previene la estimulación del metabolismo de los compuestos fenólicos y la exudación al medio de cultivo de estos productos (Batista, 1999; Pedroza *et al.*, 2007).

Los carbohidratos son necesarios para la biosíntesis de polifenoles, de esta forma una reducción de la concentración de sacarosa también contribuye a disminuir la biosíntesis de polifenoles (Batista, 1999).

3.5 Control de oxidación mediante manipulación

Se encontró diferencias significativas en el porcentaje de oxidación entre los dos tratamientos de manipulación ($F=20,84$; $gl=1$; $p=0,0002$). Estos resultados (Fig. 7) se los obtuvieron en el medio Chu *et al.*, (1975) modificado, obteniéndose un 94,4 % de sobrevivencia al eliminar los primordios, con un promedio de 33,33 % de oxidación del medio.

La oxidación fenólica provoca un fenómeno de ennegrecimiento que ocurre por acción de enzimas tipo polifenoloxidasas y tirosinasas que se liberan o sintetizan cuando los tejidos sufren heridas (Ramírez, citado por Villegas *et al.*, 2008).

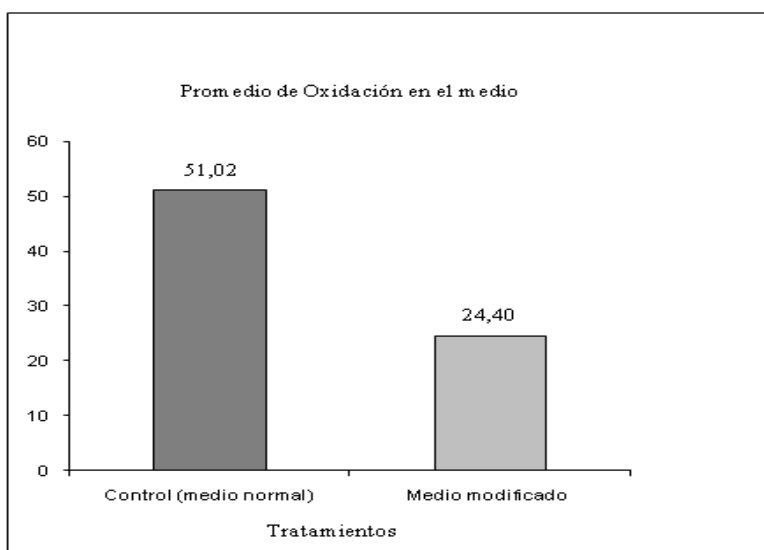


Figura 6. Promedios de oxidación la usar el medio modificado y el medio normal (control) en la fase de establecimiento.

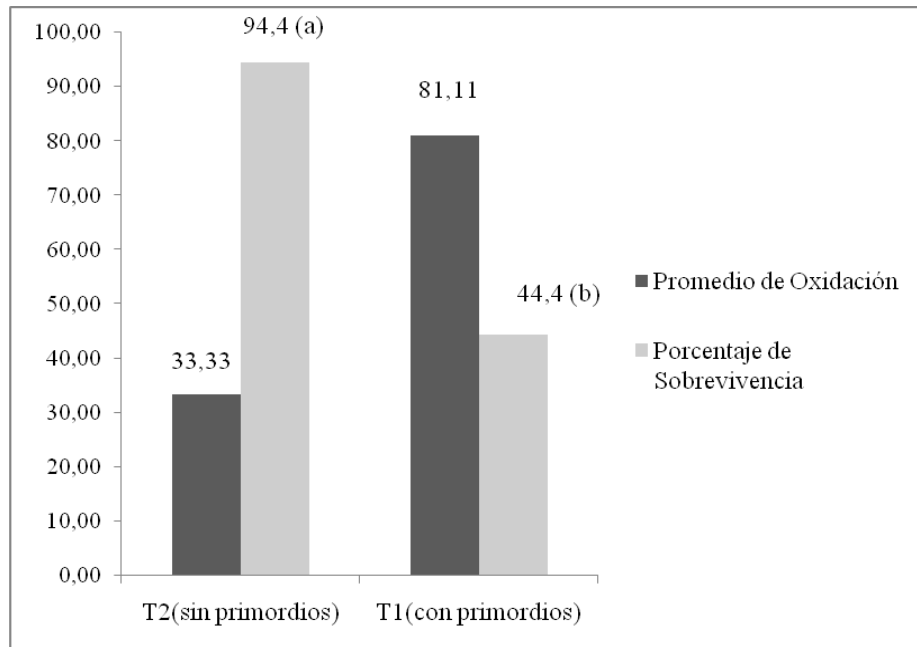


Figura 7. Promedios de oxidación y porcentaje de supervivencia en los tratamientos de manipulación del explante.

La oxidación impide que las células del explante sintetizen algunas proteínas, que al no elaborarse, afectan la formación de estructuras y el crecimiento de las vitroplantas (Quintero *et al.*, 2003). Por lo tanto la eliminación de los primordios foliares permite minimizar la oxidación fenólica ya que al eliminar el tejido más expuesto a los agentes químicos, se está eliminando el tejido que mayor estrés y daños fisiológicos ha tenido en todo el proceso (López, 2002).

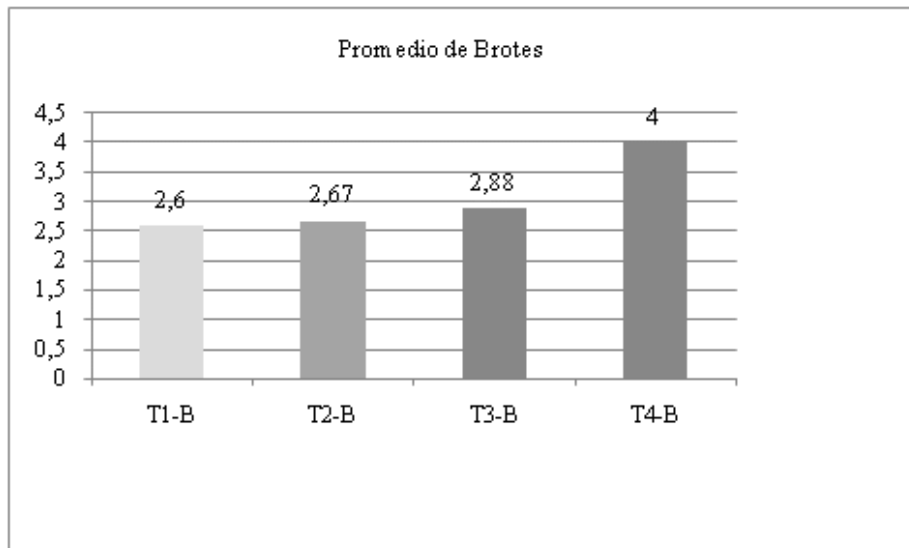


Figura 8. Promedios de brotes por explante en la fase de multiplicación, a los 40 días.

3.6 Fase de multiplicación

No se encontró diferencias significativas en el número de brotes entre los cuatro tratamientos evaluados ($F= 0,47$; $gl= 3$; $p=0,71$). Estadísticamente los tratamientos fueron iguales, aunque los datos del promedio de brotes en la Figura 8 son diferentes, en el tratamiento (T_4-B) con las concentraciones de 1,5 mg/L de BAP, 1,5 mg/L de GA_3 y 0,5 mg/L de AIB se observó un mayor número de brotes, con un promedio de 4 brotes por explante a los 40 días de iniciada la fase de multiplicación.

Se empleó ácido giberélico ya que permite incrementar tanto la división como la elongación celular, debido a que tras la aplicación de giberelinas se incrementa el número de células y la longitud de las mismas (Pierik, 1990; Roca & Mroginski, 1991). Además, de los efectos sinérgicos entre las giberelinas, con las auxinas y citoquininas *in vitro* (Alemán, 2000).

Esta proliferación de brotes se logró con la adición de una mayor concentración de citoquinina (BAP) al medio de cultivo que permite romper la dominancia apical y estimular la brotación de las yemas. Este balance hormonal, con mayor concentración de citoquininas y menor de auxinas es determinante en el coeficiente de multiplicación (Alemán, 2000; Pierik, 1990; Roca & Mroginski, 1991).

4 CONCLUSIONES

- En base a los valores promedio de los coeficientes de similaridad se concluyó que la población *P. incana* de Papallacta presenta una diversidad genética menor a la población de *P. pauta* analizada.
- Los individuos dentro de las poblaciones presentan una alta similaridad genética. El valor de diversidad genética aumentó notablemente al considerar las interacciones entre todos los individuos de las tres poblaciones, y no únicamente las relaciones entre individuos de las mismas poblaciones. Este fenómeno se presenta como un indicador de que está ocurriendo un problema de fragmentación de hábitat debido a que existen indicios de divergencia genética entre las poblaciones, pero disminuye la disimilaridad de los individuos dentro de ellas mostrando que dentro de las poblaciones se están dando procesos como deriva génica. La causa de esto puede estar basada en la distribución discontinua que se observa en *Polylepis* formando parches.
- Los valores de diversidad genética no sustentaron de una manera notoria que las poblaciones más aisladas de *P. incana* presentan menor diversidad genética que las menos aisladas, esto se dio básicamente al no poder considerar de manera certera a ciertas localizaciones como poblaciones centrales. Mientras que en el caso de *P. pauta* si se observó cierta tendencia en la que los individuos de la localización considerada como central presenten una diversidad genética ligeramente mayor a la de los individuos de las partes periféricas del bosque.

5 RECOMENDACIONES

- Es necesario evaluar otras concentraciones de reguladores de crecimiento en la fase de multiplicación de *P. microphylla* para poder optimizar el balance hormonal de esta técnica.
- En futuras investigaciones, recomiendo emplear el medio N6 modificado, debido a su efectividad para prevenir y minimizar la oxidación fenólica, además se podrían evaluar otros medios de cultivo como el TL (Tremblay & Lalonde 1984) y el medio de McCown & Lloyd (1980), en las fases de multiplicación y enraizamiento. Y se recomienda que continúen estudios sobre esta especie debido a su importancia en el ecosistema andino.
- En futuras investigaciones, recomiendo realizar la eliminación de primordios foliares de las yemas y la modificación del medio de cultivo ya que son muy efectivos para prevenir la

oxidación, además se podría realizar más pruebas con otros antioxidantes como el PVP y aminoácidos como la glutamina, arginina y la aspargina para minimizar aún más este efecto fitotóxico. Además, de estudiar el efecto de la época de recolección de muestras (invierno o verano), porque esto permite disminuir la contaminación y la oxidación del material vegetal.

6 AGRADECIMIENTOS

A la Escuela Politécnica del Ejército, Carrera de Ingeniería en Biotecnología por el apoyo para el desarrollo de este trabajo de investigación. A la PhD Katya Romoleroux, curadora del Herbario de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, por su colaboración en la ubicación geográfica e identificación taxonómica de la especie.

7 REFERENCIAS

1. Alemán, S. (2000). Organización y técnicas de cultivo de células y tejidos (cap. 3). Extraído el 10 de Septiembre, 2006, del sitio Web de la Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos, Cuba: <http://agroweb.umcc.cu/PaginasProfesores/Silvia%20PAG%20WEB%20BIOTECNOLOGÍA/silvia2/Página%20de%20la%20portada/Página%20tema%20III.htm>.
2. Asociación Ecosistemas Andinos. (2005). Evaluación de la biodiversidad de los Bosques de *Polylepis* del Corredor de Conchucos – Huaraz. Perú: Conservación Internacional.
3. Batista, J. (1999). Limitações ao processo de cultivo in vitro de espécies lenhosas. Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnología
4. Echenique, V., Rubistein, C., & Mroginski, L., (2004), Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Argentina: INTA
5. Fjeldsa J. (1993). The avifauna of the *Polylepis* woodlands of the Andean highlands: the efficiency of basing conservation priorities on patterns of endemism, *Bird Conservation International*, 3, 37--55
6. Gómez, R., Gerth, R., Freire, M., Blanca Pérez, S., & Herrera, I., (1995) Obtención de callos y regeneración de plantas en diferentes clones de plátano y banano. *Agronomía Trop*, 54(2), 233-246.
7. Jameson, S. J., & Ramsay, P. R. (2007). Changes in high-altitude *Polylepis* forest cover and quality in the Cordillera de Vilcanota, Peru 1956-2005. *Biological Conservation* 138, 38-46.
8. Kessler, M. (2006). Bosques de *Polylepis*. *Botánica económica de los andes centrales*, 110-120
9. López C, 2002, Reacciones de hipersensibilidad en plantas cultivadas in vitro, [online], www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS26/26reacciones.htm/ Margara, J. 1988. Multiplicación Vegetativa in vitro: los meristemos y la organogénesis. España: Ediciones Mundi-Prensa.
10. Pedroza, A., González, S., & Téllez, D., (2007), Micropropagation of *Dodonea viscosa* (L) Jacq: an endangered plant. *Biotecnol*, 9(2), 33-44.
11. Pierik, R. (1990), Cultivo in vitro de las plantas superiores (L. M. S, Ayerbe, Trad.). España: Mundi-Prensa
12. Quezada, P. J., & Rocabado, K. P. (2005). Inducción del enraizamiento in vitro de brotes caulinares de *Polylepis racemosa* a través del manejo de la concentración de ácido indol acético (AIA) y sacarosa. *Biofarbo*, 8, 83-86.
13. Quintero, I., Polo, J., Jarma, A., & Espitia, A. (2003) In vitro rooting of *Dioscoreas* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5 (2), 51-56
14. Renison, D. & Cingolani, A. (2002). Evaluation of *Polylepis australis* (Rosaceae) seedling survival and growth to choose seeding plants. *Agriscientia*, 24, 63-66.
15. Roca, W. & Mroginski, L. (1991). Cultivo de tejidos en la Agricultura, *Fundamentos y Aplicaciones Colombia: CIAT*
16. Romoleroux, K. (1989). Estudio taxonómico de los géneros *Polylepis* *Hesperomeles* (Rosaceae), *Escallonia* (Grosseclariaceae) y *Columellia* (Columelliaceae) en el Bosque Montaña Ecuatoriano, Tesis previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Biológicas.
17. Sánchez, M., & Salaverría, J., (2004) Control of oxidation and contamination of strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) cultivated in vitro. *Revista UDO Agrícola* 4 (1), 21-26
18. Vega, K. C., Bermejo, F. J., Villegas, A. G., Quezada, P. J., Aguilar, Ll. M., & Conde V. E., (2007). Massive propagation of *Polylepis tomentella* Weddell ssp. *Nana* through in vitro culture techniques. *Ecología en Bolivia*, 42(2), 102-120.
19. Villegas, Z., Giménez, C., Vélchez, J., Moreno, M., Sandoval, L., & Colmenares, M., (2008). Oxidation during the induction of somatic embryogenesis with immature male flowers of Grand Nain (*Musa AAA*). *Fac. Agron. (LUZ)*. 25, 570-588.

Evaluación de Protocolos de Enrutamiento usados en las Redes Móviles AdHoc (MANET), utilizando el software Network Simulator NS2.

R.A. Lara

Coordinador del Centro de Investigaciones de Redes Ad Hoc, Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador

G. Olmedo

Director de la Carrera de Ing. en Electrónica y Telecomunicaciones, Escuela Politécnica de Ejército, Sangolquí, Ecuador

RESUMEN: En este artículo se estudia y evalúa mediante la herramienta de simulación *Network Simulator NS2*, los principales protocolos de enrutamiento utilizados sobre Redes Móviles AdHoc (MANET), en base a los parámetros de Tiempo de Convergencia y Sobrecarga de Paquetes de Enrutamiento.

ABSTRACT: This article present a study about the main routing protocols used in a Mobile Ad Hoc Network (MANET), using the simulation tool NETWORK SIMULATOR NS2, this study was based in parameters of time convergence and overcharge of routing packages.

INTRODUCCIÓN

Las Redes Móviles AdHoc (MANET) fueron creadas para proporcionar comunicación y ser implementadas de una manera rápida y eficiente, en lugares carentes de una infraestructura de red, puesto que son redes descentralizadas¹. Sin embargo, para que esto sea posible se hace necesaria la introducción en la red de protocolos de enrutamiento específicos, debido a que los protocolos tradicionales propios de redes fijas no se adaptan a este tipo de ambientes móviles [1].

PROTOCOLOS DE ENRUTAMIENTO

Básicamente los protocolos de enrutamiento se pueden clasificar en dos grandes grupos [2][3][4]:

Proactivos o basado en tablas y

Reactivos

o

sobre

demanda

Protocolos Proactivos

Son aquellos en los que los algoritmos mantienen en cada nodo información actualizada acerca de la topología de la red, la cual es almacenada en tablas de enrutamiento que son actualizadas de forma periódica u originada por eventos.

Este tipo de protocolos están basados en los protocolos de vector distancia y de estado de enlace.

Un protocolo característico dentro de este grupo es; DSDV (*Destination Sequenced Distance Vector*).

Protocolos Reactivos

Son aquellos en los cuales se usan algoritmos, donde solo se crean rutas únicamente cuando un nodo fuente desea enviar información hacia un nodo destino, utilizan mecanismos de Descubrimiento y Mantenimiento de Ruta.

El descubrimiento de Ruta es un procedimiento comienza con el envío de un paquete llamado petición de ruta RREQ (Route Request), que es enviado de modo broadcast a toda la red. En el caso de que un nodo recibiera este paquete y sea el destino o conozca la ruta hacia él, este enviará un paquete denominado petición de respuesta RREP (Route Reply) al nodo fuente con la información de ruta requerida.

El mantenimiento de Ruta consiste en un proceso únicamente se da durante el envío de datos y se origina cuando un nodo que se encuentra involucrado en la transmisión, detecta la pérdida del enlace, emitiendo un mensaje denominado error de ruta RERR (Route Error) al nodo que está originando la transmisión (nodo fuente), el cual al recibir este mensaje, buscará una ruta alterna que pueda tener almacenada o comenzará un nuevo proceso de descubrimiento de ruta. Los nodos intermedios que reciban el mensaje RERR eliminar la ruta con problemas de su registro o tabla de enrutamiento según sea el caso.

Los protocolos reactivos a su vez se pueden clasificar en:

Basados en la fuente, este tipo de protocolos los paquetes de datos transportan la ruta completa de la fuente al destino.

Los protocolos basados en el concepto de salto a salto, únicamente llevan en la cabecera de los paquetes de datos la dirección del destino y la dirección del próximo salto.

Dentro de los protocolos reactivos los principales son:

DSR (Dynamic Source Routing).

AODV (Ad-Hoc On-Demand Distance Vector).

DSDV

En este protocolo los paquetes de señalización son intercambiados entre nodos vecinos a intervalos regulares de tiempo o emitidos por eventos.

DSDV [1][2] proporciona básicamente la obtención de rutas sin bucles mediante la introducción de números de secuencia, suministrando una sola ruta para cada destino, siendo esta la ruta con la trayectoria más corta posible.

Este protocolo utiliza dos tipos de mensajes de señalización.

Full dump: Este tipo de mensajes envía toda la información contenida en la tabla de enrutamiento de cada nodo. El uso de este tipo de mensaje es reducido y se dan cuando existen grandes cambios en la topología de red.

Incremental: Este tipo de mensaje es enviado con mayor frecuencia debido a que transporta únicamente la información contenida en la tabla de enrutamiento de un nodo que ha variado desde

que el último paquete *full dump* fue enviado. Este tipo de mensaje optimiza el uso de ancho de banda debido a que no es enviado de forma periódica con información de las tablas de enrutamiento enteras.

DSR

DSR [2] es un protocolo reactivo basado en la fuente, esencialmente crea las rutas únicamente en el caso de que un nodo fuente necesite enviar datos hacia un nodo destino (Descubrimiento de Ruta). Se diseñó para optimizar el uso del ancho de banda dentro de una red AdHoc, al eliminar los mensajes de actualización periódica que usan los protocolos proactivos. Previene los lazos de enrutamiento a través del identificador de RREQ (*Route Request*).

Este protocolo hace que los nodos no posean una tabla de enrutamiento, debido a que la ruta viaja en el paquete de datos, y solo mantiene un registro de rutas.

Cada nodo asocia un temporizador a la ruta con el fin de poderla eliminar en el caso de que esté inactiva por un cierto periodo tiempo.

Mediante un único proceso de descubrimiento de ruta, el nodo origen puede aprender varias formas de llegar hacia el mismo destino (uso de múltiples rutas).

Los nodos poseen una función denominada “Promiscuous Listening” que permite recibir y procesar paquetes de datos o de información a nivel de capa 2 que no estén dirigidos particularmente a ellos, con el fin de que los nodos pueden actualizar las rutas almacenadas en su registro con la información contenida en estos paquetes.

Utiliza el proceso de Mantenimiento de Ruta en el caso de ocurrir algún problema en la comunicación entre nodos durante la transmisión de datos.

AODV

Es un protocolo reactivo salto a salto y establece rutas bajo demanda, es decir, no mantiene actualizaciones periódicas entre nodos, sino que descubre y mantiene rutas solamente cuando son necesarias, a través de los procesos de Descubrimiento y Mantenimiento de Ruta. La característica principal de AODV [5][6] es el uso de tablas de enrutamiento en cada nodo para de esta manera evitar transportar las rutas en los paquetes de datos.

Utiliza números de secuencia para evitar los lazos de enrutamiento que pudieran darse.

Además, cada cierto intervalo de tiempo se envían paquetes Hello2 a los vecinos para informarles que el nodo sigue activo, de esta forma los vecinos actualizan los temporizadores asociados a dicho nodo o en su defecto, deshabilitan las rutas que utilicen el nodo suprimido.

Una particularidad de AODV es la reparación a nivel local de un enlace caído que forma parte de una ruta activa. En este caso, el nodo que detecta la caída de un enlace que está siendo utilizado, procede a intentar repararlo comenzando un proceso de descubrimiento de ruta hacia el destino y encola los paquetes de datos recibidos para el destino, hasta localizar una nueva ruta.

En el caso de que este intento resulte fallido, se dará lugar al proceso normalmente establecido, con el envío del mensaje de error RERR hacia el nodo origen.

SIMULACIÓN

Para la simulación fue utilizado Network Simulator [7][8][9][10], el cual puede ser ejecutado sobre Windows o Linux, para este artículo, NS fue ejecutado sobre Cygwin el cual emula un ambiente de Linux sobre Windows, este emulador puede ser conseguido en la página www.cygwin.com[11] o directamente puede ser descargado conjuntamente con NS2 versión 2.27 de la página http://140.116.72.80/~smallko/ns2/video/setup_video.htm [12].

Se evaluó mediante simulación a los protocolos: AODV, DSR y DSDV, que son los más representativos y difundidos dentro de las MANETs, además de encontrarse por defecto en NS2.

Las simulaciones se realizaron usando transmisión de paquetes FTP mediante una conexión TCP y emulando un ambiente de radio propagación lo más real posible a través del modelo *Shadowing*. El análisis de los protocolos de enrutamiento se realizó en base a dos parámetros principales:

Tiempo de convergencia y,

Cantidad de paquetes de enrutamiento introducidos a la red.

Se observó el comportamiento de los protocolos sobre tres topologías de red, las que fueron llamadas etapas de simulación. La primera etapa se ejecuta modificando el número de nodos de la red desde 2 hasta 7 nodos, esforzando a los protocolos a encontrar una ruta a través de todos los nodos intermedios, la segunda etapa se ejecuto en una red poblada de 15 y 50 nodos y por último se recreó una red con movilidad de 5 nodos.

RESULTADOS OBTENIDOS

Primera Etapa

En esta etapa de la simulación los resultados obtenidos son congruentes con la teoría, ya que por ejemplo observamos la naturaleza proactiva de DSDV que actualiza la información de las rutas mediante el intercambio de las tablas de enrutamiento entre los nodos vecinos a intervalos regulares, por lo que este protocolo obtiene una respuesta más lenta en la convergencia de la red como lo observado en la Figura 1 y Figura 2 en relación a los protocolos de naturaleza reactiva como lo son AODV y DSR que por el contrario, la respuesta presentada para la obtención de una ruta es rápida ya que estos protocolos trabajan sobre demanda, proporcionando una alta convergencia a las redes con movilidad.

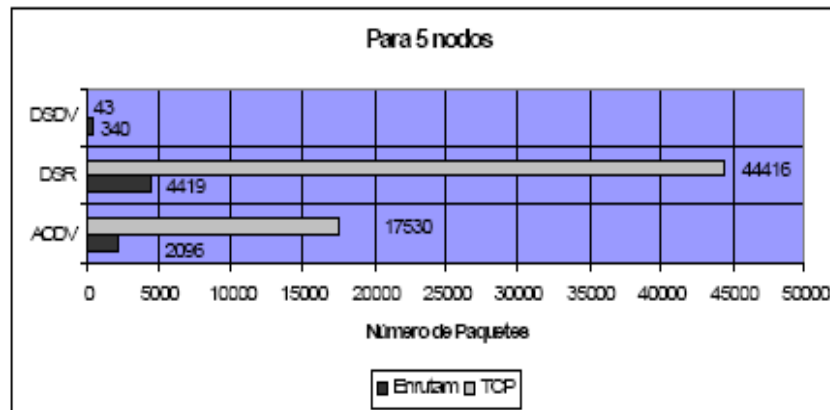


Figura 1. Paquetes de enrutamiento vs. TCP (1ra. Etapa)

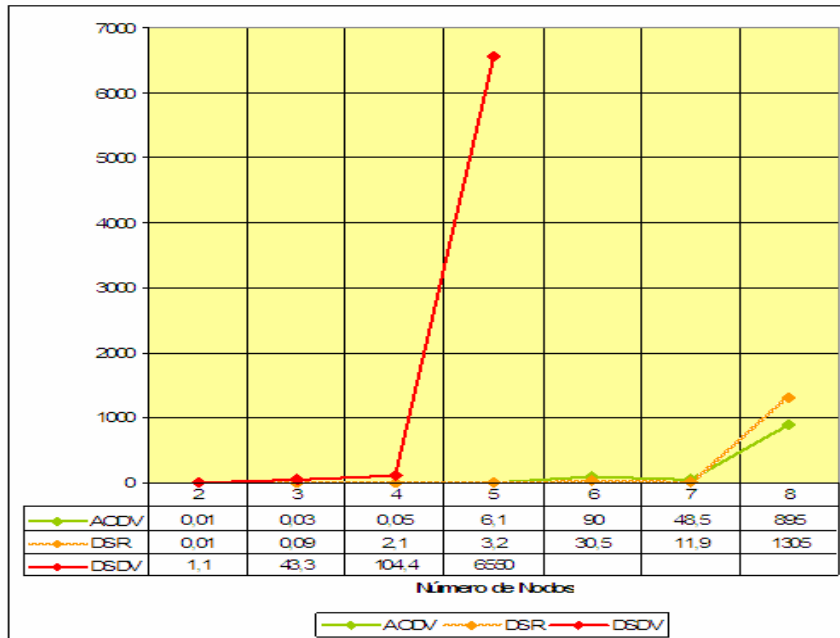


Figura 2. Tiempo de convergencia en segundos (1 Etapa)

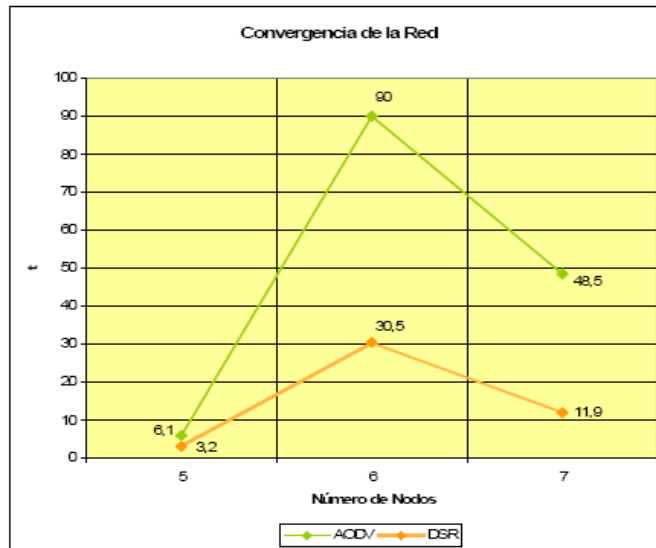


Figura 3. Tiempo de convergencia en segundos (1 Etapa)

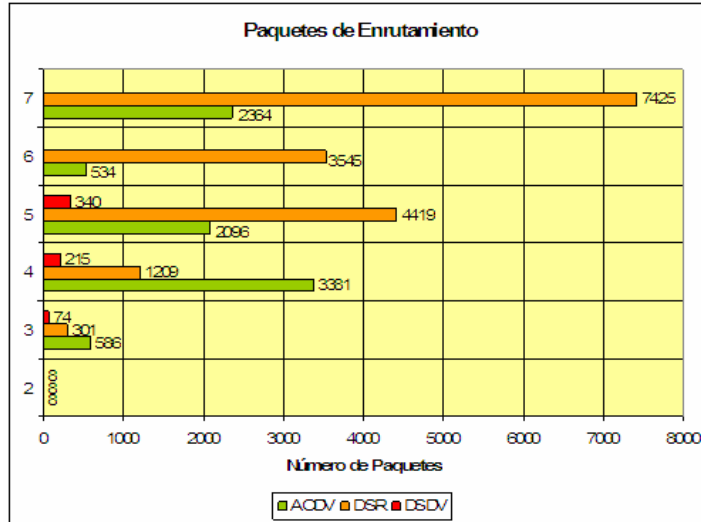


Figura 4. Paquetes de enrutamiento (1ra. Etapa)

En la Figura 3 se observa particularmente el comportamiento de AODV y DSR, los cuales presentan conductas similares en relación al tiempo que se demoran en el descubrimiento de una ruta.

La Figura 1 y la Figura 2 muestran que DSDV comienza a presentar una pobre respuesta en relación al tiempo de convergencia a partir de “tres saltos” entre el nodo emisor y el nodo receptor, mientras que AODV y DSR presenta esta deficiencia a partir de los “seis saltos” como lo mostrado en la Figura 1.

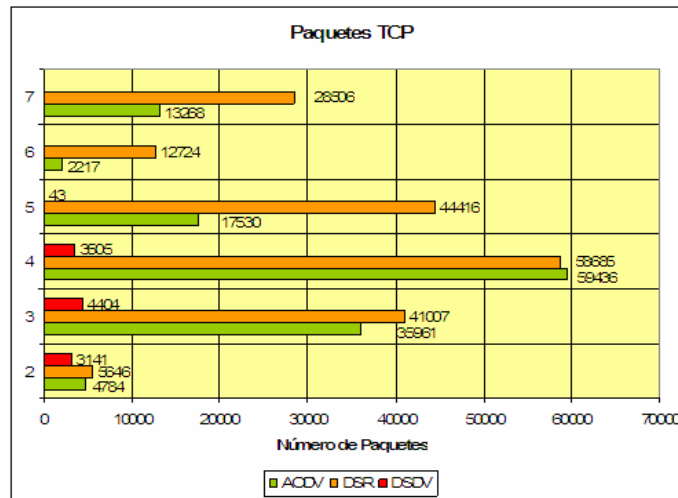


Figura 5. Paquetes TCP (1ra. Etapa)

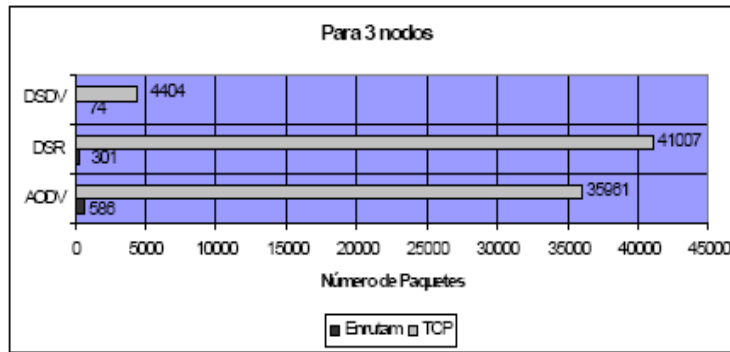


Figura 6. De enrutamiento vs. TCP (1ra. Etapa)

En la Figura 4 se observa que el número de paquetes de enrutamiento incrementa de acuerdo al número de nodos que presenta la red, lo cual es lógico debido a que para que la ruta sea descubierta, el intercambio tanto de las tablas de enrutamiento como de los paquetes de petición de ruta y replica de ruta es generado por un mayor número de nodos, además observamos que en los protocolos reactivos, mientras más rápido se descubre la ruta más son los paquetes de enrutamiento generados por este, por lo que el tiempo de convergencia depende del número de paquetes de señalización utilizados, sacrificando de esta manera el ancho de banda a costa de conseguir una convergencia más rápida de la red.

La Figura 5 indica que los protocolos AODV y DSR siguen teniendo mejor rendimiento que el protocolo proactivo DSDV, especialmente si hablamos de DSR, que proporciona un mayor número de paquetes TCP en relación a los paquetes de señalización generados, debido también, a que descubre la ruta más rápido, poseyendo mayor tiempo en la simulación para la transmisión de los paquetes de datos.

Cabe mencionar que la falta de datos observada a partir de los 6 nodos en las figuras presentadas en relación a DSDV, se da debido a que este protocolo presenta una pobre respuesta en la convergencia de la red a partir de los 3 saltos de distancia entre el nodo emisor y receptor, lo cual no es viable en este tipo de topologías de alta movilidad.

La Figura 6 y la Figura 1 muestran la relación existente entre los paquetes de enrutamiento generados por los diferentes protocolos vs. los paquetes TCP originados para el envío de datos, para 2 y 4 saltos de distancia entre el nodo fuente y el nodo destino.

Segunda Etapa

Basados en los datos obtenidos en la Figura 1, Figura 3 y Tabla 1, particularmente por DSR, observamos que el tiempo en que el protocolo encuentra una ruta en una topología de 50 nodos es similar al de una topología de 15 y de 6 nodos, esto se debe a que en una red altamente poblada el protocolo puede elegir entre más nodos, una mejor ruta con el menor número de saltos, a diferencia de una red pequeña, en la que por lo general la ruta elegida atraviesa la mayoría de los nodos, ocasionando un mayor número de saltos entre el nodo emisor y receptor.

La Figura 7 y Figura 8, muestra el comportamiento de los tres protocolos sobre una red de 15 y 50 nodos, donde podemos observar que, DSDV por tratarse de un protocolo proactivo, introduce mucha señalización en el intercambio de las tablas de enrutamiento con sus nodos vecinos, en relación al porcentaje de paquetes TCP generados, lo que ocasiona ineficiencia en la red.

AODV también introduce una gran cantidad de paquetes de enrutamiento para la búsqueda de una ruta, sin embargo el porcentaje es menor en relación a los paquetes TCP generados, debido a que se

trata de un protocolo reactivo. También podemos observar en la Tabla. 1. que AODV comienza a ser deficiente en el tiempo de convergencia de la red, con el aumento en el número de nodos.

Por último DSR permanece más estable ante los otros protocolos y es más eficiente en topologías grandes, ya que puede encontrar una ruta dentro de un tiempo aceptable para una red móvil, introduciendo sobrecarga moderada de señalización en relación a los paquetes TCP emitidos.

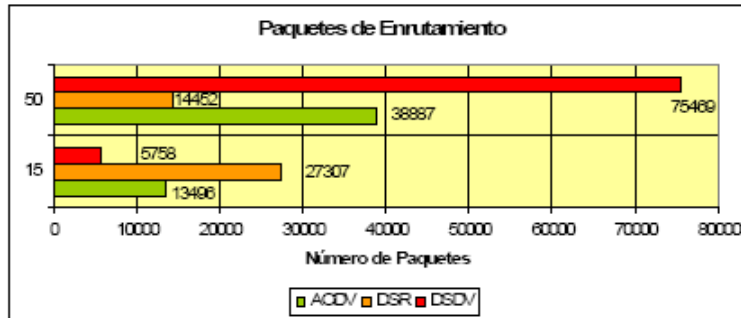


Figura 7. Paquetes de Enrutamiento (2 Etapa)

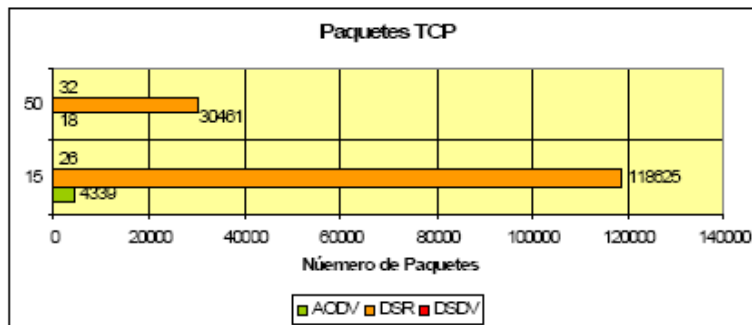


Figura 8. Paquetes de TCP (2 Etapa)



Figura 9. Paquetes que circulan en la red (3 Etapa)

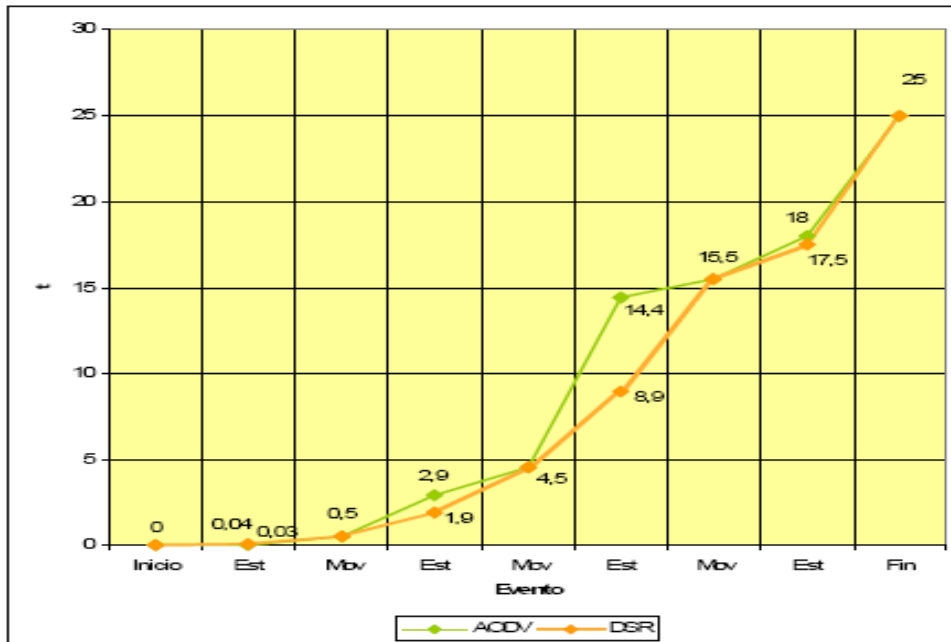


Figura 10. Tiempo de convergencia en segundos (3 Etapa)

Tabla 1. Tiempo de Convergencia.

Numero de Nodos	AODV	DSR
15	187,3s	18,5 s
50		19s

CONCLUSIONES

- El desempeño proporcionado por los protocolos reactivos es superior al presentado por los protocolos proactivos en base al tiempo de convergencia de la red y paquetes de enrutamiento introducidos.
- DSR es el protocolo que mejor rendimiento de los tres simulados. Presenta seis saltos de distancia, uso de múltiples rutas y desempeño satisfactorio en redes grandes.
- AODV es semejante a DSR, por lo que presenta las mismas respuestas ante la red a diferencia de no aceptar múltiples rutas, ocasionando bajo rendimiento en redes grandes, además de no presentar optimización de energía de los nodos, por no ser reactivo puro.
- DSDV a diferencia de los anteriores protocolos señalados, es un protocolo proactivo y presenta un bajo rendimiento ante topologías de red grandes y de alta movilidad, se obtuvo que el número de saltos máximo presentado es 3.
- Cabe mencionar que debido a que Network Simulator es un software de código abierto, puede ser modificado, al igual que los módulos de enrutamiento existentes en este simulador, lo que puede ocasionar que las respuestas presentadas por estos protocolos en la simulación de este artículo, puedan variar.

REFERENCIAS

1. Subiela,Roberto,Simulación de protocolos de encaminamiento en redes móviles adhoc con SN-2,30/04/2007.
2. Domingo,Mari,Diferenciación de servicios y mejora de la supervivencia en redes adhoc conectadas a redes fijas,2005.
3. Royer,Elizabeth,A Review of Current Routing Protocols for AdHoc Mobile Wireless Networks,30/04/2007.
4. Mohapatra,Prasant,Ad Hoc Networks Technologies and Protocols, Springer Science,Boston 2005.
5. Triviño,Javier,WALC 2004 Práctica 4 AODV,09/05/2007.
6. Guerrero,Manel,Securing and Enhancing Routing Protocols for Mobile AdHoc Networks,09/05/2007.
7. Tamer,Alan,Simulação de Redes de Computadores utilizando o Network Simulator,2004.
8. Fall,Kevin,The ns Manual (formerly ns Notes and Documentation),21/05/2007.
9. Herrera,Jose,NS2 - Network Simulator,12/05/2004
10. The Network Simulator, <http://www.isi.edu/nsnam/ns/index.html>,2005.
11. Cygwin, www.cygwin.com
12. Cygwin con NS versión 2.27, [http://140.116.72.80/~smallko/ns2/vid eo/setup_video.htm](http://140.116.72.80/~smallko/ns2/vid%20eo/setup_video.htm).

Genética poblacional de *Polylepis pauta* y *P. incana* en el Páramo de Papallacta

V. Ochoa, P. Jiménez & K. Proaño

Carrera de Ing. En Biotecnología, Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador

C. Segovia

Universidad de Florida, Gainesville, USA

RESUMEN: Actualmente los bosques de *Polylepis* están disminuyendo debido a diversas actividades antropogénicas. En los últimos años se han hecho ciertos esfuerzos para conservarlos, sin embargo, en las reforestaciones no se ha tomado en cuenta el estado del acervo genético de las poblaciones. El conocimiento de la estructura genética de las poblaciones con las interrelaciones geográficas, parámetros históricos y diferenciación genética provee invaluable información para la formulación de políticas de protección y administración, efectivas para especies en peligro. Por ello, en este estudio se buscó conocer la estructura genética poblacional de *Polylepis incana* y *P. pauta* en el páramo de Papallacta mediante ISSRs, para lo cual, se recolectaron muestras en Papallacta, se aisló ADN y se amplificaron secuencias ISSR con un set de 10 primers. Del análisis de los datos registrados se observó que la menor diversidad genética presentó *P. incana* y la población con mayor diversidad genética fue la de *P. pauta*. Todos los individuos se agruparon en la población a la que pertenecían.

ABSTRACT: At the present the *Polylepis* forests are decreasing by the cause of many different human activities. In the last few years there have been made some efforts to conserve these forests, however, many reforestations have not been doing without know the state of the genetic pool of these populations. The knowledge of the populations' genetic structure with the geographical relations, historical parameters and genetic differentiation gives good information to make administrative and protective politics for in danger species. By this fact, in this study we worked to find out the population genetic structure of *P. incana* and *P. pauta* in Papallacta with ISSRs. To reach this objective there were collected samples in Papallacta, their DNA was extracted and the ISSRs were amplified with a collection of 10 primers. From the data analyses we observed that *P. incana* has less genetic diversity than *P. pauta*. Each of the accessions cluster into the population that they belong.

1 INTRODUCCIÓN

Los bosques formados por árboles del género *Polylepis* son la vegetación natural de los Andes entre los 3500 a 5000 msnm (Kessler, 1995) y se encuentran formando parches entre los pajonales. Estos parches constituyen verdaderos oasis biológicos en los páramos al favorecer el desarrollo de mamíferos, aves, insectos, plantas medicinales, alimenticias (Kessler & Herzog, 1998). Los árboles de *Polylepis* favorecen también las precipitaciones y aumentan la humedad del aire. Los bosques de montaña en los Andes tienen la capacidad de captación de agua, la liberan gradualmente, lo cual permite que el agua sea filtrada a través de la vegetación y se prevenga la erosión (Bucher & Schofield, 1981). Lamentablemente, los bosques de *Polylepis* se están perdiendo debido a actividades antropogénicas, esto sucede porque los campesinos no comprenden el valor indirecto de estos bosques. Los habitantes de las zonas andinas utilizan la madera de *Polylepis* para la elaboración de carbón y como postes para cercas. Además, la cantidad de incendios en los páramos es alarmante y son provocados para la regeneración de los pastizales y como parte de ciertos rituales (Kessler y Driesch, 1994), con ello se ha dado lugar a la fragmentación de los bosques. La fragmentación impacta negativamente a las poblaciones de plantas al ocasionar una reducción de la variación genética y un incremento de las distancias genéticas entre poblaciones, conduciéndolas a un aislamiento geográfico y genético de una a otra población (Culley *et al.*, 2007). Este y otros procesos que dan lugar a los diferentes patrones biogeográficos de distribución de *Polylepis* en los Andes (Qamaruz-Zaman *et al.*, 1998), pueden no ser evidentes, sin embargo, los patrones genéticos proveen ciertas evidencias de la historia evolutiva de las especies y los procesos involucrados (Scheen *et al.*, 2002). Por ello, el conocimiento de la estructura genética de las poblaciones con las interrelaciones de las características del lugar, parámetros históricos y diferenciación genética provee invaluable información para la formulación de políticas de protección y administración efectivas para especies en peligro (McCauley *et al.*, 2002).

2 METODOLOGÍA

2.1 Recolección de muestras

Se analizaron dos poblaciones de los bosques de *Polylepis* en Papallacta, en cada población se seleccionaron diez plantas en base al trabajo de McCauley & Ballard, 2002, donde se expresa que un número de diez individuos es adecuado para un estudio piloto de genética poblacional. Las plantas para el muestreo fueron escogidas al azar en toda la población, en el Cuadro 1 se detallan los datos de localización de los sitios muestreados. En los árboles muestreados se varió su tamaño y nivel de madurez. Cada muestra consistió en aproximadamente 10 folíolos, los cuales fueron transportados en tubos con sílica gel, para posteriormente ser almacenados a -80 °C en el laboratorio (Schmidt *et al.*, 2006).

2.2 Aislamiento de ADN

Se usó el protocolo descrito por Khanuja *et al.* (1999) con ciertas modificaciones. Se trituró el material vegetal y en un tubo de 10 ml se lo mezcló con 3 ml de buffer de extracción (Tris HCl 100 mM pH 8,0; NaCl 5 M, EDTA 25 mM pH 8,0; CTAB 2,5 %; PVP 1 %; 2b-mercaptoetanol 0,2 %), incubándose a 60 °C por 2 horas. Luego se mezcló con 3 ml CIA y se centrifugó a 5000 rpm por 20 minutos. Al sobrenadante se le añadió 1,5 ml de NaCl 5 M y 0,6 volúmenes de alcohol isoamílico y se dejó reposar por 1 hora en frío. Posteriormente, se centrifugó a 5000 rpm por 20 minutos. El pellet fue lavado con 1 ml de etanol frío, se secó durante 20 minutos y resuspendió en TE con sales (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 1M), dejando la muestra toda la noche a 4 °C. Luego se añadió 3 ul de RNA (10 mg/ul) y se incubó durante 30 minutos a 37 °C, al término del mismo se

mezcló con 300 ul de CIA. La mezcla fue centrifugada a 5000 rpm por 20 minutos. Al sobrenadante se añadió 300 ul de etanol frío al 90 % y se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos. El pellet fue lavado con etanol frío y secado por 20 minutos. Al final el pellet fue resuspendido en TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM).

2.3 Amplificación de ISSRs

Se realizó una PCR de 25ul, en la cual se usó 1X de buffer, 2mM y 1,8mM de MgCl₂ (dependiendo del primer), 0,8mM de dNTPs, 0,25pmol de primer, 1U de Taq polimerasa y 40ng de DNA. Las temperaturas para la PCR fueron: Tdi 94°C 2min, [Td 94°C 30s, Ta 42°C 45s

Cuadro 1. Detalles de la codificación y de las características del lugar de las muestras recolectadas

Código	Especie	Parche	Puntos GPS	Altura [msnm]
2P1	<i>P. incana</i>	P1	S 00°03.795` ; W 078°15.036`	3518
4P1				
8P1				
12P1				
14P1				
1P2	<i>P. incana</i>	P2	S 00°18.263` ; W 078°14.206`	3685
7P2				
9P2				
10P2				
15P2				
1P3	<i>P. pauta</i>	P3	S 00°20.200` ; W 078°13.154`	4026
6P3				
12P3				
4P4	<i>P. pauta</i>	P4	S 00°20.377` ; W 078°12.797`	4000
6P4				
10P4				

14P4			
2P5			
11P5		P5	S 00°21.496` ; W 078°11.891`
13P5			3832

Cuadro 2. Concentraciones de MgCl₂ y temperaturas de alineamiento específicas por primer.

Primer	MgCl₂ [mM]	Ta [°C]
17898A	1,8	47
17898B	2,0	42
17899A	2,0	43
17899B	1,8	43
HB9	1,8	44
HB11	1,8	45
HB12	2,0	40
HB14	2,0	40
844A	2,0	54
844B	2,0	54

(dependiendo del primer), Te 72°C 2min] por 40 ciclos y Tef 72°C 7min. La concentración y temperatura empleada para cada primer se describe en el Cuadro 2. La visualización de los productos amplificados se la realizó en geles de agarosa al 1,5%.

2.4 Análisis de datos

Para el análisis de datos de marcadores dominantes, como son los ISSRs, es necesario utilizar métodos que no alteren el equilibrio de Hardy-Weinberg. Para esto, las bandas amplificadas se registraron en una matriz binaria de unos (presencia) y ceros (ausencia). Se usó el coeficiente de similitud de Dice para calcular las distancias genéticas y el promedio de diversidad genética por población. Con los datos del coeficiente de Dice se realizó un agrupamiento, mediante el algoritmo

UPGMA, para la elaboración de un árbol. Se llevó a cabo un análisis factorial de correspondencias múltiples (AFCM) entre los primers y las especies.

3 RESULTADOS

Los 10 primers utilizados generaron complejos patrones de bandas. Los datos de las bandas no variaron entre las repeticiones de las accesiones o entre los geles para ninguno de los primers usados (Fig. 1), mostrando la alta reproducibilidad de los marcadores ISSRs (Prevost & Wilkinson, 1999). Sin embargo, la amplificación de algunas bandas fue débil lo que las hizo difícil de registrar, siendo necesaria la colocación del marcador de 100pb en los extremos del gel.

Los diez primers utilizados dieron lugar a la amplificación de 211 bandas en las dos poblaciones analizadas, lo cual dio un promedio de 21 bandas por primer. De las 211 bandas, 202 fueron polimórficas lo que equivale a un 95,7% del total, tomándose como banda polimórfica a aquella que muestre presencia o ausencia en al menos uno de los veinte individuos.

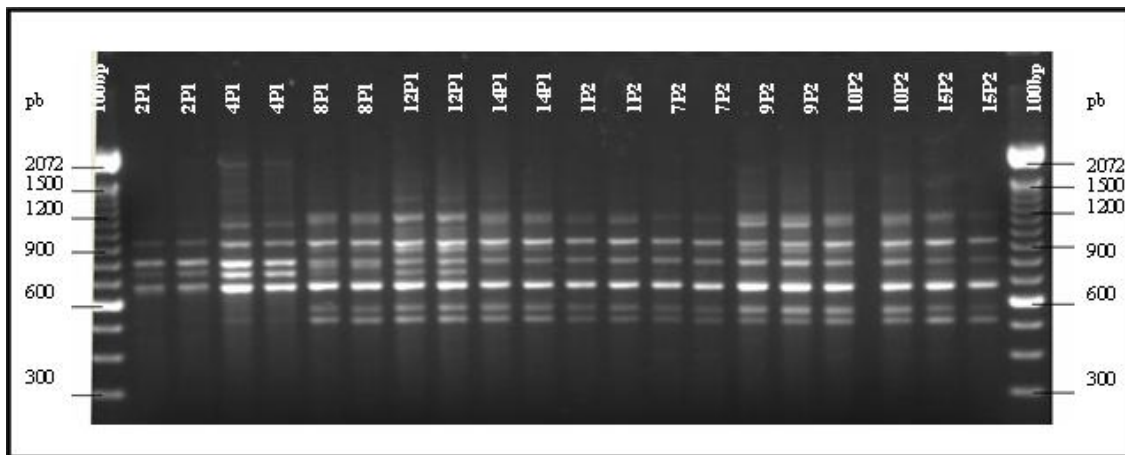


Figura 1. Patrón de bandas amplificadas con el primer HB9 en la población de *P. incana* de Papallacta. En la accesión 2P1 se observa un menor número de amplicones y una baja intensidad de las bandas amplificadas en comparación con resto de accesiones.

Cuadro 3. Medidas de diversidad genética en función de similaridades y disimilaridades. Dentro de *P. incana* y *P. pauta* de Papallacta.

Población		Promedio similaridades	Promedio disimilaridades
<i>P. incana</i> de Papallacta		0,866	0,134
Parches	P1	0,813	0,187
	P2	0,939	0,061
<i>P. pauta</i> de Papallacta		0,763	0,237
Parches	P3	0,800	0,200
	P4	0,671	0,329
	P5	0,810	0,190
TOTAL		0,630	0,369

Los primers que presentaron el mayor número de bandas polimórficas fueron 17898B y 17899A y el primer que presentó menos bandas polimórficas fue 17899B.

Mediante el coeficiente de similaridad de Dice se obtuvieron medidas de distancias entre cada uno de los individuos. El software utilizado dio como resultado una matriz triangular de contingencia con las similaridades entre los individuos. A partir de la matriz de similaridad se calculó una matriz de disimilaridad y al promediar estos datos individuales de disimilaridad se obtuvo una medida de la diversidad genética dentro de cada población: en *P. pauta* 0,237 y en *P. incana* 0,134 y un valor global de diversidad genética de 0,369. En el Cuadro 3 se detallan

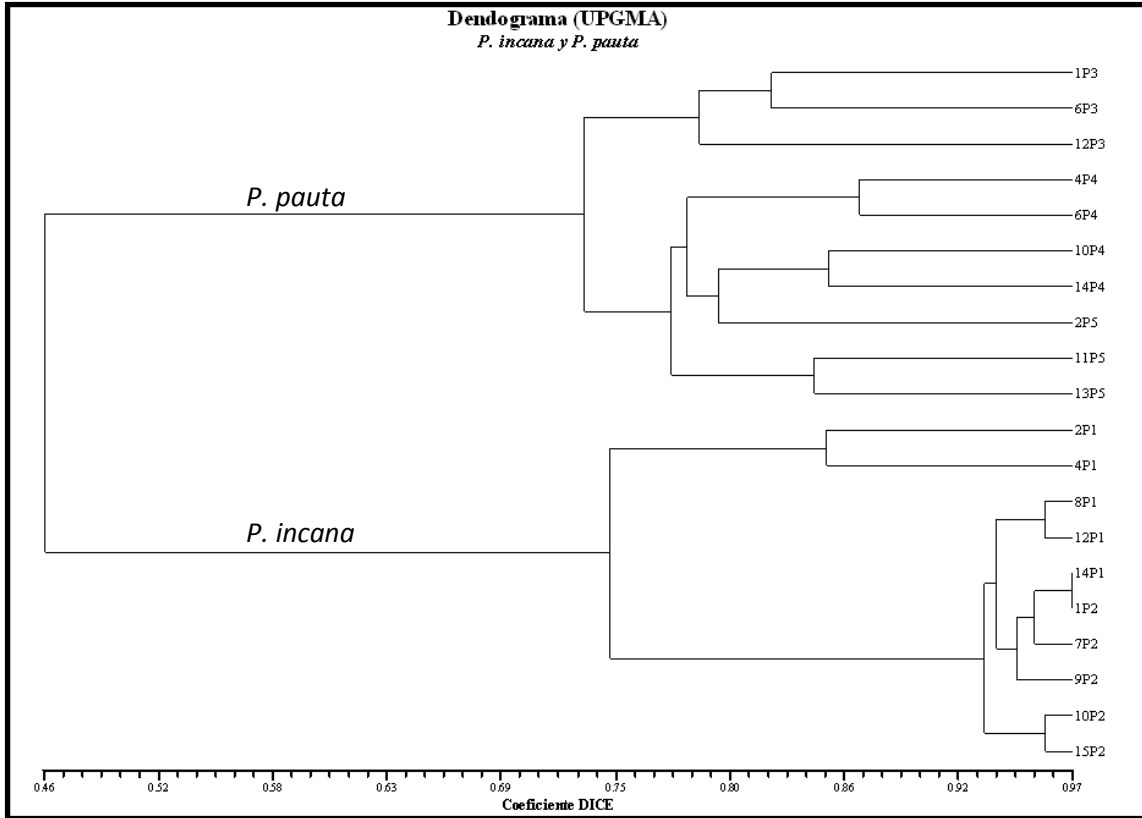


Figura 2. Dendrograma basado en una matriz de distancias de Dice y un agrupamiento UPGMA. Los individuos de P1 a P2 corresponden a *P. incana* de Papallacta, los individuos de P3, P4 y P5 corresponden a *P. pauta* de Papallacta. En cada uno de los nodos se puede observar el valor de similitud a partir del cual se separan las ramas.

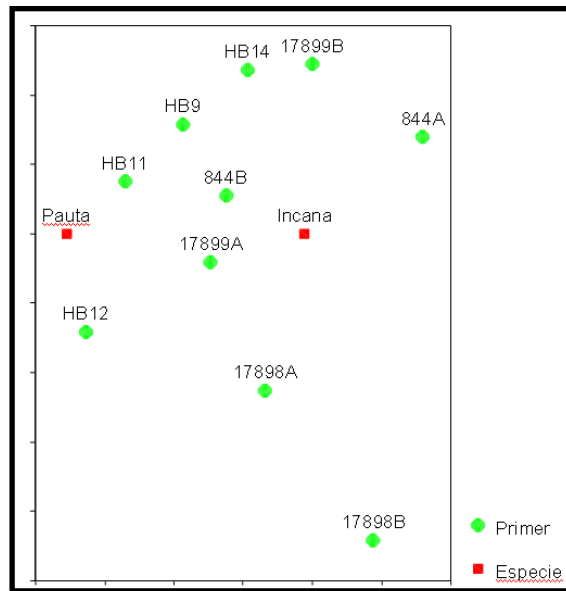


Figura 3. AFCM de *P. incana* y *P. pauta* frente a los 10 primers usados en el estudio. La cercanía los primers con las especies muestra que tan útil fue cada uno para la diferenciación de los individuos.

estos valores dentro de cada una de las poblaciones. Los datos fueron sometidos a un análisis de distancias genéticas usando el coeficiente de similaridad Dice y agrupamiento UPGMA pudiéndose observar en la Figura 2, que la menor variabilidad genética se registró en *P. incana*, teniendo el 80 % de sus muestras similitud en un rango de 93 % a 97 %. La población con mayor variabilidad fue la de *P. pauta*, empezando la similitud de sus individuos en un 74 %. Además, el dendograma indica que las poblaciones generalmente se agrupan de acuerdo a su localización geográfica donde fueron colectados.

En el AFCM se puede conocer los primers que fueron más informativos, en la búsqueda de locus polimórficos, para cada una de las dos especies estudiadas, (Figura 3). Siendo los primers 844B y 17899A muy útiles en el caso de *P. incana* ya que generaron un mayor número de bandas con esta especie, y los primers HB11 y HB12 permiten mayor diferenciación dentro de la especie *P. pauta*. Demostrándose así como cada primer aporta con diferente información para la separación de los genotipos analizados.

4 DISCUSIÓN

En base a los resultados obtenidos en este estudio piloto es posible conocer, de una manera general, que los dos bosques de *Polylepis* analizados presentan una diversidad genética del 36,9% siendo baja al considerar que se han analizado dos especies. Se ha visto que en *Polylepis* la similitud genética entre diferentes especies es el resultado de la limitada divergencia genética causada por: la especialización, la dispersión continua del polen por grandes distancias, por transplantes recientes o el conjunto de todos estos factores (Kessler & Shmidt, 2006; Simpson, 1979). Los datos de diversidad genética son diferentes entre cada una de las poblaciones en un rango bajo, observándose previamente que en las especies con una amplia distribución geográfica generalmente varía la cantidad de diversidad genética (Godt & Hamrick, 1993).

Los valores de niveles de diversidad genética se vuelven bastante bajos al considerarlos dentro de cada población. Al analizar individualmente la diversidad genética en cada población se observa que: la población de *P. pauta* de Papallacta presentó el valor de diversidad genética más alto de las tres poblaciones, superior en un 10% a *P. incana*. El parche P4 mostró el mayor valor de diversidad genética de todo el estudio, lo cual puede sustentarse en que la localización en que se encuentra este parche es relativamente central en la población de *P. pauta*, lo que favorece un mayor grado de diversidad genética (Godt & Hamrick, 1993), en comparación con las localizaciones P3 y P5 que se encuentran en los extremos periféricos de la población. Las poblaciones marginales poseen una cantidad reducida de diversidad genética comparada con las poblaciones centrales, debido a que son producto del establecimiento de un pequeño número de individuos que contienen un subconjunto de la diversidad o por otro lado contienen variantes genéticas únicas o poco comunes de la especie (Amsellem *et al.*, 2000; Godt & Hamrick, 1993; Yeh & Layton 1979).

La población de *P. incana* posee el menor valor de diversidad genética, llegando a presentarse un 6,1% dentro de una de las localizaciones muestreadas (P2), este sitio se caracterizó por encontrarse aproximadamente en la parte media del bosque de *P. incana*. Mientras que en el primer sitio de muestreo (P1), que se localizó en el extremo inicial del bosque, el valor promedio de diversidad genética fue del 18,7%. Por consiguiente los individuos de la localización P1 presentaron, en un rango muy pequeño, una diversidad mayor a P2, estos valores de cierta manera son contradictorios a previas asunciones en las que se considera que la diversidad genética es reducida en las poblaciones marginales en comparación con las poblaciones centrales (Amsellem *et al.*, 2000; Yeh & Layton 1979). Pero esto, se puede justificar al considerar que en P2 solo se tomó una muestra del lado izquierdo de la carretera y el resto de muestras pertenecieron a la parte interna del lado derecho, y en P1 la mitad de las muestras se tomaron de un lado de la carretera y la otra mitad del otro. La presencia de la carretera puede afectar el flujo de genes ocasionando una ligera divergencia

entre los individuos de ambos lados de la vía, lo cual se refleja en la diferenciación entre individuos.

Sin embargo, se ha visto que una baja cantidad de diversidad genética no siempre va a ser característica de las poblaciones marginales (McCauley & Ballard, 2002). Y también el considerar a P2 como una población central podría no ser acertado ya que el bosque es largo más no ancho, por ello, no posee un núcleo claramente definido, pudiéndose de esta manera considerar a ambas localizaciones como marginales. Lo cual concuerda con que las poblaciones marginales que se encuentran formando parches o en los márgenes poseen una menor variabilidad genética que las poblaciones centrales (Amsellem *et al.*, 2000; Godt & Hamrick, 1993; Yeh & Layton 1979).

El dendograma UPGMA indica que las poblaciones generalmente se agrupan de acuerdo a su localización geográfica. Este tipo de agrupamiento permite considerar únicamente las relaciones entre grupos, porque la información acerca de las relaciones entre pares se pierde en métodos basados en la reducción progresiva de la matriz de similaridades (Legendre & Legendre, 2000).

5 CONCLUSIONES

- En base a los valores promedio de los coeficientes de similaridad se concluyó que la población *P. incana* de Papallacta presenta una diversidad genética menor a la población de *P. pauta* analizada.
- Los individuos dentro de las poblaciones presentan una alta similaridad genética. El valor de diversidad genética aumentó notablemente al considerar las interacciones entre todos los individuos de las tres poblaciones, y no únicamente las relaciones entre individuos de las mismas poblaciones. Este fenómeno se presenta como un indicador de que está ocurriendo un problema de fragmentación de hábitat debido a que existen indicios de divergencia genética entre las poblaciones, pero disminuye la disimilaridad de los individuos dentro de ellas mostrando que dentro de las poblaciones se están dando procesos como deriva génica. La causa de esto puede estar basada en la distribución discontinua que se observa en *Polylepis* formando parches.
- Los valores de diversidad genética no sustentaron de una manera notoria que las poblaciones más aisladas de *P. incana* presentan menor diversidad genética que las menos aisladas, esto se dio básicamente al no poder considerar de manera certera a ciertas localizaciones como poblaciones centrales. Mientras que en el caso de *P. pauta* si se observó cierta tendencia en la que los individuos de la localización considerada como central presenten una diversidad genética ligeramente mayor a la de los individuos de las partes periféricas del bosque.

6 RECOMENDACIONES

- Por todo lo anterior, es necesaria la recuperación ecológica de estas zonas mediante material vegetal proveniente de diferentes zonas del mismo páramo, evitando de esta manera un futuro efecto fundador que disminuya aun más la variabilidad genética dentro de estos bosques.
- En futuros análisis de genética poblacional en *Polylepis*, en las especies *P. incana* y *P. pauta*, se podrá utilizar principalmente los primers HB9, HB11, HB12, 844B y 17899A debido a que estos son muy informativos en estos casos.

7 AGRADECIMIENTOS

A la Escuela Politécnica del Ejército, Carrera de Ingeniería en Biotecnología por el apoyo para el desarrollo de este trabajo de investigación. Al matemático Luis Castillo por su valiosa colaboración en el análisis estadístico de los datos.

8 REFERENCIAS

1. Amselleml, L., Noyer, J., Le Bourgeois, T., & Hossaert-McKey M. Comparison of genetic diversity of the invasive weed *Rubus alceifolius* Poir. (Rosaceae) in its native range and in areas of introduction, using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Molecular Ecology*, 9, 443-455 (2000).
2. Bucher, E., & Schofield, C. Economic assault on chagas disease. *New Scientist*, 81, 321-324 (1981).
3. Culley, T., Sbita, S., & Wick, A. Population genetic effects of urban habitat fragmentation in the Perennial Herb *Viola pubescens* (Violaceae) using ISSR markers. *Annals of Botany*, 27, 83-93 (2007).
4. Godt, M., & Hamrick, J. Genetic diversity and population structure in *Tradescantia hirsuticaulis* (Commelinaceae). *Amerinan Journal Botany*, 80, 959-966 (1993).
5. Kessler, M. The genus *Polylepis* (Rosaceae) in Bolivia. *Candollea*, 50, 131-171 (1995).
6. Kessler, M., y Driesch, P. Causas e historia de la destrucción de bosques altoandinos en Bolivia. *Ecología en Bolivia*, 21, 1-18 (1994).
7. Kessler, M., & Herzog, S. Conservation status in Bolivia of timberline habitats, elfin forest and their birds. *Cotinga*, 10, 50-54 (1998).
8. Kessler, M., & Schmidt, A. Taxonomical and distributional notes on *Polylepis* (Rosaceae). *Organisms, Diversity and Evolution*, 1, 1-10 (2006).
9. Khanuja, S., Shasany, A., Darokar, M., & Kumar, S. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant Molecular Biology Reporter*, 17, 1-7 (1999).
10. Ledig, F. Human impacts on genetic diversity in forest ecosystems. *Oikos*, 63, 87-108 (1992).
11. Legendre, P., & Legendre, L. *Numerical Ecology – Developments in Environmental Modelling*. Masson: Quebec (2000).
12. McCauley, R., & Ballard, H. Inferring nativity and biogeographic affinities of central and marginal populations of *Froelichia floridana* (Amaranthaceae) from Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *Journal of the Torrey Botanical Society*, 129, 31 1-325 (2002)..
13. Prevost, A., & Wilkinson, M. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical Applied Genetics*, 98, 107-112 (1999).
14. Qamaruz-Zaman, F., Fay, M., Parker, J., & Chase, M. The use of AFLP fingerprinting in conservation genetics: a case study of *Orchis simian* (Orchidaceae). *Lindleyana*, 13, 125-133 (1998).
15. Scheen, A., Elven, R., & Brochman, C. A molecular-morphological approach solves taxonomic controversy in arctic *Draba* (Brassicaceae). *Can. J. Bot.*, 80, 59-71 (2002).
16. Schmidt-Lebuhn A., Kessler, M., & Kumar, M. Promiscuity in the Andes: Species relationships in *Polylepis* (Rosaceae, Sanguisorbeae) based on AFLP and morphology. *Systematic Botany*, 31, 547-559 (2006).
17. Simpson, BA revision of the genus *Polylepis* (Rosaceae: Sanguisorbeae). *Smithsonian Contributions to Botany*, 43, 1-62 (1979).
18. Yeh, F., & Layton C. The organization of genetic variability in central and marginal populations of lodgepole pine *Pinus contorta* spp. *latifolia*. *Genetic Cytology*, 21, 487-503 (1979).
19. Young, A., Boyle, T., & Beown, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology and Evolution*, 11, 413-418 (1996).

Diseño e implementación de un equipo de alta frecuencia e iontoforesis

Beatriz Pazmiño, Ramiro Ríos, David Andrade

Carrera de Ing. Electrónica, Escuela Politécnica de Ejército, Sangolquí, Ecuador

RESUMEN: El presente trabajo describe el diseño e implementación de equipo de alta frecuencia e iontoforesis. Es un equipo electromédico de uso en ramas de la Medicina como la Fisioterapia, Cosmetología, Dermatología y Medicina General. De las partes que constituyen el equipo, el cerebro del mismo, fue diseñado y construido utilizando el microcontrolador 18F8772. Las características del equipo son: entrega señales de corriente cuyo rango es de $10\mu\text{A}$ - $390\mu\text{A}$, sensibilidad de $10\mu\text{A}$; rango para el tiempo activo (ON) y para el tiempo de inactivo (OFF) de $0,1\text{ ms} - 999,9\text{ ms}$; cambio de polaridad, y menú de usuario interactivo mediante LCD y teclado.

ABSTRACT: This project is about the design and implementation of a High Frequency and Iontophoretic Device. This device is used by Physiotherapist, Cosmeticians, Dermatologist, and General Physicians. The brain of this equipment is the PIC 18F8722, which is the superset of the entire 64 -80 pin in his family. The features of this equipment are: supply current signals between $10\mu\text{A}$ - $390\mu\text{A}$, sensibility of $10\mu\text{A}$; range of its active time (ON) and deactivation time (OFF) of $0,1\text{ ms} - 999,9\text{ ms}$; Change polarity: Positive/Negative; and, it has a User Menu in order to command this device, which include an LCD Display and a keyboard.

1 INTRODUCCIÓN

El término Alta Frecuencia, en éste documento, se referirá al tipo de señales eléctricas cuyas frecuencias no ocasionen contracción muscular. Ya que: “Clásicamente se han clasificado dos subtipos de terapia con TENS. Baja intensidad, alta frecuencia (50-100 Hz) y 2) acupuntura-like o alta intensidad (15-20 mA y baja frecuencia (1-5 Hz)” [1].

Es de vital importancia además saber cuál es el límite de corriente que puede ser usado en la iontoforesis; por lo que de acuerdo con estudios realizados por Ledger en 1992 se demostró que el límite considerado seguro para aplicaciones en piel humana es de $0.5\text{mA}/\text{cm}^2$, pero en práctica las densidades de corriente varían entre 0 y $0.2\text{mA}/\text{cm}^2$ [2].

La Iontoforesis Transdérmica tiene sus inicios a fines del siglo 18, pero es durante los últimos veinte años que ha surgido como alternativa para administrar medicamentos. La naturaleza invasiva de los sistemas de medicación convencionales y los potenciales efectos secundarios que éstos tienen en el organismo del ser humano son la principal razón de su creciente desarrollo. Las drogas aplicadas sobre la piel, sobre un sitio bien definido, permiten al fármaco difundirse desde el estrato córneo hasta la hipodermis e ingresar al torrente sanguíneo produciendo un efecto sistémico. La absorción provee ventajas pero la resistencia a la difusión del estrato corneo ha limitado su uso y ha motivado la investigación de potenciadores químicos y técnicas terapéuticas. Recientes avances técnicos como la miniaturización electrónica y el desarrollo de nuevos péptidos terapéuticos han alentado considerar a la Iontoforesis Transdérmica como un método idóneo para la administración de medicamentos [2].

La Iontoforesis aplica un campo eléctrico a través de la piel por medio de dos electrodos. Una droga, que usualmente consiste de moléculas cargadas, es puesta bajo uno de los electrodos de tal manera que las fuerzas electropulsivas forzan el movimiento de las moléculas hacia el interior de la piel. Esto implica que: si el radical activo es negativo se utiliza para la aplicación el electrodo negativo; y, si el radical activo es positivo se utiliza para la aplicación el electrodo positivo. De esta manera la tasa de penetración de las drogas a través de la piel es altamente mejorada en comparación con la difusión pasiva.

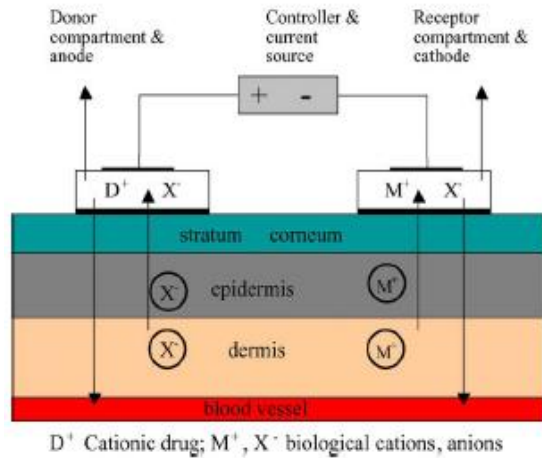


Figura 1. Sistema Iontoforético [3]

El transporte de moléculas neutras puede ser también facilitado por la iontoforesis. A un PH fisiológico la piel actúa como una membrana cargada negativamente. Cuando un campo eléctrico es aplicado a través de dicha membrana hay un transporte neto de moléculas de agua a través de la piel, desde el ánodo hacia el cátodo. Aunque el transporte de las moléculas por electroósmosis es relativamente pequeño comparado con la electro repulsión, la iontoforesis de moléculas no cargadas ha sido exitosamente aplicada en el monitoreo de glucosa. La iontoforesis usa como vías de transporte los conductos sudoríparos y los folículos pilosos y utiliza como vehículo las disoluciones internas hasta llegar al líquido intersticial [5].

El campo eléctrico generado es creado por una corriente constante, aunque la alta frecuencia pulsátil también ha sido a veces aplicada y se ha visto que previene la formación de ampollas no deseadas. Densidades de corriente hasta 0,50 mA/cm² son consideradas seguras, pero en la práctica las densidades varían entre 0 y 0,20 mA/cm² [2].

La Iontoforesis Transdérmica, introduce agentes terapéuticos hacia el organismo. Comparado con otras vías de administración, la vía transdérmica ofrece una combinación de ventajas: es no invasiva, no es afectada por las comidas ingeridas, y no es sintetizada en el hígado. Además precisa de un sistema de control de dosis y tasa de transporte a través de la modulación del campo eléctrico aplicado.

La tasa de iones de medicamento transportados es generalmente proporcional a la magnitud de la corriente aplicada. Específicamente el flujo transdérmico de medicamento, J_d, durante la iontoforesis, es descrito por la siguiente expresión derivada de la Ley de Faraday:

$$J_d = \frac{t_d I M_d}{Z_d F}$$

(1)

La ecuación (1) indica que la cantidad de iones introducidos depende de la intensidad (I) y del equivalente electroquímico. Para hallar el equivalente electroquímico se necesita conocer el peso atómico, la valencia del ión y la constante de Faraday. En la ecuación (1), M_d es la masa molar o peso molecular, Z_d es la valencia del ión, F la constante de Faraday, que es 96.500 Culombios, y t_d el número de transporte, el cual expresa la carga que lleva el ión d como fracción del total de carga transportada, es única para cada ión de medicamento y de eso depende su movilidad [3].

2 DISEÑO

Es importante tomar en cuenta que el paciente es susceptible a una descarga eléctrica, pues la mayoría de productos electromédicos tienen una parte que va en contacto con el paciente ya sea por corto tiempo o por un tiempo indefinido; por esta situación, el paciente corre más peligro de ser electrocutado que una persona saludable al usar un computador. También se debe considerar que el sistema inmunológico de la mayoría de pacientes está desfortalecido, lo que conlleva a que los pacientes sean más susceptibles a las corrientes de fuga. Es por ello que para el diseño y construcción de equipo se tomó en cuenta el estándar IEC 60601-1 Requerimientos Generales de Seguridad para los equipos electromédicos.

Un concepto básico del estándar es que el equipo debe proveer dos niveles de protección: el uso de un gabinete debidamente conectado a tierra; y, respetar el debido espacio entre las partes activas y el gabinete. De tal manera que si una falla ocurre (un corto entre el espacio o la tierra falla) el médico, la enfermera o el usuario no sean afectados.

La clasificación de un equipo electromédico es el primer paso en determinar el programa de pruebas para la conformidad a la IEC 60601-1 estándar base. Hay muchos requerimientos que no se aplican al dispositivo bajo prueba. Por lo que clasificar el dispositivo antes de las pruebas ayudará a obtener el programa requerido para satisfacer el estándar al igual que determinará el marcado, y los requerimientos físicos de construcción.

Categorías de Clasificación:

Según la norma IEC 60601-1, el equipo de Iontoforesis tiene la siguiente clasificación:

Protección contra choque eléctrico:

CLASE I

Grado de protección contra choque eléctrico:

TIPO BF

Grado de protección contra penetración nociva de agua:

Común

De acuerdo con el modo de operación

Operación continua

Especificaciones Técnicas Generales:

El equipo de Iontoforesis y Alta Frecuencia entrega corriente constante desde 0 hasta $490\mu\text{A}/\text{cm}^2$ en pasos de $0,1\text{A}/\text{cm}^2$. El equipo tiene dos configuraciones: una automática que genera una onda cuadrada de 5000Hz; y, otra configuración manual donde se puede modificar el tiempo de encendido y de apagado de la señal a generar, desde un mínimo de $10\mu\text{s}$ hasta un máximo de 999,9ms con paso de 0,10ms. Se puede manipular un tiempo de tratamiento de hasta 29 minutos con pasos de 1 minuto.

Modos de Configuración:

Cosmetológica:

- - Frecuencia: 5KHz

- Grados de Intensidad:
 - Alta 300 μ A/cm²
 - Media 200 μ A/cm²
 - Baja 100 μ A/cm²

Médica:

- Período de la Señal
 - Rango Tiempo ON: 0,1ms -999,9ms
 - Rango Tiempo OFF: 0,1ms -999,9ms
 - Sensibilidad: 0,1ms
- Intensidad de la Densidad de Corriente
 - Rango: 0 -490 μ A/cm²
 - Sensibilidad: 10 μ A/cm²
- Tiempo de Tratamiento:
 - Rango: 0 – 29 min
 - Sensibilidad: 1 min

El equipo de Iontoforesis y Alta Frecuencia dispone de: un visualizador gráfico donde el usuario pueda observar los comandos a ser ejecutados; un teclado para el ingreso de los comandos; dos canales de potencia donde se conectan los electrodos y un sistema de alimentación.

El teclado tiene los siguientes botones: Arriba, Abajo, Izquierda y OK. Así como también botones de Menú, Configuración, Reiniciar, Encendido. Posee un conmutador para realizar un cambio de polarización. Además, tiene indicadores luminosos de encendido y polarización.

Controla la corriente entregada con un margen de error de $\pm 10\mu$ A. Con protección ante cortocircuito de los electrodos y aviso de circuito abierto. Los electrodos son de acero inoxidable, dos para iontoforesis y dos para contracción muscular.

Las funciones que dispone el equipo son las siguientes:

- a. Comprobación de su correcto funcionamiento (Auto Test).
- b. El despliegue del programa de interacción con el usuario.
- c. El ingreso de instrucciones por parte del usuario.
- d. La generación de señales eléctricas de acuerdo a los modos de configuración y datos ingresados.
- e. Medición, acondicionamiento y provisión de corriente constante al paciente.
- f. Temporización del tiempo del tratamiento.

En lo que refiere al software de interfaz de usuario, el dispositivo inicia con un Auto-Test para comprobar su correcto funcionamiento electrónico. Luego muestra los diferentes modos de configuración disponibles y espera la interacción del usuario. Una vez configurado el tipo de tratamiento, tiempo de trabajo, intensidad de corriente, polaridad del electrodo y si fuere el caso configuración de los tiempos de la onda, muestra el tiempo restante de tratamiento hasta su finalización, regresando al menú principal.

Arquitectura del Prototipo:

De acuerdo a la Figura 2 se puede apreciar que el dispositivo consta de 8 módulos:

Módulo Control de Visualización.

Módulo Control del Teclado

Módulo Control de Corriente Constante-
Etapa de Potencia.

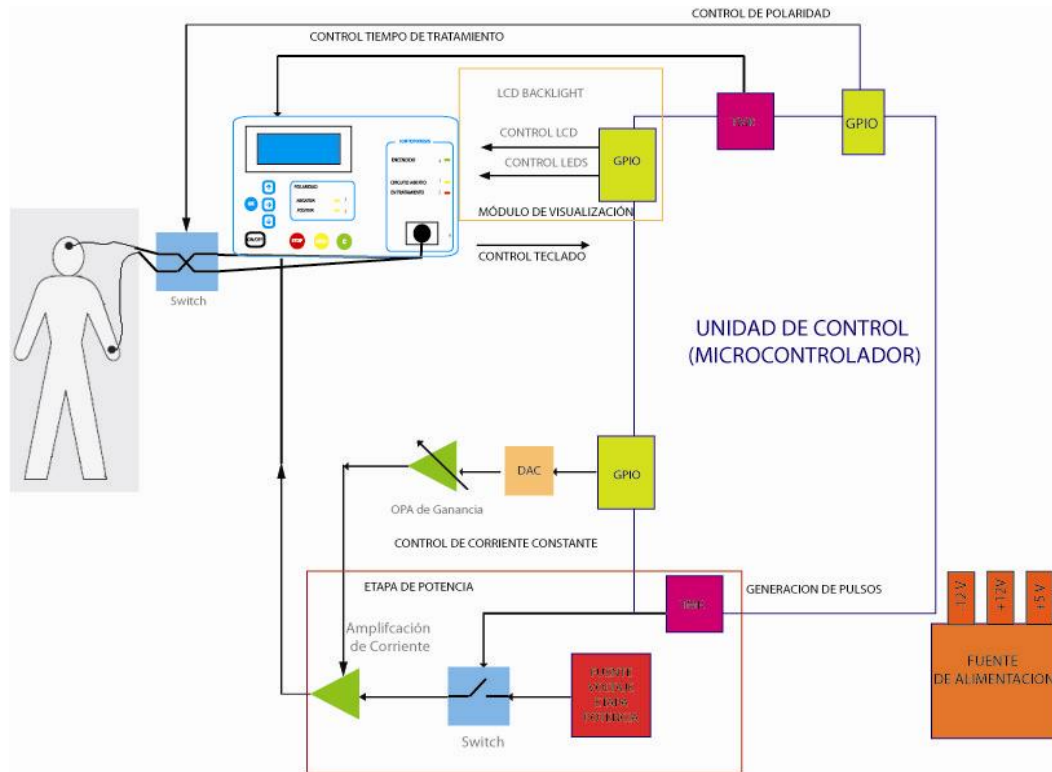


Figura 2. Arquitectura del Equipo de Alta Frecuencia Iontoforesis.

Módulo Control de Polaridad
Control del Tiempo de Tratamiento.
Generador de Pulsos.
Fuente de Alimentación.

3 IMPLEMENTACION

Módulo control de visualización.- Para la interacción entre el usuario y el equipo de alta frecuencia e iontoforesis, se seleccionó un dispositivo LCD alfanumérico; este LCD, posee un controlador HD44780, el mismo que requiere un bus de datos de 8 bits y tres bits de control. Para efectos de iluminación, el LCD también requiere un suministro de corriente para su luz trasera (backlight) y otra para el contraste de las letras. Los puertos destinados para la comunicación con el microcontrolador son: puerto D de datos (PORTD) y puerto E de control (PORTE).

Módulo para el control del teclado.- El control del teclado también lo hace el microcontrolador, a través de su puerto RA0, configurado como entrada analógica. Además utiliza el pin RB0, para disparar la interrupción INT0 del microcontrolador. El teclado está compuesto por una matriz de pulsadores conectados a una red de resistencias de tal manera que cuando se presione un pulsador éste entregue un voltaje diferente para cada pulso. El valor de voltaje será leído por el conversor analógico digital del microcontrolador. También cada vez que se genera un pulso, el voltaje sobre la

resistencia pasa de 0 voltios a un determinado valor, produciendo un cambio de nivel en ese punto, el mismo que alimentado a la entrada de una compuerta inversora, acondicionadora de la señal, sea quien dispere la interrupción en el microcontrolador.

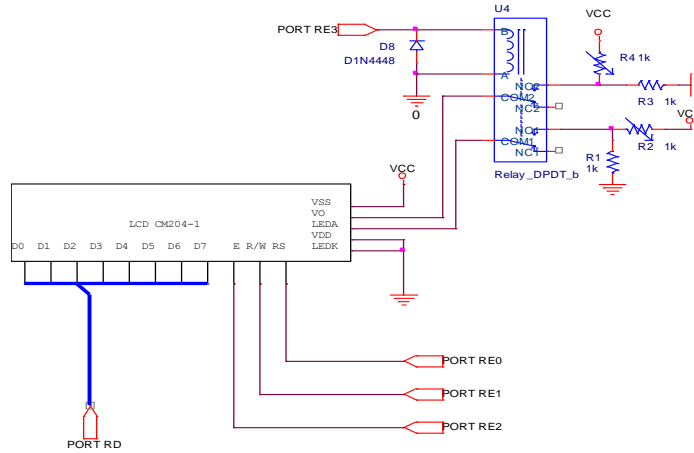


Figura 3. Diagrama eléctrico del Módulo Control de Visualización

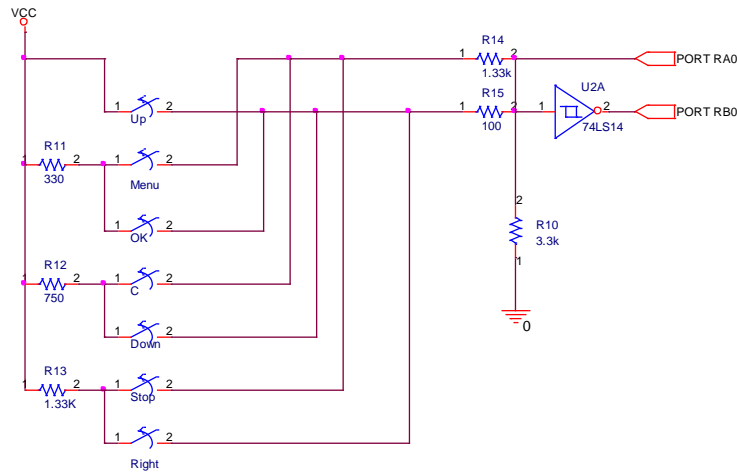


Figura 4 Diagrama Electrónico del Módulo de Control de Teclado.

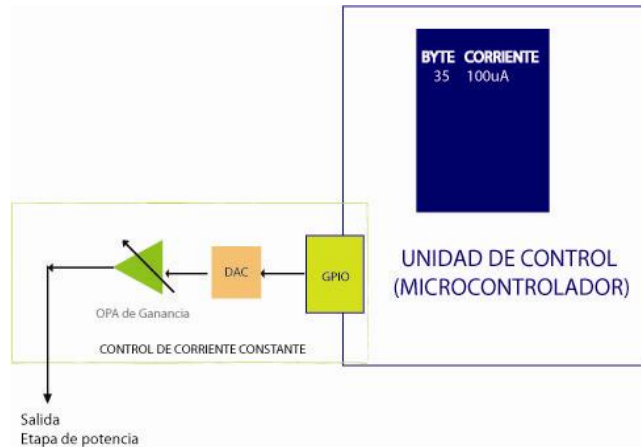


Figura 5. Diagrama de Bloques del Control de Corriente.

Módulo para el control de corriente constante.- Este circuito consta de un convertor digital analógico y un amplificador LF586. El primero convertirá la salida digital del microcontrolador de 8 bits en una sola salida analógica, la misma que actuará sobre la base del transistor de la etapa de potencia encargado del suministro de corriente.

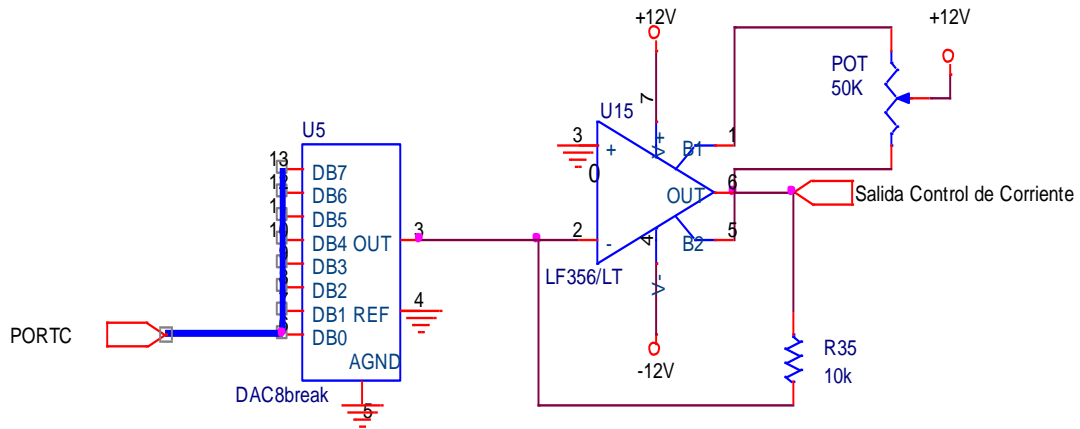


Figura 6. Diagrama Circuital del Control de Corriente.

Módulo para el control de polaridad.- Sirve para que el usuario pueda modificar la dirección de la corriente a través de los electrodos. El equipo está configurado para que en inicio entregue una polaridad positiva. El control se lo hace mediante un puerto del microcontrolador y un relé DPDT que invierte el sentido de los electrodos.

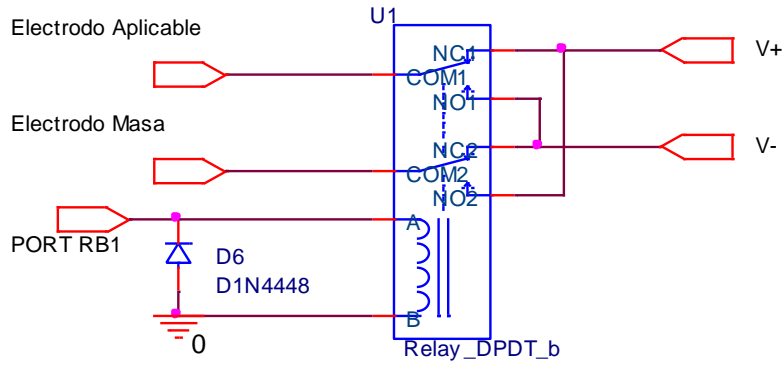


Figura 7 Diagrama Circuital para el Control de Polaridad.

Etapa de potencia.- Esta etapa es la encargada de acondicionar la señal generada por la unidad de control de acuerdo a las configuraciones de tiempo realizadas por el usuario. Consta de una fuente de poder especial para uso en equipos electromédicos, cumpliendo con la norma IEC60601-1; además de un transistor que amplifica la corriente suministrada por el circuito de control de corriente, polarizado para que funcione en corte y saturación, de tal manera que su corriente de saturación sea la programada.

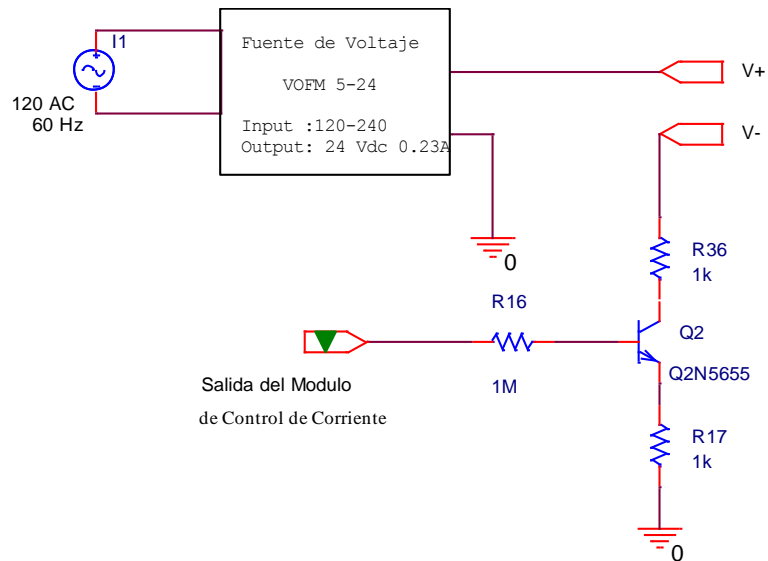


Figura 8 Diagrama Electrónico de la Etapa de Potencia.

Unidad de control.- Está compuesta por la tarjeta de control que lleva el microcontrolador PIC18F8722, cuyas características son:

Microcontrolador:	PIC18F8722-I/PT
Cristal de 10MHz:	
Memoria Flash de programa:	128Kb
Memoria RAM:	3936 Bytes
Memoria EEPROM:	1024 Bytes
Puertos I/O:	70
Conexión de los Puertos:	Conector IDCC
Canales Análogo/Digital:	16
Precisión Canales A/D	10bits
Timers:	3 (1 de 16 Bits y dos de 8 Bits)
Captura y Comparación:	5 Módulos con PWM
Comunicación Auxiliar:	RS232, I2C, SPI, Puerto Paralelo
Herramientas de Desarrollo:	Programación In-Circuit, conexión LCD
Votaje de Alimentación:	5 Vdc

Programa interfaz de usuario.- El programa desarrollado para el microcontrolador está estructurado por páginas y cada página posee eventos, estos eventos son llamados cada vez que se produzca una interrupción de teclado. Una página abarca el despliegue en el LCD del texto que el usuario visualiza además del conjunto de eventos que en ella el usuario puede realizar. Así, la función que despliega el texto de la primera página se llamará PAG1_R, la función que controla los eventos de la página uno se llamará EVENTP1 y de igual manera para las demás páginas.

El código principal, inicializa variables, configura puertos, inicializa el LCD, ejecuta el Auto-Test y luego de la comprobación del correcto funcionamiento de los periféricos, visualiza la página de presentación, inicializa interrupciones y visualiza la primera página; de tal manera que el microcontrolador queda en modo de espera hasta que suceda un evento el cual dispara una interrupción. Cabe señalar que el programa del microcontrolador permanece enclavado en un bucle, del cual sale únicamente a través de una interrupción.

Integración de los módulos.- Cada placa tiene 4 puntos de fijación, los mismos que son usados para unir a la tapa base del equipo mediante tornillos de 3mm de diámetro. En las Figuras 9 y 10 se visualiza la disposición de las placas dentro del equipo. Debido al tamaño de las placas y del equipo, se realizó doble nivel para disponer las placas, para lo cual se utilizó stands off de 2,56cm de alto.

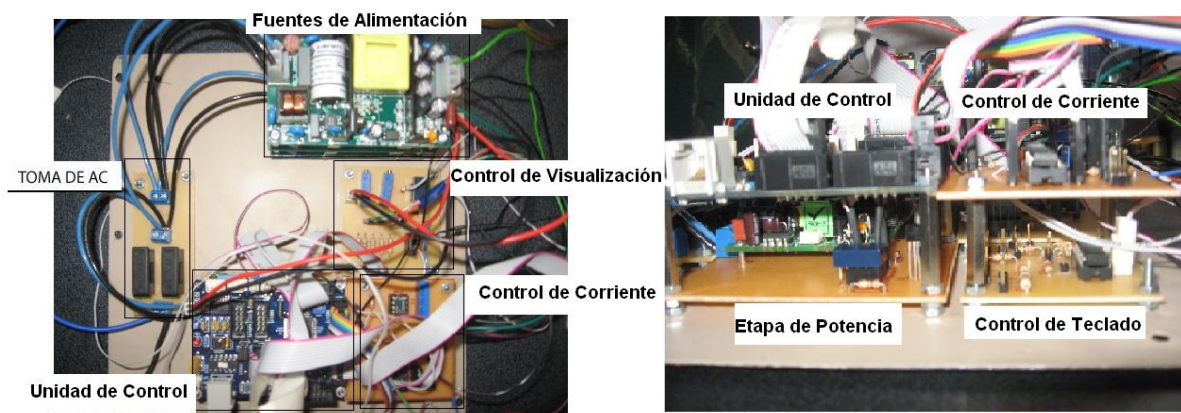


Figura 9. Vista superior y lateral de la integración



Figura 10. Equipo totalmente armado

4 PRUEBAS Y RESULTADOS

Exactitud en el Tiempo de Activación de la Señal:

Procedimiento de Medición

- a. Entre los puntos de conexión de los electrodos se conecta una resistencia de 1000 Ohmios.
- b. Se tomó como punto de medición la resistencia R2 (2200 Ohmios) que se encuentra conectada entre la terminal emisora del transistor y tierra, de la placa de potencia.
- c. Se programa el Tiempo en ON y OFF deseado.
- d. Se programa la Intensidad de Corriente y la Polaridad.
- e. Se realiza la medición, con un Osciloscopio.

El error porcentual de la prueba de medición del tiempo de activación es de 0,023%, valor que se encuentra aceptable para considerar a la onda generada como exacta.

Con el mismo circuito anterior se realizó la prueba de precisión, esta consistió en medir 10 veces el tiempo de activación de la señal para una misma configuración de tratamiento. Es decir, se realizaron los siguientes pasos:

- a. Encender el equipo.
- b. Configurar valores de tratamiento.
- c. Medir el tiempo de activación de la señal.
- d. Apagar el equipo.
- e. Esperar 2 min.
- f. Encender el equipo.
- g. Repetir los pasos 1 al 6 por 10 veces.

La configuración del tratamiento fue:

Tiempo ON: 1ms
Tiempo OFF: 1ms
Intensidad: 100uA
Polaridad: Positiva

El error porcentual de la intensidad de corriente es de 0,84%, siendo un error porcentual aceptable.

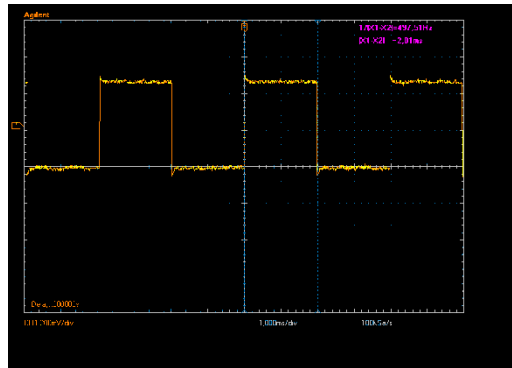


Figura 11. Formas de onda obtenidas

Con el mismo circuito anterior se realizó otra prueba de precisión, esta consistió en medir 10 veces la intensidad de corriente de la señal para una misma configuración de tratamiento. Es decir, se realizó los siguientes pasos:

- a. Encender el equipo.
- b. Configurar valores de tratamiento.
- c. Medir la intensidad de corriente.
- d. Apagar el equipo.
- e. Esperar 2 min.
- f. Encender el equipo.
- g. Repetir los pasos 1 al 6 por 10 veces.

La configuración del tratamiento fue:

Tiempo ON: 1ms
Tiempo OFF: 1ms
Intensidad: 300 μ A
Polaridad: Positiva

La desviación estándar de la prueba de precisión de la intensidad de corriente es de 0,10, valor que nos indica que el equipo es preciso en intensidad de corriente.

5 CONCLUSIONES

- En lo que se refiere al tratamiento de alta frecuencia sobre la piel y de acuerdo al trabajo de investigación realizado se concluye que la aplicación del tratamiento de alta frecuencia es un método efectivo y no invasivo para la administración de medicamentos.
- Como riesgo del tratamiento de alta frecuencia sobre la piel del ser humano, se identificó especialmente que debido a la acumulación de iones tanto positivos como negativos bajo el área de cada electrodo, el nivel de PH se incrementa provocando quemaduras.
- Se identificaron y aplicaron los requerimientos especificados en la norma IEC 60601-1 para un equipo médico de Clase I, tipo BF, de operación continua con protección nociva al agua del tipo común.
- Las pruebas realizadas al equipo de alta frecuencia e iontoforesis dieron los siguientes valores de error 0,023%, en lo referente a frecuencia y un error del 0,84%, en intensidad de corriente lo que muestra que es un equipo altamente confiable. Cabe señalar que las pruebas estipuladas en la IEC 60601-1 no fueron factibles de realizar debido a la carencia de los equipos estipulados en la misma norma, para realizarlas.
- El equipo se ha construido utilizando elementos de última tecnología, tales como el microcontrolador 18F8722, el mismo que es el más avanzado microcontrolador de la familia 18FXXX, fuentes conmutadas con calificación RHS y Pb-free, además que se utiliza una pantalla LCD para visualizar los menús de programación
- El equipo diseñado, no tiene ningún similar en el mercado pues integra dos frentes de aplicación: el médico y el cosmetológico, lo que demuestra la originalidad del proyecto y versatilidad en el diseño.
- La capacidad de programación de los tiempos ON y OFF proporcionan al usuario el completo control del equipo y prestan plena libertad de operación y exactitud, frente a otros equipos que tienen programas ya preestablecidos de operación limitando la capacidad del usuario profesional.
- A pesar de la gran gama de microcontroladores existentes en el mercado, la marca Microchip demostró seguir siendo la más accesible debido al bajo costo de herramientas de desarrollo así como también la variedad de tarjetas para sus microcontroladores que se pueden encontrar a un precio accesible.
- Debido a la exitosa ejecución del proyecto, se abre la posibilidad de seguir incursionando en el área de la aplicación de la Iontoforesis Transdérmica, la misma que hoy en día está en su apogeo por su característica no invasiva de tratamiento, especialmente en aplicaciones de monitoreo de pacientes. Las nuevas investigaciones se enfocan en el análisis de las sustancias que se pueden recoger mediante la iontoforesis, pues del mismo modo que se administra droga por un electrodo por el otro electrodo, debido a la fuerza de atracción de las cargas, se extrae otras sustancias provenientes del organismo.

6 REFERENCIAS

1. Busquets, Came, Unidades de dolor. Realidad Hoy, Reto para el Futuro. Primera edición, Academia de Ciències Mèdiques de Catalunya i de Balears, Barcelona, España, 2002.
2. Tesselar, Erik. Assessment of microvascular function by use of transdermal iontophoresis. Linköping University Faculty of Health Sciences, Sweden, 2007
3. Anand Subramony, J., Ashutosh Sharma, Phipps J.B., Microprocessor controlled transdermal drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 317, 1-6, 29 (2006).
4. Guyton, A. C., & Hall, J. E., Tratado de Fisiología, Médica, Décima Edición, Mac Graw Hill Interamericana Editores México D.F., México, 2001.
5. Rodríguez J., Electroterapia, Primera Edición, Editorial Medica Panamericana, Madrid, España, 2000.
6. Ching C.T.S., Camilleri I., Connolly P., A low-cost programmable device for versatile current delivery in iontophoresis applications, *Sensors and Actuators B*, 106, 534-540, 28 (2004).

RECONOCIMIENTO DE VOZ UTILIZANDO MODELOS OCULTOS DE MARKOV

Luis Miguel Rodríguez, Rubén León, Julio Larco.

Carrera de Ing. Electrónica, Escuela Politécnica de Ejército, Sangolquí, Ecuador.

RESUMEN: Este trabajo aborda el reconocimiento de voz utilizando Modelos Ocultos de Markov (HMM). Los HMM caracterizan de buena manera los fenómenos acústicos de las señales de voz, mediante sus dos etapas características. La primera etapa entrena los reconocedores en base a señales de voz tomadas de diferentes personas y la segunda etapa realiza el reconocimiento de los comandos de voz ingresados. Se implementó un sistema de reconocimiento de palabras aisladas utilizando HMM. Dicho sistema reconoce los dígitos del “cero” al “nueve” en el idioma castellano. Las señales de voz ingresadas al sistema son segmentadas por medio de “frames” o tramas, las que son caracterizadas espectralmente mediante la extracción de coeficientes cepstrales. Posteriormente, mediante el proceso de cuantización vectorial se obtiene una representación discreta de estos coeficientes. Esta representación discreta de las señales servirá para caracterizar cada palabra del vocabulario a reconocer mediante un HMM. En el entrenamiento, las representaciones discretas de las señales de voz generan un HMM por comando a ser reconocido en tanto que en el reconocimiento, la representación discreta de la señal extraída será evaluada utilizando cada HMM generado. El HMM que haya obtenido la mayor probabilidad es el que determina el comando reconocido. Las mejores tasas de acierto obtenidas por el sistema implementado fueron de 98 % en un ambiente dependiente del locutor y de 90 % en un ambiente independiente del locutor.

INTRODUCCION

En el mundo tecnológico actual, donde el procesamiento de información cada vez va incorporando nuevas técnicas y recursos para que los usuarios puedan realizar la comunicación de una manera más eficaz, y tomando en cuenta que el lenguaje hablado o de voz es el fundamental y más conveniente medio de comunicación entre individuos, el procesamiento de la voz ha trascendido en el campo de la investigación científica. El reconocimiento de voz, es uno de los campos de investigación en el área de procesamiento digital de señales, que abarca un área de estudio muy desafiante; y, que con la ayuda de los actuales recursos computacionales, se ha convertido en una herramienta útil para diferentes tipos de aplicaciones.

En el presente artículo se explica la tarea de reconocimiento de comandos aislados de voz utilizando los Modelos Ocultos de Markov (Hidden Markov Models), que son modelos que caracterizan las propiedades estadísticas de las señales. Previamente se detallará el preprocesamiento de señales, indispensable para caracterizar de una manera más robusta a la

señales de voz. Posteriormente, se dará una breve descripción de los Modelos Ocultos de Markov, para poder diseñar un sistema de reconocimiento de palabras aisladas. También se explicará el diseño y funcionamiento del sistema implementado, para finalmente presentar los resultados de las pruebas experimentales.

2 PREPROCESAMIENTO DE LAS SEÑALES

2.1 Muestreo y Cuantización

Según Nyquist, es necesaria una frecuencia de muestreo de por lo menos el doble del ancho de banda de la señal a caracterizar [3]. Debido a que las señales de voz poseen un ancho de banda característico de 4 KHz, frecuencias de 8 KHz en adelante son utilizadas para muestrear las señales de voz. La cuantización más comúnmente usada, es de 8 bits a 16 bits.

Para el sistema de reconocimiento de voz implementado se utilizó una frecuencia de muestreo de 11 KHz y una representación para la cuantización de 16 bits (65536 niveles).

2.2 Ventanas y bloques (frames)

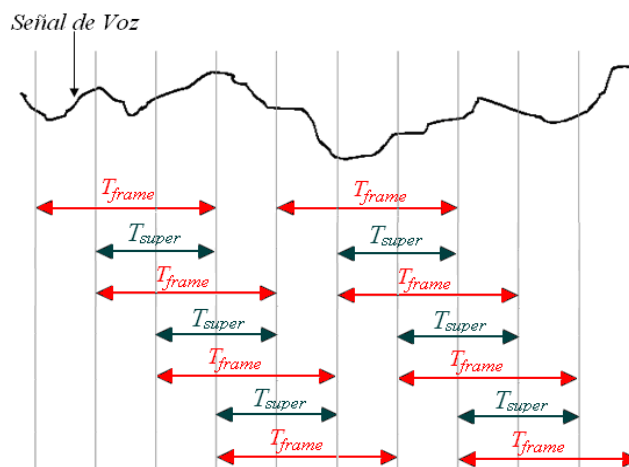


Figura 1. Separación de bloques de voz con traslapamiento.

En aplicaciones prácticas de procesamiento digital de señales, es necesario trabajar con bloques de intervalos pequeños de señal de una duración tal que la señal pueda ser considerada localmente estacionaria [2]. Para la señal de voz usualmente esta duración (o ancho de la ventana temporal) está dentro de un intervalo comprendido entre 10ms y 45ms. Independientemente los bloques son superpuestos o traslapados desplazándolos en una cantidad de muestras quedando una distribución como la mostrada en la figura 1. Donde T_{frame} representa la duración de cada uno de los frames, y T_{super} representa el tiempo de traslapamiento o superposición de un frame con respecto al otro.

Es conveniente a cada bloque o frame aplicarle una ventana del mismo tamaño para describir de mejor manera las características de variación temporal. Ventanas como la de Hamming y Hanning son las más utilizadas.

2.3 Coeficientes Cepstrales de Señales

Para obtener una representación espectral de las señales de voz se realiza una extracción de los coeficientes cepstrales de los bloques en que fue segmentada la señal de voz. Los coeficientes cepstrales se adquieren a partir de la transformada inversa de Fourier del logaritmo del espectro de potencia de la señal de voz. Pero, la extracción directa de dichos coeficientes requiere un elevado costo computacional, por lo que generalmente se procede a obtenerlos a partir de los coeficientes LPC (Linear Predictive Coding) [9]. La técnica utilizada para convertir los coeficientes LPC a coeficientes cepstrales es de tipo recursiva [1]. El vector de coeficientes LPC es definido por $[a_0 \ a_1 \ a_2 \ \dots \ a_p]$ y el vector de coeficientes cepstrales es definido por $[c_0 \ c_1 \ c_2 \ \dots \ c_p \ \dots \ c_{n-1}]$. La recursión es definida por las siguientes ecuaciones:

$$c_0 = \ln E^2 \quad (1)$$

$$c_m = -a_m + \frac{1}{m} \sum_{k=1}^{m-1} [-(m-k) \cdot a_k \cdot c_{(m-k)}] \quad 1 \leq m \leq p \quad (2)$$

$$c_m = \sum_{k=1}^{m-1} \left[\frac{-(m-k)}{m} \cdot a_k \cdot c_{(m-k)} \right], \quad p < m < n \quad (3)$$

donde E^2 representa el término de ganancia en el modelo LPC.

CUANTIZACION VECTORIAL

Las características espectrales que caracterizan las señales de voz son generalmente vectores. Se denotan los vectores espectrales como v_l , $l=1, 2, \dots, L$, donde cada vector espectral l es de dimensión p . El objetivo de la cuantización vectorial es el de construir un libro de código (codebook) de M codebook vectores de análisis que caractericen los L vectores espectrales propuestos. Para implementar el codebook de la cuantización vectorial se requiere: un grupo extenso de vectores de análisis espectral, v_1, v_2, \dots, v_L , quienes conforman el grupo de entrenamiento $L \gg M$ codebook (M codebook representa el número de vectores que representan el codebook.), una medida de similitud, o distancia, entre un par de vectores de análisis espectral de tal manera de agrupar los vectores del grupo de entrenamiento²; un procedimiento para determinar

² Generalmente la distancia utilizada es de tipo Euclidiana al cuadrado:

el centroide de cada uno de los grupos o clusters, y un procedimiento de clasificación para los vectores arbitrarios de análisis espectral de voz que escoja el vector del codebook más cercano al vector de entrada y use el índice del codebook como resultado de la representación espectral. La figura 2 muestra el diagrama de bloques de la estructura de entrenamiento y clasificación de cuantización vectorial. Donde $d(*,*)$ representa la distancia entre dos vectores.

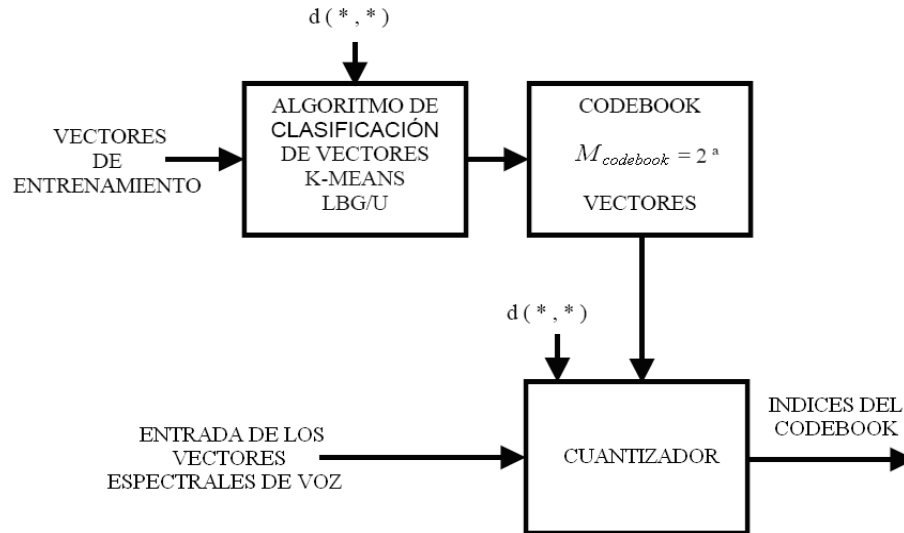


Figura 2. Diagrama de bloques de la estructura de entrenamiento y clasificación de cuantización vectorial.

Para generar de una forma adecuada el codebook de cuantizador vectorial es necesario que las señales de voz abarquen características en cuanto a rangos de edad, acentuación, género, velocidad de discurso, niveles, etc.

La manera en la cual un grupo de L vectores de entrenamiento puede ser agrupado o clasificado en un grupo de $M_{codebook}$ vectores de un codebook se da por medio del algoritmo de Lloyd o algoritmo de agrupamiento de K-means que escoge arbitrariamente $M_{codebook}$ vectores como parte del codebook, y mediante un procedimiento interactivo clasifica los vectores de entrenamiento con respecto al vector del codebook más cercano. Luego calcula el centroide de cada agrupación y lo actualiza como el nuevo valor del vector del codebook perteneciente a cada grupo. El procedimiento interactivo se realiza hasta que la distancia total de las distorsiones este por debajo de un umbral prefijado.

4 MODELOS OCULTOS DE MARKOV (HMM)

Los HMM (Hidden Markov Models) representan un tipo de modelos probabilísticos apropiados para secuencias estocásticas no estacionarias, con propiedades estadísticas que sufren transiciones aleatorias distintas entre un grupo de procesos estacionarios diferentes. Los HMM modelan una secuencia de observaciones como un proceso estacionario. Los HMM han sido utilizados ampliamente en aplicaciones como reconocimiento de patrones, patologías y de voz.

$$d(p_1, p_2) = \sum_n (x_i - y_i)^2 \quad \text{con} \quad \begin{cases} p_1 = x_1, x_2 \dots x_n \\ p_2 = y_1, y_2 \dots y_n \end{cases}$$

4.1 Modelos Ocultos de Markov discretos

Un HMM de observaciones de símbolos discretas es caracterizado por lo siguiente [3] [4]:

- a) N, Número de estados en el modelo. Los cuales son ocultos. A los estados individuales por notación se les etiquetará $\{1, 2, \dots, N\}$ y al estado en el intervalo de tiempo t como q_t .
- b) M, Número de símbolos distintos de observación por estado. Por notación a estos se les denominará como $V = \{v_1, v_2, \dots, v_M\}$.
- c) La distribución de probabilidades de transición de estados $A = \{a_{ij}\}$ donde:

$$a_{ij} = P[q_{t+1} = j | q_t = i], \quad 1 \leq i, j \leq N \quad (4)$$

- d) La distribución de probabilidad de símbolos de observación en el estado j, $B = \{b_j(k)\}$, en donde:

$$b_j(k) = P[o_t = v_k | q_t = j], \quad 1 \leq k \leq M \quad (5)$$

- e) La distribución de estado inicial $\pi = \{\pi_i\}$, donde:

$$\pi_i = P[q_1 = i], \quad 1 \leq i \leq N. \quad (6)$$

Una descripción completa de un HMM requiere la especificación de tres grupos de medidas de probabilidad A, B y π . Para indicar el grupo completo de parámetros del modelo se utilizará la siguiente notación:

$$\lambda = (A, B, \pi) \quad (7)$$

La Figura 3 muestra un ejemplo de un Modelo Oculto de Markov de 5 estados.

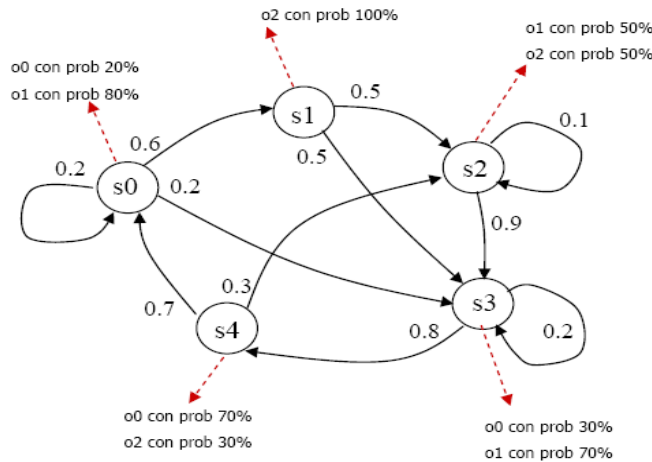


Figura 3. Ejemplo de un Modelo Oculto de Markov

Para que se pueda utilizar los HMMs se deben solucionar tres problemas fundamentales, y pueden ser resueltos como en [2] [3] [4]. Tales problemas son:

Problema 1: Dado el modelo $\lambda = (A, B, \pi)$ y la secuencia de observaciones $\mathbf{O} = (\mathbf{o}_1, \mathbf{o}_2, \dots, \mathbf{o}_T)$, calcular la probabilidad de que se de la secuencia de observaciones dado el modelo λ , $P(\mathbf{O}|\lambda)$.

Problema 2: Dado el modelo $\lambda = (A, B, \pi)$ y la secuencia de observaciones $\mathbf{O} = (\mathbf{o}_1, \mathbf{o}_2, \dots, \mathbf{o}_T)$, encontrar la secuencia de estados correspondientes $\mathbf{Q} = (q_1, q_2, \dots, q_T)$ que mejor explique las observaciones. Se intenta descubrir la parte oculta del modelo para encontrar la secuencia de estados correcta.

Problema 3: Dada la secuencia de observaciones $\mathbf{O} = (\mathbf{o}_1, \mathbf{o}_2, \dots, \mathbf{o}_T)$, encontrar los parámetros del modelo $\lambda = (A, B, \pi)$ que maximicen $P(\mathbf{O}|\lambda)$.

4.2 Tipo de HMM utilizado en reconocimiento de voz

El HMM utilizado en reconocimiento de voz es el denominado “*Modelo de Barkis*”. Este modelo es llamado Modelo izquierda-derecha porque la secuencia de estados subyacente asociada con el modelo, tiene la propiedad que mientras el tiempo incrementa, el índice de estado incrementa o permanece el mismo, lo que hace que los estados del sistema proceden de izquierda a derecha.



Figura 4. Modelo izquierda-derecha de 4 estados

5 DETECCIÓN DE COMIENZO Y FIN DE PALABRA UTILIZANDO HMM.

Uno de los problemas fundamentales en el reconocimiento de palabras aisladas es la detección de la presencia de voz y su distinción del ruido de fondo. Mediante la detección de comienzo y fin de comando³ se proporciona ciertas ventajas en el procesamiento de señales en tiempo real, que son: eliminación de periodos largos de silencio, reducción en el procesamiento, descartar falsas locuciones, entre otras.

La característica fundamental de los HMMs es que estos son modelos de aprendizaje que se adaptan a las condiciones en las que determinado fenómeno se lleva a cabo. La idea propuesta para detectar el comienzo y fin de palabra mediante HMM, se da en torno a adecuar las condiciones de ruido de fondo y señal hablada utilizados para entrenarlas mediante HMM y obtener un HMM genérico para dicho objetivo. La figura 5 muestra el diagrama de flujo para la generación del HMM que realice la tarea de detección de comienzo y fin de palabra.

La base de datos posee las señales de voz puras así como también las características estadísticas de las señales. Las características estadísticas de las señales que mejor se adaptan son los coeficientes cepstrales anteriormente analizados. En este caso se utilizó doce coeficientes cepstrales

³ En inglés es denominado *Endpoint Detection*.

por *frame*. Cada *frame* de señal de voz posee una duración de 30 mseg. y se encuentra traslapado o superpuesto por 20 mseg. con respecto a los *frames* adyacentes. De esta manera cada *frame* de señal de voz estará representado por un vector de dimensión 12 que contiene los coeficientes cepstrales mencionados. Todos los vectores de las señales de voz de entrenamiento (base de datos) generarán un *codebook* de cuantización vectorial que servirá para entrenar el HMM que cumpla la detección de comienzo y fin de palabra.

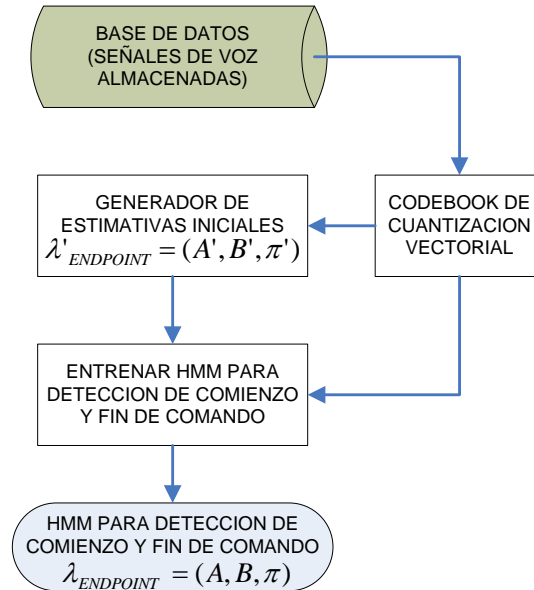


Figura 5. Diagrama de flujo para la generación del HMM para detección de comienzo y fin de palabra

El tipo de HMM utilizado para realizar la detección de comienzo y fin de palabra se muestra en la figura 6. En esta figura se toma en cuenta que el primero y último estado caracterizarán los ruidos de fondo anterior y posterior a la señal de voz respectivamente, y los tres estados intermedios caracterizarán la señal de voz hablada mediante una segmentación uniforme de esta señal para cada uno de los estados.

Una vez ya generado el HMM que cumpla la tarea de detección de comienzo y fin de palabra ($\lambda_{ENDPOINT}$) se puede realizar la tarea de detección de comienzo y fin de palabra. La figura 7 presenta el diagrama de flujo del proceso de detección de comienzo y fin de comando usando HMM.

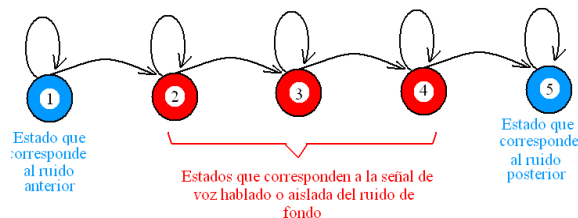


Figura 6. Modelo HMM de Barkis utilizado para la generación del sistema de detección de comienzo y fin de comando.

El procedimiento mostrado indica que a la señal de voz ingresada inicialmente se la caracteriza espectralmente mediante la extracción de coeficientes cepstrales de sus *frames*; para posteriormente obtener una representación discreta de la misma realizando el procedimiento de cuantización

vectorial. A la señal de voz ya cuantizada, representada por símbolos de observación, por medio del algoritmo de Viterbi se detecta la secuencia de estados más probable que genera el modelo $\lambda_{ENDPOINT}$.

Finalmente, una vez ya obtenida la secuencia de estados más probable, se procede a identificar el punto de comienzo que no es más que el instante de tiempo (*frame*) en que comienzan los estados que corresponden a la señal de voz hablada (instante de tiempo en el que comienza el estado 2 de la figura 6. 23); y, el punto final que corresponde al último instante de tiempo de ocurrencia de dichos estados (instante de tiempo que termina el estado 4 de la figura 6).

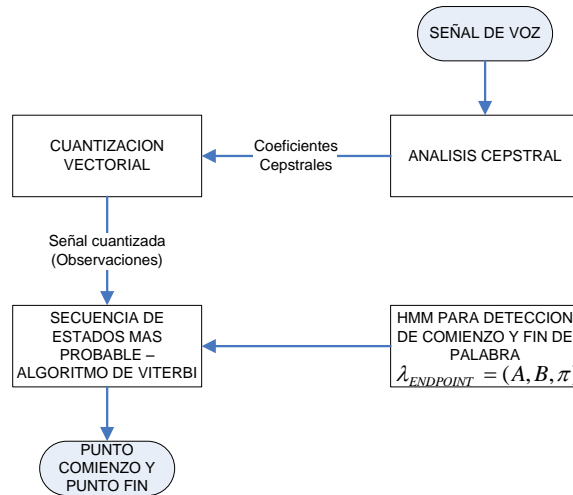


Figura 7. Diagrama de flujo del proceso de detección de comienzo y fin de comando usando HMM.

La figura 8 muestra la gráfica de detección de comienzo y fin de palabra de la señal de voz que corresponde al comando hablado “dos”.

6 RECONOCIMIENTO DE PALABRAS AISLADAS UTILIZANDO HMM DISCRETOS

En la tarea del reconocimiento de palabras o comandos aislados de voz la máquina deberá distinguir la palabra pronunciada de un vocabulario previamente entrenado, en este caso utilizando los modelos ocultos de Markov (HMM). Los HMM deben manejar las etapas de entrenamiento y reconocimiento. La figura 9 muestra un diagrama de bloques del proceso general de dichas etapas.

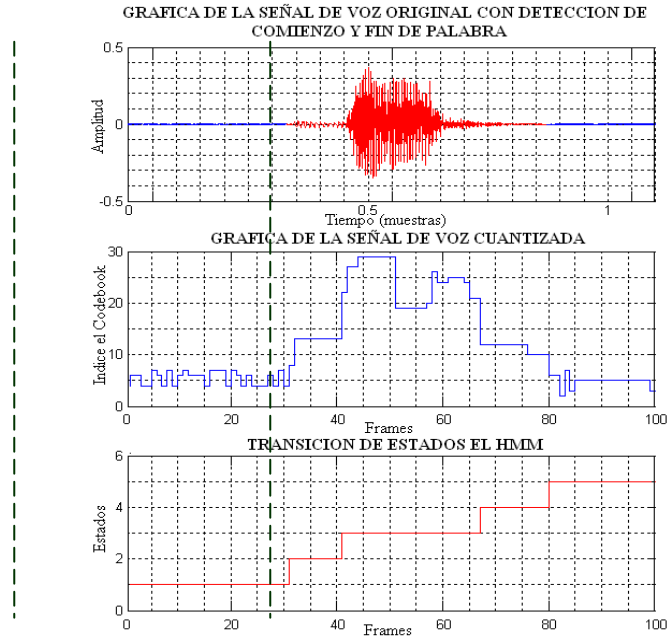


Figura 8. Gráfica de la detección de comienzo y fin de comando del comando hablado “dos” utilizando HMM.

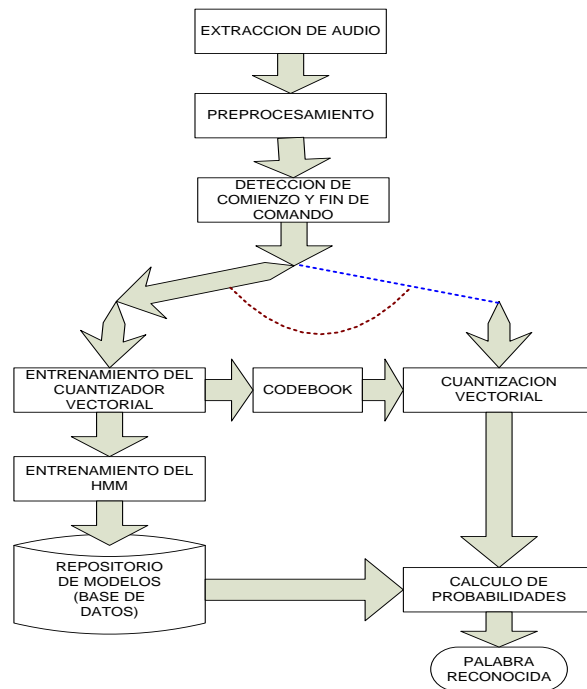


Figura 9. Diagrama de bloques del proceso general de reconocimiento y entrenamiento de palabras.

El preprocesamiento obtiene características descriptivas del proceso de la señal de voz humana y trata de reducir la cantidad de información a manipular y que incluye muestreo y cuantización escalar⁴, separación en frames, ventanamiento, y extracción de los coeficientes cepstrales. Luego se realiza el proceso de detección de comienzo y fin de palabra⁵.

6.1 Entrenamiento individual de palabras.

Para el proceso de entrenamiento se utiliza un modelo de Barkis, que por lo general es de 5 a 15 estados para caracterizar palabras individuales [3].

Las estimativas iniciales para la generación del modelo de Barkis utilizado fueron obtenidas mediante la segmentación uniforme de la señal de voz en torno al número de estados (a cada estado le corresponde un segmento uniforme del comando de voz a analizar), y mediante la verificación de ocurrencia de eventos u observaciones se calcula el valor de la matriz B característica de las observaciones de los HMM. En cuanto a la matriz A, se impone estimativas uniformes para cada componente, que cumplan los requerimientos estocásticos del tipo de modelo a utilizar.

La figura 10 muestra la gráfica de la probabilidad como función de los parámetros del modelo en el procedimiento interactivo en búsqueda de la estimación de parámetros (Entrenamiento del sistema) del HMM óptimos en base a unas buenas estimativas iniciales.

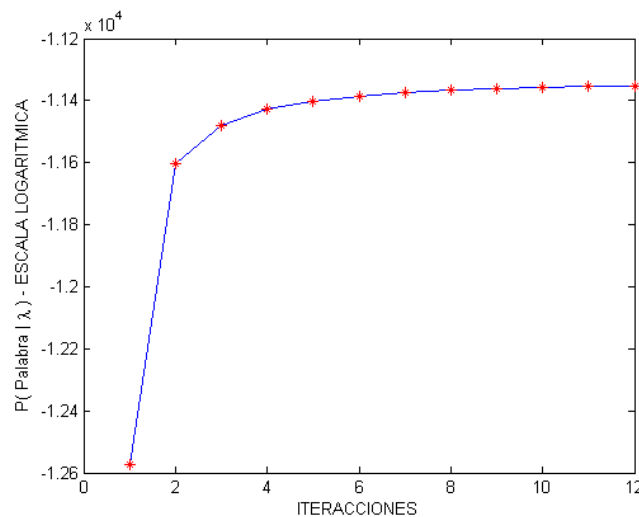


Figura 10. Probabilidad como función de los parámetros del modelo en el procedimiento interactivo de entrenamiento de un HMM

Los parámetros del HMM convergen en la doceava iteración. Los valores de probabilidad son tomados en escala logarítmica debido a que su resultado en escala normal muchas veces al ser tan pequeño no puede ser reconocido por la sensibilidad de la máquina. Luego de realizado el entrenamiento, se obtiene un modelo λ para cada una de las palabras entrenadas, los cuales serán guardados en forma permanente en un repositorio de modelos (Base de datos) para su posterior uso en el proceso de reconocimiento. Regresando al ejemplo de palabras a entrenar anteriormente propuesto se tendrán diez modelos λ generados:

⁴ En el caso particular a analizar 11 KHz de muestreo y 16 bits de cuantización.

⁵ En el sistema propuesto, esta detección se la realiza por medio de HMM. Existen otros algoritmos propuestos en las referencias [5], [6], [7], [8].

- $\lambda(\text{"cero"})$
- $\lambda(\text{"uno"})$
- $\lambda(\text{"dos"})$
- $\lambda(\text{"tres"})$
- $\lambda(\text{"cuatro"})$
- $\lambda(\text{"cinco"})$
- $\lambda(\text{"seis"})$
- $\lambda(\text{"siete"})$
- $\lambda(\text{"ocho"})$
- $\lambda(\text{"nueve"})$

Todos estos diez modelos generados deben ser guardados en el repositorio de modelos. De la misma manera el entrenamiento genera el *codebook* necesario para las palabras a reconocer, que en el caso propuesto sería:

CODEBOOK ("cero", "uno", "dos", "tres", "cuatro", "cinco", "seis", "siete", "ocho", "nueve").

6.2 Reconocimiento individual de palabras.

Para que se realice el reconocimiento individual de palabras, el proceso recibe como entrada una palabra, la cual se la preprocesa para caracterizarla en forma adecuada. Posteriormente se realizará la cuantización de vectores ceptrales⁶ para obtener la secuencia de observaciones discretas que serán interpretadas por los HMM existentes en el repositorio común, y de ahí se evaluará cual es la probabilidad de que cada uno de los modelos haya generado esa palabra: $P(\text{palabra} | \lambda X)$. Para el ejemplo propuesto, el reconocedor obtendrá:

- $P(\text{palabra} | \lambda(\text{"cero"}))$
- $P(\text{palabra} | \lambda(\text{"uno"}))$
- $P(\text{palabra} | \lambda(\text{"dos"}))$
- $P(\text{palabra} | \lambda(\text{"tres"}))$
- $P(\text{palabra} | \lambda(\text{"cuatro"}))$
- $P(\text{palabra} | \lambda(\text{"cinco"}))$
- $P(\text{palabra} | \lambda(\text{"seis"}))$
- $P(\text{palabra} | \lambda(\text{"siete"}))$
- $P(\text{palabra} | \lambda(\text{"ocho"}))$
- $P(\text{palabra} | \lambda(\text{"nueve"}))$

Finalmente, una vez obtenidas todas las probabilidades asociadas con cada modelo de palabra almacenados en el repositorio, se toma la decisión de cuál es el modelo con mayor probabilidad calculada. Habiendo detectado cual es el modelo que más probablemente haya generado la palabra de entrada y sabiendo cual es la palabra asociada a dicho modelo, el sistema puede determinar cuál es la palabra reconocida. La figura 11 muestra el diagrama de bloques del proceso de reconocimiento de palabras aisladas anteriormente descrito.

⁶ Valores típicos usados son 128 a 512 vectores en el *codebook*.

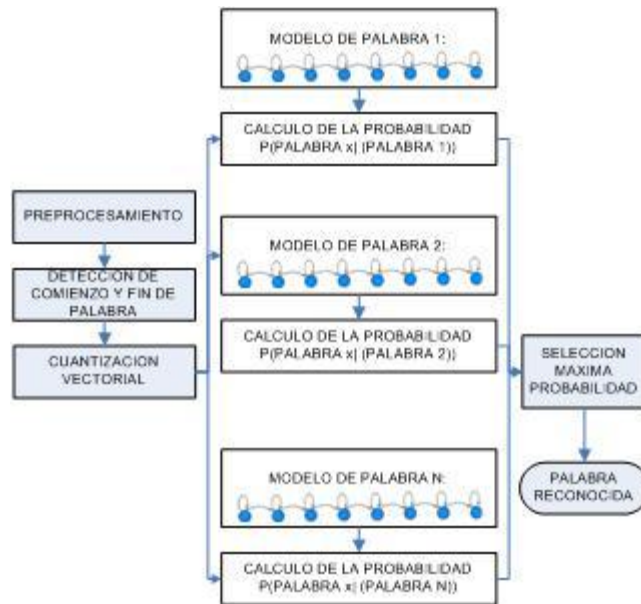


Figura 11. Diagrama de bloques del proceso de reconocimiento de palabras aisladas.

Para que el proceso de reconocimiento sea adecuado y se obtenga un error de reconocimiento mínimo se deben tener en cuenta aspectos muy importantes como: la estimación inicial de los parámetros de los modelos (A , B y π), realizar entrenamientos multiobservación para extraer mayor información de caracterización de cada palabra, y se deben implementar técnicas de escalamiento para evitar que los cálculos produzcan un *underflow*⁷.

6.3 Reconocedor de palabras aisladas implementado.

Se implementó un sistema de reconocimiento de voz que reconoce los dígitos del “cero” al “nueve” en el idioma castellano, con las siguientes características:

- La frecuencia de muestreo de las señales de voz grabadas es de 11 KHz y 16 bits/muestra
- Ambiente de extracción de las señales de voz libre de ruido (Condiciones Ideales).

Fragmentación de las señales de voz en bloques o *frames* de 30 mseg. con superposición o traslapamiento de 20 mseg.

La representación de las señales de voz para su caracterización se la realizó por medio de 12 componentes cepstrales por bloque o frame.

⁷ *Underflow* se refiere a sobreflujo de datos

La figura 12 presenta la gráfica de resultados de un reconocedor de palabras aisladas generado por el sistema implementado. Ahí se presenta el gráfico de probabilidades de los modelos de los comandos a reconocer en escala logarítmica.

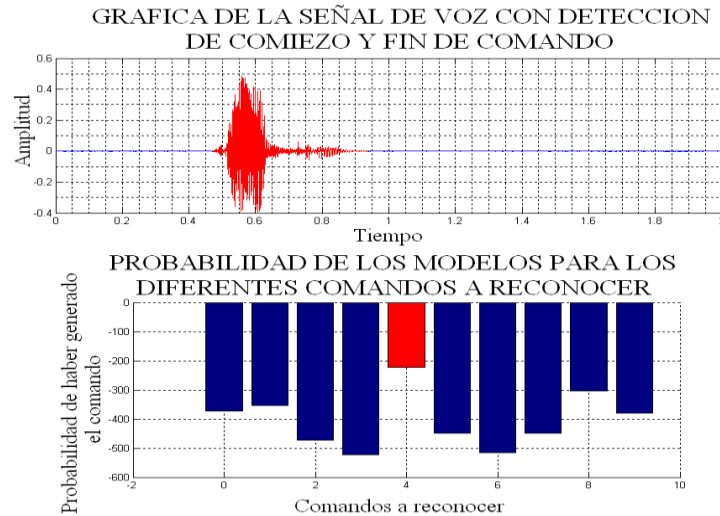


Figura 12. Gráfica de los resultados del reconocedor de palabras aisladas implementado ante la señal de voz del comando “cuatro”.

6.4 Pruebas Experimentales

Las siguientes gráficas muestran los resultados de tazas de aciertos para diferentes sistemas de reconocimiento de voz modificando los diferentes parámetros característicos de dichos sistemas (Número de personas que entrenaron los reconocedores, Número de estados en el HMM, Número de vectores utilizados en el codebook de cuantización vectorial).

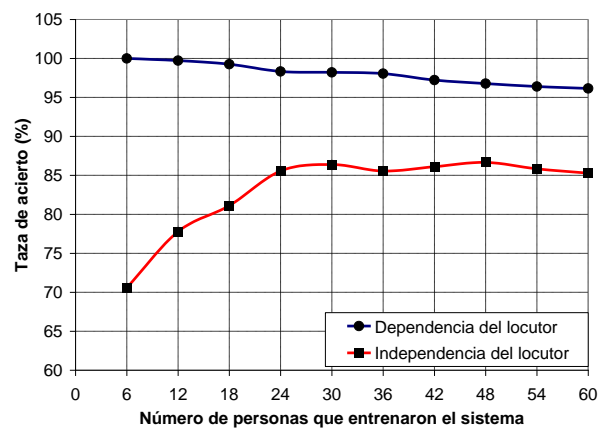


Figura 13. Taza de acierto vs. el número de personas que entrenaron los sistemas. Cuantizador de 512 vectores y 8 estados de los HMM.

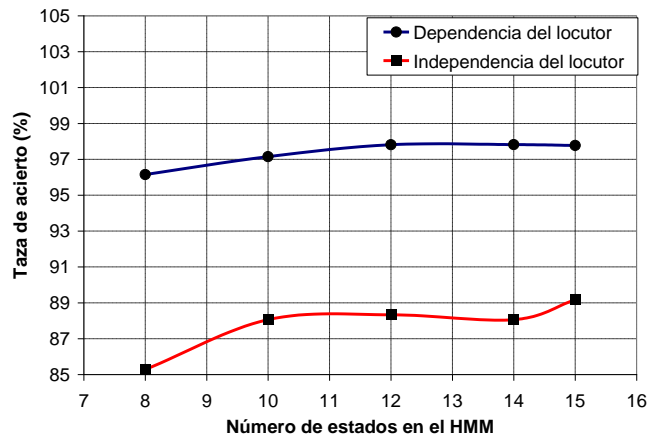


Figura 14. Taza de acierto vs. el número de estados en los HMM. Cuantizador de 512 vectores y fueron entrenados por 60 personas.

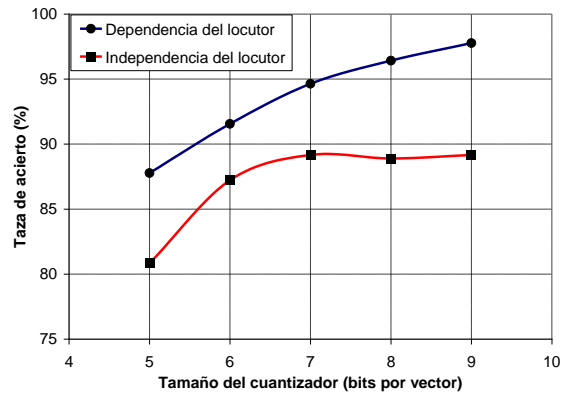


Figura 15. Taza de acierto vs. el tamaño del cuantizador (bits por vector). Los reconocedores fueron entrenados por 60 personas y utilizaron 15 estados en los HMM.

Los sistemas más robustos son los que utilizan mayor número de personas que entrenan el sistema, mayor número de vectores en la cuantización vectorial y mayor número de estados en la representación de cada HMM. Pero hay que tomar en cuenta que también se incrementa la carga computacional. Finalmente el sistema que ofrece mejores resultados obtuvo un grado de acierto aproximado de 98% tomando en cuenta la dependencia del locutor y 90% tomando en cuenta la independencia del locutor.

CONCLUSIONES

- El presente trabajo mostró de manera efectiva el desempeño de los sistemas de reconocimiento de voz mediante los Modelos Ocultos de Markov. Estos modelos tienen carácter adaptable a diversas condiciones, según la ocurrencia de eventos. Se logró determinar que a medida que se incrementan los eventos en la etapa de reconocimiento de los

HMM, el sistema de reconocimiento funciona mejor ante diversas situaciones (mayor número de personas que entrenaron los sistemas, mayor número de vectores en la cuantización vectorial, mayor número de estados en los HMM).

- Finalmente los Modelos Ocultos de Markov, en la actualidad son ampliamente utilizados en lo que se refiere a reconocimiento y detección. Esto se puede notar en aplicaciones de radares adaptativos, reconocimiento de patrones estadísticos, reconocimiento de gestos manuales y faciales mediante tomas de video, etc. Por lo tanto el campo de aplicación de los HMM es extenso.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Papamichalis, Panos E. *Practical Approaches to Speech Coding*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall, 1987.
2. Deller, John; Hansen, John y Proakis, John, *Discrete Time Processing of Speech Signals*, IEEE Edition, IEEE Press Editorial Board, New York, 2000.
3. Rabiner, Lawrence, y Juang, Biing-Hwang, *Fundamentals of Speech Recognition*, Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall Press. New Jersey, 1993.
4. Rabiner, Lawrence, A tutorial on hidden Markov models and selected applications in speech recognition, *Proceedings of the IEEE*, 77, 2, 257–286(1989).
5. Rabiner, Lawrence y Sambur, M.R., An Algorithm for Determining the Endpoints of Isolated Utterances, *The Bell System Technical Journal*, 54, 2, 297-315(1975)
6. Van Gerven, Stefaan, y Xie, Fei, A Comparative Study of Speech Detection Methods, K. U. Leuven, Department of Electrical Engineering – ESAT, Belgium.
7. Zhang, Yiyi; Zhu, Xiaoyan; y Hao, Yu. A Robust and Fast Endpoint Detection Algorithm for Isolated Word Recognition, *IEEE International Conference on Intelligent Processing Systems*, Beijing – China, Octubre 28, 1997.
8. Shen, Jia-lin; Hung, Jieh-weih; y, Lee, Lin-shan, Robust Entropy-based Endpoint Detection for Speech Recognition in Noisy Environments. Institute of Information Science, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, China.
9. Rodríguez Porcheron, Daniel y Faúndez Zanuy, Marcos, Diferentes Inicializaciones en la Generación de Codebooks para Identificación Automática de Locutores, Departamento de Teoría de la Señal y Comunicaciones, Escuela Universitaria Politécnica de Mata.

Método de estimación para Arquitecturas de Software mediante modelos conceptuales y generación de prototipos

G. Raura, T. Gualotuña, T. Valenzuela, H. Muñoz

Departamento de Ciencias de la Computación, Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador

RESUMEN: En el complejo mundo del desarrollo de software se resalta como principal métrica para estimar el tamaño de un sistema, al indicador Punto de Función (PF) definido por Allan Albrecht a finales de la década del setenta. No cabe duda que la información entregada por este indicador es importante al momento de estimar aspectos funcionales en el desarrollo de productos de Software; sin embargo esta técnica no contempla los aspectos complementarios a la funcionalidad, como es la definición de una Arquitectura de Software que asegure el cumplimiento de patrones de diseño, escalabilidad, altos niveles de reusabilidad, etc. Algunos de estos aspectos son incluidos en modelos de estimación que toman como base los Puntos de Función, destacándose al modelo COCOMO propuesto por Barry Boehm; sin embargo la determinación del valor de éstos factores generalmente está sujeta a la experiencia del equipo de desarrollo.

En el presente proyecto se presenta un método alternativo denominado Model Prototype Estimation (MPE), con el objetivo principal de determinar en etapas tempranas de desarrollo, el tamaño de los sistemas considerando a la arquitectura como factor determinante en la calidad del software. El método es un híbrido de estimación, que fusiona las técnicas de conteo de Puntos de Función aplicadas a un Modelo Conceptual, el cálculo de líneas de código (SLOC) mediante la generación de un Prototipo del sistema y la estimación del esfuerzo con el Modelo COCOMO.

Introducción

El desarrollo de aplicaciones bajo el paradigma orientado a objetos propuesto por Booch (1994), Jacobson (1992), Rumbaugh (1991) y otros, se orientan hacia el logro de requerimientos funcionales, sin prestar mayor atención a los requerimientos no funcionales o atributos de calidad, por lo que ha emergido una disciplina relativamente nueva en la ingeniería de software denominada arquitectura de software (Losavio 2006) [3].

El desarrollo del software moderno se basa cada vez más en un enfoque centrado en la arquitectura, existiendo propuestas como RUP (Rational Unified Process) (Krutchen, 2000), Bosch (Bosch, 2000) y ATAM (Attribute Tradeoff Análisis Method) (Kazman, Klein, Barbacci, Longstaff, Lipson y Carriere, 1998), que incluyen como factor determinante en la toma de decisiones a la calidad en el producto influenciados por la arquitectura.

De acuerdo a la IEEE Std 1471-2000 [7], se define una arquitectura de software como “la organización fundamental de un sistema formada por sus componentes, las relaciones entre ellos y el contexto en el que se implementarán, y los principios que orientan su diseño y evolución”, es decir la arquitectura aporta una visión abstracta del sistema de alto nivel, donde el detalle de cada uno de los módulos definidos, se pospone para etapas posteriores de diseño (Casanovas, 2004) [8].

Cuando el tamaño de los sistemas se incrementa, los algoritmos y las estructuras de datos no representan el mayor problema, siendo la arquitectura la que encierra el mayor reto para los ingenieros de software (Garlan, 1993) [9]. Entre los temas a resolver están los protocolos de comunicación, sincronización y acceso datos; asignación de responsabilidades a los elementos de diseño, distribución física; escalabilidad y el rendimiento; por mencionar algunos.

La determinación del tamaño de los sistemas, es uno de los factores claves dentro de las actividades de la gestión de proyectos, siendo el número de líneas de código SLOC (Source Lines Of Code), una métrica que puede establecer la magnitud del sistema; sin embargo esta medida ha

sido criticada básicamente por su dependencia del lenguaje, dificultad para su uso en etapas tempranas de desarrollo y por la no existencia de un consenso para su definición.

Para solventar este inconveniente, Allan Albrtech (1984) [1], propone la métrica de Punto de Función (PF), en procura de obtener una estimación del tamaño del software “independiente de la tecnología utilizada para su desarrollo y dependiente, únicamente de la funcionalidad del sistema”. Por tanto, el método no considera a la arquitectura del software para su medición.

La determinación del tamaño del software constituye el primer paso en la estimación, existiendo además de la estimación por analogía, modelos más formales orientados a determinar el esfuerzo, tiempo y costo de desarrollo de los proyectos. Se destaca el modelo COCOMO (CONstructive COSt MODEL) definido por Barry Boehm como el más usado en el proceso de estimación (Roy, 1998) [12]. En su primera versión: COCOMO81, se utilizan las líneas de código como base para la estimación; en tanto que su versión más reciente: COCOMOII, se incorpora además del tamaño en SLOC, al número de puntos de función dentro de sus modelos de diseño anticipado y post-arquitectura.

Si se examinan los factores de escala e indicadores de costo en el proceso de estimación de COCOMOII, el esfuerzo para desarrollar una arquitectura de software está vinculado a estos parámetros. Troy (Troy, 2007), hace un análisis detallado de los mismos con respecto a su influencia en el desarrollo de sistemas centrados en la arquitectura y su relación con los riesgos.

El efecto exponencial y multiplicativo que tienen estos factores dentro de la ecuación de COCOMOII, no son una medida del todo objetiva ya que están sujetos a la experiencia del estimador, haciendo que la efectividad del modelo mucho dependa de su conocimiento previo, y por consiguiente dando lugar a la probabilidad de existencia de un margen de error muy significativo, sobre todo cuando la arquitectura de software es considerada como un factor decisivo en la calidad del sistema.

Se plantea como hipótesis entonces que es posible medir el tamaño de un software considerando tanto su arquitectura y los requisitos funcionales en etapas tempranas de desarrollo.

Para el efecto se plantea un método denominado Model Prototype Estimation (MPE) como un híbrido entre el uso de modelos conceptuales, la generación de un prototipo, la estimación por puntos de función y el cálculo de líneas de código que permita determinar el esfuerzo mediante el modelo COCOMOII. El método es aplicado a diferentes casos de estudio, y los resultados obtenidos bajo este enfoque se presentan como base para futuros estudios de validación.

En este artículo, se define en primer lugar el método, seguidamente se presentan y analizan los resultados obtenidos y finalmente se indican las conclusiones y bibliografía correspondiente.

ESTIMACIÓN BASADA EN MODELOS CONCEPTUALES, PUNTOS DE FUNCIÓN Y LÍNEAS DE CÓDIGO. MPE (Model Prototype Estimation)

El método que se describe, se centra principalmente en conseguir una estimación temprana en el desarrollo de software que permita medir en base al número de líneas de código, el tamaño de un sistema que considere a la arquitectura como principal atributo de calidad. La figura 1, muestra gráficamente la secuencia del proceso y a continuación se describe cada uno de los pasos:

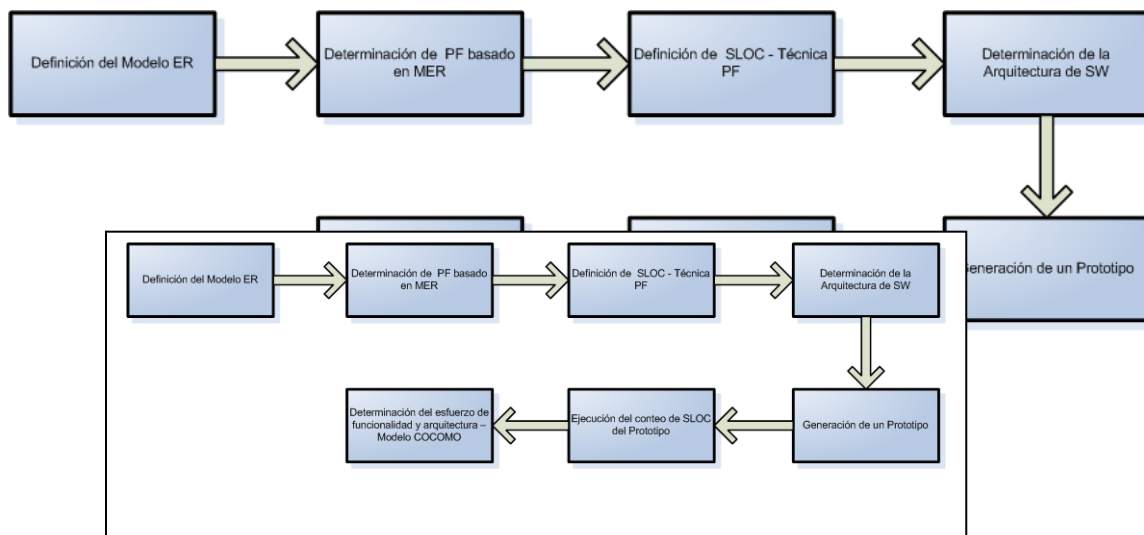


Figura 1. Proceso del modelo MPE

Definición del Modelo Conceptual (Entidad- Relación)

Los modelos conceptuales son una técnica muy útil durante el proceso de especificación de requisitos, básicamente permiten modelar el dominio del problema mediante el uso de una ontología (lenguaje pseudoformal compuesto de un léxico y una sintaxis).

En la literatura enfocada al análisis de requisitos, se distinguen entre modelos conceptuales y modelos de sistema, diferenciándolos en que los primeros describen el universo del discurso, en tanto que los segundos modelan el futuro sistema a construirse; por lo que, en el estudio presentado vale mencionar que se utilizaron modelos de sistema reales, ya que el desarrollo de prototipos exigen un alto grado de precisión y por tanto formalismo para ser realmente útiles.

El uso del modelo Entidad – Relación (ER) como modelo conceptual ha sido seleccionado para el desarrollo del método; éste permite abstraer las entidades y sus asociaciones en el dominio del discurso, generando una vista del sistema que puede ser interpretada desde la perspectiva de los puntos de función, si se incorpora a cada entidad, las operaciones básicas que pueden ser realizadas sobre ellas. Dichas operaciones conocidas como CRUD (Create Read Update Delete), serán la base para la cuenta de los Puntos de Función y la generación del prototipo que las implemente.

Determinación de puntos de función (PF) basados en el modelo conceptual (ER)

La determinación de PF se basa en el método de conteo de Albrecht (1984) [1], tomando como fuente de análisis al modelo ER en lugar de la especificación de los requisitos funcionales del sistema. Para cada entidad se asume como funciones de entrada y salida de datos a las operaciones de creación, eliminación modificación y consulta (CRUD).

Si se aplica formalmente la técnica propuesta por Albrecht, esto constituye una aproximación a la medición del sistema que no depende de la medición funcional desde la perspectiva del usuario, pero se justifica en razón de que lo que se desea es una estimación temprana, donde los requisitos funcionales generalmente no están muy claros o completos, pero ya se puede tener una visión conceptual del sistema que puede ser modelado en un diagrama Entidad - Relación. Con esta variante será factible además, que el prototipo sea generado automáticamente y por consiguiente se pueda determinar su número de líneas de código.

Con estas consideraciones, el proceso de cuenta de Archivos Lógicos Internos (ILF), puede ajustarse al método descrito por Albrecht mismo que actualmente es mantenido y documentado por la internacional Function Point Users Group (IFPUG) [13] (IFPUG,1999) [14] (IFPUG,2001).

El proceso de conteo de Puntos de Función, utilizado en esta propuesta, se resume a lo siguiente:

a. Cada entidad del modelo se cuenta como un Archivo Lógico Interno (ILF). Para determinar la complejidad, se cuenta cada atributo como un Tipo de Dato Elemental (DET) que posee un único grupo de datos relacionados (RET), aplicando la tabla propuesta en el método de conteo de Albrecht para los ILFs [13].

b. Por cada entidad, se cuentan las operaciones de Creación, Actualización, y Eliminación como tres Entradas Externas (EI). Se determina la complejidad para la Creación y Actualización contando cada atributo de la entidad como un Tipo de Dato Elemental (DET) y sumando un DET adicional por el elemento que desencadena la acción (botón de comando en la interfaz de usuario). Para el caso de la Eliminación, se cuentan como DET's a cada atributo clave de la entidad sumando igualmente un DET adicional por el elemento que desencadena la acción. Finalmente, se cuentan el número de relaciones por cada entidad y se obtienen el número de Tipos de Archivos Referenciados (FTR).

c. Por cada entidad, se cuenta una consulta externa (EQ) como operación de lectura. Se determina la complejidad para las EQ de la misma forma como se define en las EI, pero a diferencia de éstas, se aplica la tabla definida por Albrecht para las EQ [13]:

d. Se asume que el sistema no tendrá archivos de interfaces externas (EIF) y tampoco se generarán salidas externas (EO), en virtud de que el prototipo generará todo el código necesario por cada entidad del modelo sin que sea necesario referenciar a entidades externas al dominio y que ninguna de las funciones CRUD, producirán datos calculados.

Finalmente, se determina el total de Puntos de Función sin ajustar (UFP) sumando y ponderando los resultados en base a la tabla definida por Albrecht [13].

Determinación del número de líneas de código producidas por punto de función.

La técnica de Puntos de Función, establece un mecanismo de transformación entre líneas de código por cada PF denominado “backfiring”. Esto conduce a la utilización de una tabla que es el punto donde convergen la funcionalidad y la tecnología definida por un lenguaje de desarrollo. De esta decisión tecnológica, depende en mucho grado el esfuerzo requerido para implementar la funcionalidad de la aplicación; así en la siguiente tabla podemos apreciar los equivalentes entre puntos de función sin ajustar y cantidad de líneas de código estimados para diferentes lenguajes de programación.

Tabla 1. Líneas de código por punto de función de acuerdo al lenguaje.

LENGUAJE	SLOC / UFP
Ada	71
Al Shell	49
APL	32
Assembly	320
Assembly (Macro)	213
ANSI / Quick/Turbo Basic	64

Basic - Compiled	91
Basic Interpreted	128
C	128
C++	29
Programación Orientada a Objetos – (POO)	32

UFP = Unadjusted Function Points

SLOC = Source of Lines Of Code.

Para efectos de pruebas del modelo, se ha seleccionado al lenguaje C#, cuya sintaxis no difiere en mayor grado a la utilizada por java, tomado como base para conversión entre SLOC y UFP el valor de 32 (Programación Orientada a Objetos).

Definición de la arquitectura del software

Como se ha descrito, la arquitectura de software consiste en un conjunto de patrones, prácticas y abstracciones coherentes que proporcionan el marco de trabajo necesario para guiar el desarrollo de soluciones. Para el presente estudio se ha definido un marco de trabajo (Framework) genérico en el cual se engloban cuatro dominios de arquitectura:

- a. Arquitectura de Negocio: definiendo la estrategia del negocio (*governance*), la organización y los procesos de negocio implicados.
- b. Arquitectura de Aplicaciones: proveyendo una guía de implementación de cada una de las aplicaciones consideradas, así como de las interacciones entre los sistemas y las áreas / procesos de negocio.
- c. Arquitectura de Datos: contemplando las estructuras lógicas y físicas de datos, además de los recursos de gestión.

Arquitectura de Tecnología, que describe la infraestructura de software que debe soportar las aplicaciones.

Generación de un prototipo.

Con la finalidad de automatizar los aspectos clave de todo el proceso de desarrollo de un producto de software, como son: mecanismos de acceso a datos, seguridad, comunicaciones, entre otras, los prototipos se implementan a través de una herramienta CASE (Computer Aided Software Engineering), la misma que genera un conjunto de clases que aseguran el cumplimiento de las guías de arquitectura más comúnmente utilizadas en soluciones empresariales de alta disponibilidad requeridas actualmente por la industria.

Para la generación del prototipo en el método que se describe, se toma como entrada un modelo Entidad / Relación en base al que se aplica el Mapeo Objeto Relación (ORM), que es una técnica de programación utilizada para convertir datos entre el sistema de tipos en un lenguaje de programación orientado a objetos, y una base de datos relacional. En la práctica, esto crea una base de datos orientada a objetos virtual por sobre la base de datos relacional; posibilita además, el uso de las características propias de la orientación a objetos, y se provee mecanismos de acceso a datos robustos e interfaces de servicios para exponer la funcionalidad de la aplicación independientemente del protocolo utilizado.

La Figura 2 muestra el aplicativo desarrollado para dar soporte a la automatización del método aquí expuesto. Se presenta la pantalla de ingreso del modelo Entidad - Relación.

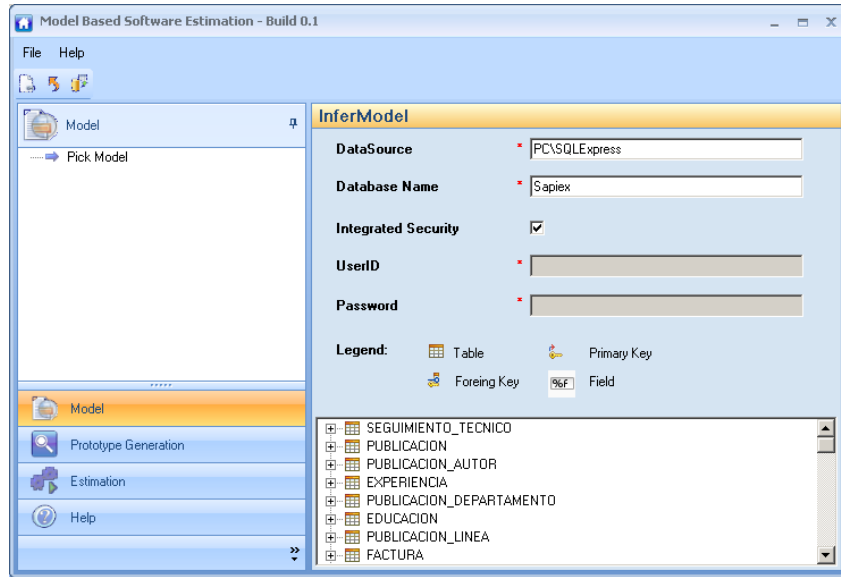


Figura 2. Ventana: Ingreso del Modelo Entidad - Relación.

Conteo del número de líneas de código del prototipo

De acuerdo con Fenton y Pfleeger (1997) [10], la definición más extendida de Línea de Código es la propuesta por Hewlett-Packard: “cualquier sentencia, salvo las de comentario y las líneas en blanco”. Para el método expuesto, se ha tomado esta definición para la determinación del total de líneas de código generadas en el prototipo. La figura 3 presenta una pantalla donde se calculan las líneas de código para el prototipo generado, mediante el software de soporte del método.

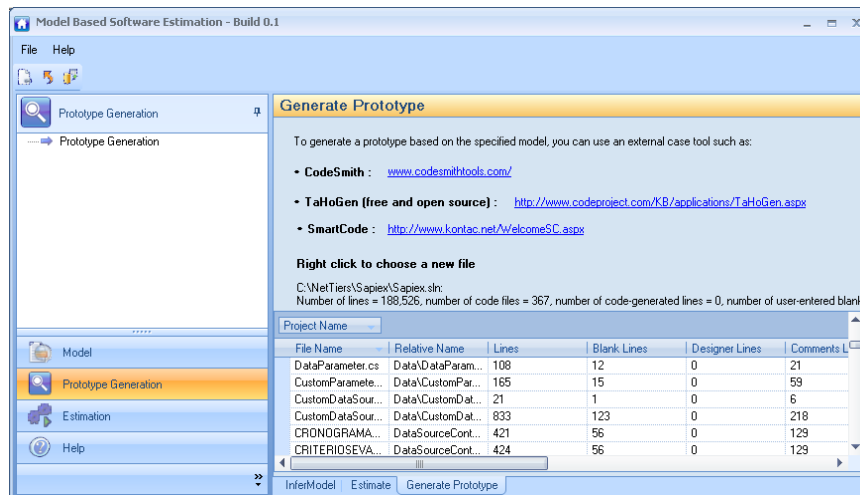


Figura 3. Ventana: Cálculo de líneas de código LOC.

Cálculo del esfuerzo por arquitectura y por funcionalidad mediante el modelo COCOMO.

Una de las actividades cruciales en la gestión de un proyecto de software, es la estimación del esfuerzo y tiempo de desarrollo. El método planteado usa el modelo COCOMOII para establecer estos indicadores.

La ecuación básica del modelo COCOMOII es la siguiente:

$$MP_{Nominal} = A \times (Size)^B \tag{1}$$

Donde:

- MP = Esfuerzo Nominal en meses-persona.
- A = Constante. (Provisionalmente estimada en un valor de 2.45)
- Size = Tamaño del software medido en líneas de código fuente (SLOC).
- B = Factor de escala.

En este documento, no se desarrolla el proceso de estimación de esfuerzo, tiempo y personal mediante el modelo COCOMO, en virtud de que la técnica es por demás conocida; sin embargo es preciso señalar que para efectos de no introducir variables relacionadas con la arquitectura, se considera un valor nominal tanto para los factores de escala (B = 1) como para los indicadores de costo (Esfuerzo Nominal). Finalmente el modelo usado es COCOMO II en su versión de Diseño Anticipado, aunque bien podría utilizarse el modelo Post-Arquitectura.

La Figura 4, muestra una pantalla con la estimación obtenida por el software desarrollado como soporte al método.

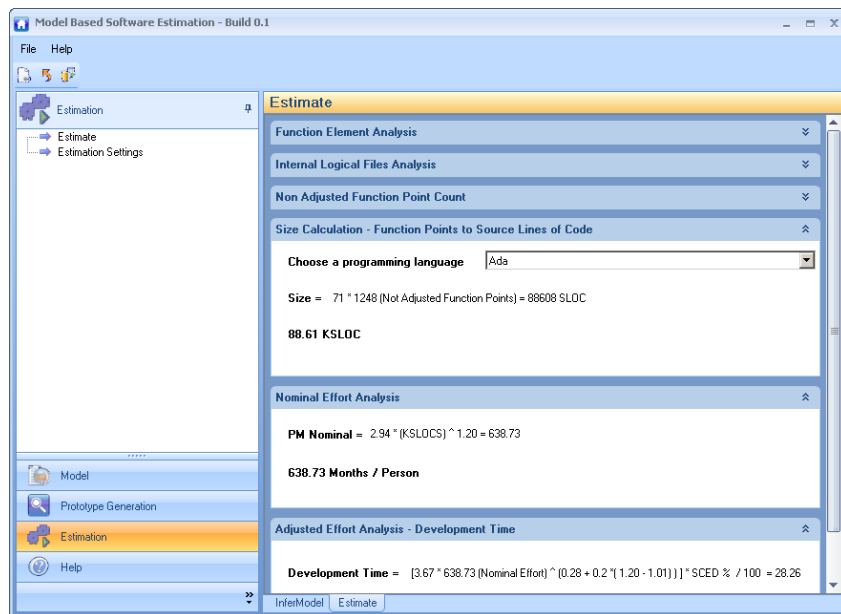


Figura 4. Ventana: Estimación de esfuerzo y tiempo de desarrollo.

RESULTADOS

El método ha sido aplicado a tres proyectos reales de software:

SIGTE: Sistema de Gestión de Trámites

SAPIV: Sistema de Administración de Proyectos de Investigación.

VENTAS: Sistema de gestión de Ventas

Los resultados obtenidos luego de aplicar el método Model Prototype Estimation, se detallan a continuación:

Tabla 2. Líneas de código generadas

	SIGTE		SAPIV		VENTAS	
	LOC	%	LOC		LOC	%
BLOC	13344	19	18048	18	34144	24
ALOC	57398	81	83209	82	111038	76
TLOC	70742	100	101257	100	145182	100

Donde:

BLOC = Bussines Lines of Code.

ALOC = Architecture Lines of Code.

TLOC = Total Lines of Code.

$$TLOC = BLOC + ALOC$$

(2)

Del análisis de la Tabla 2 se desprende que en todos los casos el porcentaje de líneas de código generados por arquitectura (ALOC), supera al porcentaje obtenido por la implementación de funcionalidad (BLOC). Siendo SIGTE, el sistema de menor tamaño en líneas de código (TLOC) seguido por SAPIV y VENTAS.

Tabla 3. Puntos de función de las aplicaciones analizadas

	SIGTE		SAPIV		VENTAS	
	LOC	%	LOC		LOC	%
BFP	417	19	564	18	1067	24
AFP	1794	81	2600	82	3470	76
TFP	2211	100	3164	100	4537	100

Donde:

BFP = Bussines Function Points (Sin ajustar)

AFP = Architecture Function Points (Sin ajustar)

TFP = Total Function Points (Sin ajustar)

La Tabla 3 indica la cantidad de puntos de función sin ajustar tanto en funcionalidad como en arquitectura, como era de suponer, al existir en la técnica de Albrecht una relación lineal entre líneas de código y puntos de función, se desprende la misma proporción de funcionalidad respecto a arquitectura. SIGTE tiene la menor cantidad de puntos de función sin ajustar y Ventas la mayor.

Tabla 4. Tamaño de la base de datos de las aplicaciones analizadas

	SIGTE	SAPIV	VENTAS
DBS	19	25	46
REL%	4.30	4.61	3.25

Donde:

DBS = Data Base Size.

REL % = Porcentaje Relativo entre arquitectura y funcionalidad.

La Tabla 4 muestra la relación entre el tamaño del modelo Entidad - Relación medido como el número de tablas de la base de datos (DBS), respecto al porcentaje relativo (REL%) entre arquitectura y funcionalidad. Es importante destacar que para todos los casos, la arquitectura aproximadamente cuadruplica a la funcionalidad.

Tabla 5. Estimación esfuerzo, tiempo y personal de las aplicaciones analizadas

	ESFUERZO			TIEMPO			PERSONAL		
	BLE	ARE	TOT	BLT	ART	TOT	BLS	ARS	TOT
SIGTE	50.8	252.7	318	12.8	21.3	22.9	4.0	11.9	13.9
SAPIV	70.8	380.2	471.8	14.2	24.3	26	5.0	15.6	18.1
VENTAS	142.7	522.1	701.1	17.8	26.8	29.5	8.0	19.5	23.8

Donde:

BLE = Bussines Logic Effort.

ARE = Architecture Effort.

TOT = Total.

BLT = Bussines Logic Time.

ART = Architecture Time.

BLS = Bussines Logic Staff.

ARS = Architecture Staff.

La determinación del esfuerzo, tiempo y personal mediante el modelo COCOMOII mostrados en la Tabla 5, confirman la estrecha relación entre la cantidad de líneas de código y puntos de función de los proyectos.

Se puede observar que hay ligeras variaciones en cuanto al tiempo que requiere cada proyecto, esto es razonable debido a la diferencia total en el recurso humano a utilizar.

CONCLUSIONES

- El método Model Prototype Estimation (MPE) apoya en la medición temprana y logra definir el tamaño de los sistemas de software tomando en cuenta los requisitos funcionales y no funcionales, específicamente de diseño arquitectónico, y a partir de allí se pueden aplicar modelos de estimación del esfuerzo, tiempo y costos como el descrito en COCOMO.
- En base a los resultados obtenidos con la aplicación del método, es notorio que el esfuerzo necesario para desarrollar una Arquitectura de Software puede llegar a ser mayor que el desarrollo de la funcionalidad misma del sistema; aunque este planteamiento no puede generalizarse ya que se hace necesaria una validación.
- Aunque en los casos de estudio se utilizó una herramienta generadora de código asociado a un lenguaje en particular como es C#, sin embargo el método no se enmarca a una única tecnología, ya que pueden utilizarse otros generadores para diferentes lenguajes.

- El desarrollo de una herramienta que automatice el método, simplifica en alto grado el proceso de estimación, dando al planificador un recurso que no implique un alto costo para su aplicación, permitiendo además que se realicen análisis retrospectivos en corto tiempo sobre sistemas en producción.
- Es necesario enfatizar que el método tiene su aplicación específica para sistemas que privilegian los datos a los procesos, mas no para otro tipo de software como pueden ser sistemas en tiempo real, sistemas de realidad virtual, o sistemas con arquitecturas orientadas a servicios que involucran la integración de muchas tecnologías y sistemas legados.
- Una vez adoptado el método se consigue como beneficio adicional que el framework desarrollado puede ser reutilizable, dando la oportunidad de ir recopilando datos de manera automática propendiendo a que las futuras decisiones de planeación puedan realizarse con mayor grado de certeza, que es lo que finalmente buscan los gerentes de sistemas y sus clientes.
- No se ha hecho un análisis que permita establecer si la estimación de costo tiempo y esfuerzo, tienen un grado de certeza aceptable, en virtud a que esto sale fuera del alcance de este estudio, y se deja como una perspectiva futura de validación del método.

Referencias

1. Allan J. Albrecht and John E. Gaffney, November 1983. "Software Function, Lines of Code, and Development Effort Prediction: A Software Science Validation", IEEE Transactions on Software Engineering, vol SE-9, No 6.
2. W. Boehm. 1981. "Software Engineering Economics", Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall.
3. Losavio F. Diciembre 2006. "Marco conceptual para un diseño arquitectónico basado en aspectos de calidad", Revista Universitaria de Investigación SAPIENS, vol 7, No 2,.
4. Krutch P. 2000. The Rational Unified Process. An Introduction. Second Edition. Addison-Wesley. Readings. Massachusetts.
5. Bosh, J. 2000. Design & Use of Software Architectures: Adopting and evolving a product-line approach. Great Britain: Pearson Education Limited.
6. Kazman, R., Klein, M., Barbacci, T., Longstaff, H., Lipson, H., y Carriere J. 1998. The Architecture Tradeoff Analysis Method. IEEE, ICECCS.
7. IEEE Std 1471-2000, IEEE Recommended Practice for Architectural Description of Software-Intensive Systems, IEEE, 2000.
8. Casanovas J. julio 2004. "Usabilidad y Arquitectura del Software", Disponible en: http://www.alzado.org/articulo.php?id_art=355.
9. David Garlan and Mary Shaw. New Jersey, 1993. "An Introduction to Software Architecture", Advances in Software Engineering and Knowledge Engineering, Volume I, edited by V.Ambriola and G.Tortora, World Scientific Publishing Company.
10. Fenton, N. E. y Pfleeger, S. L. 1997. Software Metrics. A Rigorous & Practical Approach.
11. International Thomson Computer Press.
12. Troy S. Henry. "Architecture-Centric Project Estimation", Master's thesis, Virginia Tech, 2007.
13. Walker Royce. Software Project Management: A United Framework. Addison-Wesley, 1998.
14. IFPUG Function Point Counting Practices Manual, release 4.1. IFPUG, 1999.
15. Practical Guidelines for Counting Logical Files. Version 1.0, IFPUG, 2001.

Quitosano impregnado con óxidos de Fe (III) usado como material sorbente para la remoción selectiva de arsénico desde aguas sintéticas y naturales.

Luis H. Cumbal Flores

Centro de Investigaciones Científicas, Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador

Marcelo M. Zúñiga Salazar

Carrera de Ingeniería Geográfica y del Medio Ambiente, Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador

RESUMEN: En las aguas de la laguna de Papallacta se detectaron concentraciones de arsénico que oscilaron entre 86 y 1796 $\mu\text{g/L}$. La fuente de arsénico ha sido atribuida a contaminación de origen natural. El presente estudio tuvo como objetivo la síntesis de un nuevo sorbente para la remoción del arsénico disuelto en el agua de la vertiente de la laguna. En la preparación del sorbente se utilizó un procedimiento químicamente simple y ambientalmente benigno. El sorbente contiene esferas de quitosano impregnadas con partículas de óxidos de hierro hidratado (Q-OFH). Por un lado, los óxidos de hierro exhiben excelentes propiedades conducentes a la captura selectiva de contaminantes como el arsénico y por el otro las esferas de quitosano mejoran las características hidráulicas y mecánicas del sorbente. Las esferas de Q-OFH fueron usadas para remover arsénico desde aguas sintéticas y naturales contaminadas y luego de una serie de ensayos de equilibrio y cinéticos en el laboratorio, se procedió a diseñar, construir, instalar y operar una planta prototipo. El componente principal de la planta es un filtro empacado con el material sorbente. De los resultados del primer ciclo de operación, se determina que es posible tratar 12500 L de agua contaminada con arsénico sin superar los 50 $\mu\text{g/L}$. Además, el material puede reusarse luego de su regeneración con sosa cáustica y acondicionamiento con agua acidificada.

ABSTRACT: Arsenic concentrations oscillating between 86 and 1796 $\mu\text{g/L}$ were detected in waters of the Papallacta Lake. The source of arsenic has been attributed to pollution of natural origin. This study was aimed to synthesize a new sorbent material for the removal of arsenic from the water fall of the lake. For the sorbent preparation, it was used a chemically simple and environmentally benign procedure. The novel sorbent material includes chitosan spheres impregnated with hydrated Fe oxide particles (Q-HFO). In one side, the iron oxide particles exhibit excellent properties conducive to selective uptake of arsenic and on the other; the chitosan spheres enhance the hydraulic and mechanical characteristics of the sorbent. The Q-HFO spheres were used to remove arsenic from synthetic and natural contaminated waters and after a series of

equilibrium and kinetic tests in the laboratory, a pilot plant was designed, built, installed, and operated. The key component of the pilot plant is a filter packed with the sorbent material. From the results of the first operational cycle, it was determined that 12500 L of arsenic contaminated water can be treated without exceeding 50 µg/L. Besides, the material can be reused after its regeneration with caustic soda and conditioning with acidified water.

1 INTRODUCCIÓN

El arsénico (As) es un elemento químico tóxico que está presente en aguas superficiales y subterráneas. La ingestión de agua contaminada con arsénico es un problema de salud pública a nivel mundial [1,2], pues por exposición crónica, el arsénico se acumula en el organismo y a ciertas concentraciones ocasiona afecciones en la piel. La evidencia epidemiológica de personas con ingestión prolongada de arsénico inorgánico, vía agua de bebida, es la hiperqueratosis palmo-plantar, cuya manifestación principal es la pigmentación de la piel y callosidades localizadas en las palmas de las manos y plantas de los pies [3]. La presencia de arsénico en agua, su grado de contaminación y la incidencia de enfermedades de piel en la India, Bangladesh, Taiwán, Vietnam, Argentina y México se describen en diferentes estudios [4-12]. La manifestación natural de arsénico en aguas superficiales y subterráneas de América Latina está asociada al volcanismo terciario y cuaternario de la cordillera de los Andes, proceso que continúa y que se muestra en flujos de lava, géiser, fumarolas, aguas termales y fenómenos geotérmicos relacionados con el volcanismo del llamado “cinturón de fuego del Pacífico” [13]. Este volcanismo también ejerce influencia en algunas características de esta agua como son pH alto, alcalinidad variable, baja dureza, moderada salinidad y presencia de boro, flúor, sílice y vanadio [13]. En el Ecuador la ocurrencia de arsénico ha sido recientemente cuantificada en aguas geotermales, aguas subterráneas y superficiales y sedimentos en las provincias de El Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi y Tungurahua. Las concentraciones de arsénico total presentes en las fuentes de agua termal oscilan entre 2 y 969 µg/L y en las aguas superficiales varían entre 2 y 166 µg/L. La concentración de arsénico en los sedimentos de los afloramientos termales varía de 287 y 717 mg/kg [14]. Adicionalmente, se ha encontrado un amplio rango de contenidos de arsénico en las aguas de las vertientes que sirven como agua de bebida a las parroquias de Tumbaco, Guayllabamba, Cumbayá, Yaruquí, El Quinche, Pifo y Puenbo y éstas oscilan entre 9 y 126 µg/L [Cumbal *et al. datos no publicados*].

Por otra parte, las partículas de óxido de hierro son excelentes adsorbentes, de especies químicas, incluyendo iones metálicos [15-17], aniones inorgánicos [18,19] y algunos compuestos orgánicos [20,21]. Los óxidos de Fe(III) hidratados (HFO) exhiben inmejorables propiedades conducentes a la captura selectiva contaminantes traza por su comportamiento de ácido débil. La predominancia de sus grupos funcionales y su capacidad de remoción depende del pH ($pK_{a1}=6.5$ y $pK_{a2}=9$) [18]. Por ejemplo a $pH \leq 4$ remueve arseniatos por un efecto combinado de interacción electrostática e interacción ácido-base de Lewis, en el rango de pH de 6.5 a 8.5 inmoviliza arsénico por interacción ácido-base de Lewis y a $pH \geq 11$ captura cationes metálicos [22]. En la Figura 1 se observan los grupos funcionales de los óxidos de hierro hidratado: $\equiv FeOH_2^+$, $\equiv FeOH$ y $\equiv FeO^-$. Los métodos de preparación de las partículas de óxidos de Fe(III) son fáciles y ambientalmente amigables, sin embargo estas partículas diminutas no pueden ser utilizadas en columnas de lecho fijo, barreras reactivas, ni en ninguna configuración tipo flujo pistón, debido a que causan elevadas caídas de presión y porque no son durables.

El encapsulamiento de las partículas de óxidos de Fe(III) en materiales soporte mejora sus propiedades hidráulicas y mecánicas y las vuelve químicamente más estables. Investigaciones previas han utilizado como materiales de soporte arenas, alginato de sodio, carbón activado, etc., pero los resultados no han sido satisfactorios [23-27].

En este estudio se prepararon esferas de quitosano (biopolímero de origen natural) impregnadas con partículas de óxido de Fe(III) y luego se aplicaron en la remoción de arsénico desde aguas sintéticas y naturales usando columnas de lecho fijo de laboratorio y en una planta piloto.

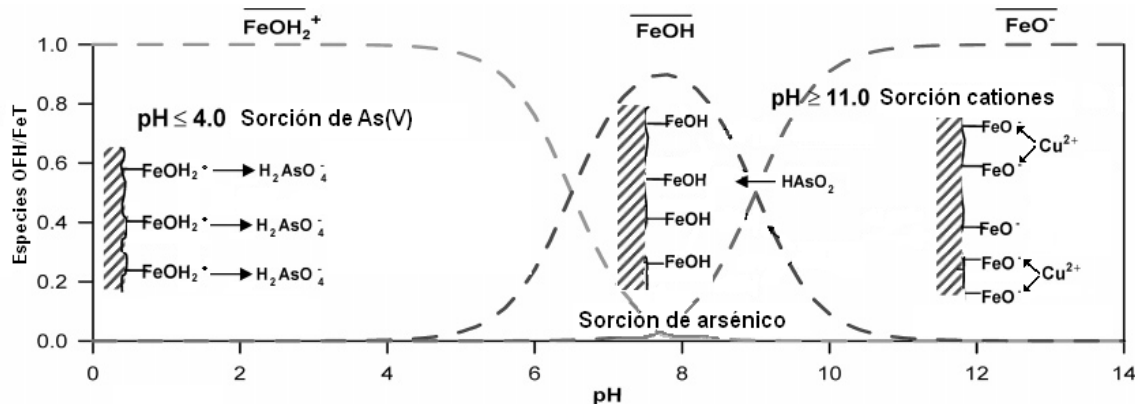


Figura 1: Especiación de los grupos funcionales de los óxidos de Fe a diferentes pH [22]

2 TÉCNICAS EXPERIMENTALES: MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS

2.1 Preparación del material sorbente

El procedimiento consta de las siguientes etapas:

- i) Molienda y tamizado.- Gránulos de quitosano son sometidos a molienda y tamizado para tener tamaños de 250 μm .
- ii) Disolución.- El quitosano tamizado es disuelto en una solución de ácido acético al 4% y el producto se almacena a temperatura ambiente por 15 días para disminuir la viscosidad.
- iii) Formación de las esferas.- La solución se introduce en una jeringa de 50 mL y se deja caer gota por gota en una solución al 5% de NaOH.
- iv) Lavado y entrecruzamiento.- Después de 16 horas de contacto con la solución alcalina, las esferas de quitosano son lavadas con agua desmineralizada y depositas en una solución al 2.5% de glutaraldehído.
- v) Carga de óxidos de Fe (III).- 100 g de esferas de quitosano son sumergidas en un reactor conteniendo 500 mL de FeCl_3 al 3% y agitadas a 40 rpm por 48 horas.
- vi) Desorción y precipitación.- Las esferas extraídas del reactor son sumergidas en 500 mL de una solución de NaOH al 5% para la desorción y precipitación simultánea de los átomos de Fe(III) en la superficie y poros de las esferas.
- vii) Lavado.- Las esferas impregnadas con los óxidos de hierro son sometidas a sucesivos lavados con agua desmineralizada para nivelar el pH a un valor igual a 7.

2.2 Ensayos con columnas de lecho fijo

Se condujeron usando una columna de 1.1 cm de diámetro y 30 cm de longitud, empacada con quitosano impregnado con óxidos de Fe(III) (Q-OFH). La razón diámetro de columna al diámetro del sorbente fue de aproximadamente 10:1. Se corrieron dos series de columnas, la primera se alimentó con agua sintética preparada con 100 $\mu\text{g/L}$ de arsénico, 120 mg/L de sulfatos, 90 mg/L de cloruros y 100 mg/L de bicarbonatos y pH = 6.0. En la segunda serie se utilizó agua natural proveniente del río Tuminguina. En las dos series de ensayos, se utilizó una bomba peristáltica de

desplazamiento positivo, a un caudal de 1 mL/min. El efluente se recogió en tubos de ensayo colocados en un colector de fracciones Eldex PN 1243.

2.3 Ensayos de regeneración

En el proceso de regeneración, se utilizó una solución al 5% de NaOH. El regenerante se alimentó a la columna de lecho fijo con un caudal de 0.5 mL/min. El efluente se recogió en el colector de fracciones para posteriormente análisis. Las esferas y gránulos regenerados fueron lavados con ocho volúmenes de lecho de una solución al 10% de ácido acético.

2.4 Ensayos de digestión ácida

Para este ensayo, 250 mg de quitosano impregnado con OFH fueron sumergidos en dos lotes consecutivos de solución ácida (200 mL de H₂SO₄ a 2N). Los lotes fueron colocados en un agitador rotativo a 40 rpm durante 48 horas y los sobrenadantes fueron filtrados y analizados por hierro total.

2.5 Análisis químicos

Para la cuantificación de arsénico en muestras tomadas del colector de fracciones, de la planta piloto y de las aguas del río Tuminguina, se utilizó el sistema Generador de Hidruros, Perkin Elmer, acoplado a un Espectrómetro de Absorción Atómica, Perkin Elmer, AA 100 (GH-AA100) equipado con una lámpara de descarga de electrones a 197.3 nm de longitud de onda. Para medir el contenido de hierro total depositado en las esferas de quitosano se empleó igualmente el AA 100, Los cloruros, sulfatos y bicarbonatos fueron analizados siguiendo métodos estándares del Standard Methods.

2.6 Reactivos químicos

Todos los reactivos químicos utilizados en esta investigación fueron de grado analítico y comprados a la empresa Espectrocrom, representante en el Ecuador de Sigma-Aldrich Chemicals. El agua desmineralizada usada en este estudio se la obtuvo desde un desmineralizador Millipore Direct-Q3.

2.7 Diseño de la planta piloto

La planta se diseñó para abastecer con agua segura a una comunidad de 20 personas y se seleccionó un consumo promedio de 15 litros agua/día/persona (agua para bebida y alimentación). La capacidad de sorción del Q-OFH fue estimada de los datos de los ensayos de lecho fijo hasta alcanzar la saturación y equivale a 0.5 mgAs/g de quitosano húmedo. El filtro donde se almacena el material sorbente fue dimensionado con los valores de capacidad de sorción, velocidad superficial y tiempo de retención (determinados de las pruebas cinéticas). Las características del filtro se detallan en la Tabla 1.

Luego se dimensionaron el resto de componentes del prototipo, buscando tener una adecuada capacidad instalada. En la Tabla 2 se resumen los componentes de la planta prototipo y en la Figura 2 se observa la distribución de sus unidades. En cambio en la Tabla 3 se indican las características de operación de la planta. Las tres bombas de 0.25 HP que alimentan con agua cruda a la planta prototipo, ayudan a circular la solución regenerante por el filtro que contiene Q-OFH, bombean la solución ácida luego de la regeneración y acondicionan el pH a un valor de 6.0; fueron seleccionadas considerando el caudal de diseño (0.5 L/min).

Tabla 1. Especificaciones del filtro de la planta piloto

Especificaciones técnicas	Unidad	Valor
Caudal	L/min	0.50
Altura	cm	45.00
Diámetro exterior	cm	21.60
Diámetro interior	cm	21.20
Área transversal	dm ²	3.46
Altura de lecho con Q-OFH	cm	14.44
Densidad húmeda del Q	g/L	1000.00

Tabla 2. Componentes de la planta piloto

Componentes de la planta piloto	Volumen L
Tanque de almacenamiento de agua cruda	4000
Tanque para almacenar regenerante	250
Tanque para acondicionamiento	250
Tanque para almacenar solución estabilizadora de pH	50
Tanque para recolectar los precipitados de Fe(III)	50
Filtro de carbón activado	10

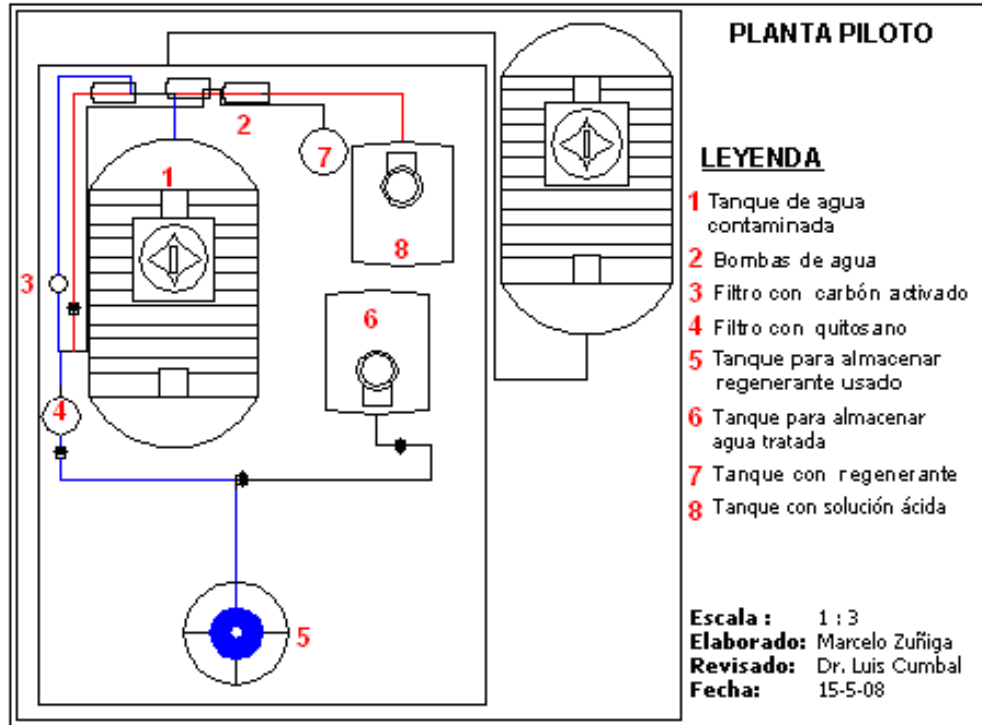


Figura 2. Planta prototipo que remueve arsénico desde el agua del embalse de la EMAAP-Q Papallacta

Tabla 3. Características de operación de la planta prototipo

Características de Operación		Características
Contenido de As en la vertiente de la Laguna de Papallacta		194 µg/L As
Masa de As acumulada/día	<i>Consumo diario de agua x concentración de As</i>	58.2 mgAs/g
Masa removido por quitosano	<i>Capacidad quitosano x masa del quitosano</i>	2500 mg As
Días antes de regeneración	<i>As removido/ masa de As diaria</i>	43.0 d
Tiempo para alcanzar 300 L/d		10 h
Masa de Q-OFH	<i>Masa removido por Q-OFH / capacidad del Q-OFH</i>	5000 g
Volumen de Q-OFH	<i>Masa Q-OFH/densidad Q-OFH</i>	5 L
Caudal de agua tratada		30 L/h
Velocidad superficial del agua	<i>Caudal/área transversal</i>	1.44 cm/min

Tiempo de retención	<i>Altura de Q-OFH/velocidad superficial</i>	10 min
Volumen regenerante NaOH 5%		50 L

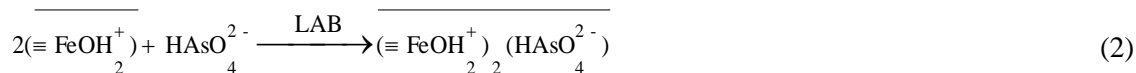
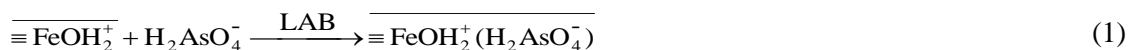
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Contenido de hierro total depositado en las esferas de quitosano

El contenido de hierro total se cuantificó mediante análisis químico del sobrenadante de la digestión ácida usando un espectrómetro de absorción atómica. Como se observa en la Figura 3, el contenido de hierro en las esferas de quitosano varía con el ciclo de carga y que luego de cuatro ciclos se logra impregnar 33.65 mg Fe/g de quitosano húmedo. Notar que en los dos primeros ciclos, el contenido de hierro total es solamente 22.3 mg/g, por lo que fue necesario aplicar más de dos ciclos de carga para tener una buena cantidad de óxido metálico dispersada en el interior de las esferas de quitosano, pese que a pH ácido (pH = 1.6) los grupos amino del quitosano se encuentran cargados positivamente y repelen a los átomos de Fe(III). Una variada cantidad de hierro ha sido depositada en materiales sorbentes emergentes utilizados para la remoción de arsénico. En esferas de alginato de calcio se logró impregnar 3.9 mg Fe/g de alginato húmedo [24] mientras que en arenas se recubrieron con 2- 10 mg Fe/g de arena [23]. En consecuencia, el mayor contenido de hierro en las esferas de quitosano suministra de una mayor cantidad de sitios de reacción, mejorando la capacidad de sorción de arsénico del Q-OFH.

3.2 Columna de lecho fijo usando agua sintética

En la Figura 4 se presenta el historial de la concentración de arsénico en un ensayo de sorción usando esferas de quitosano impregnadas con óxidos de Fe (III) y agua sintética a pH igual a 6.2. Notar que 50 µg/L se alcanzan luego de tratar 40,000 volúmenes de agua contaminada con As. La selectividad por los oxianiones de As(V) puede explicarse porque a pH = 6.2, los sitios reactivos de los óxidos de Fe(III) dispersos en las esferas de quitosano, predominante se encuentran cargados positivamente, por lo tanto remueven As mediante la combinación de dos interacciones: i) electrostática y ii) ácido-base de Lewis y representadas por las reacciones [27]:



LAB: interacción ácido base de Lewis

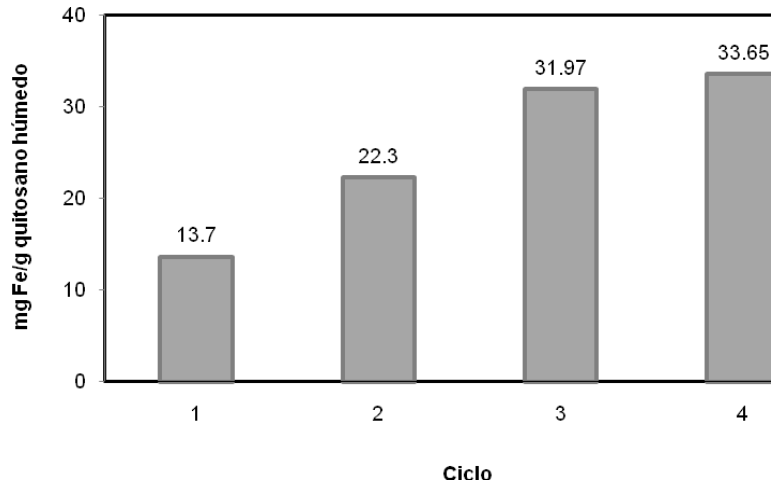


Figura 3. Contenido de Fe en el quitosano en función con el ciclo de carga

Condiciones Experimentales

Velocidad superficial = 0.6 m/h

Tiempo de retención = 4.0 min

Afluente

As (V) = 100 mg/L

Cl⁻ = 100 mg/L

HCO₃⁻ = 100 mg/L

SO₄²⁻ = 128 mg/L

pH = 6.2

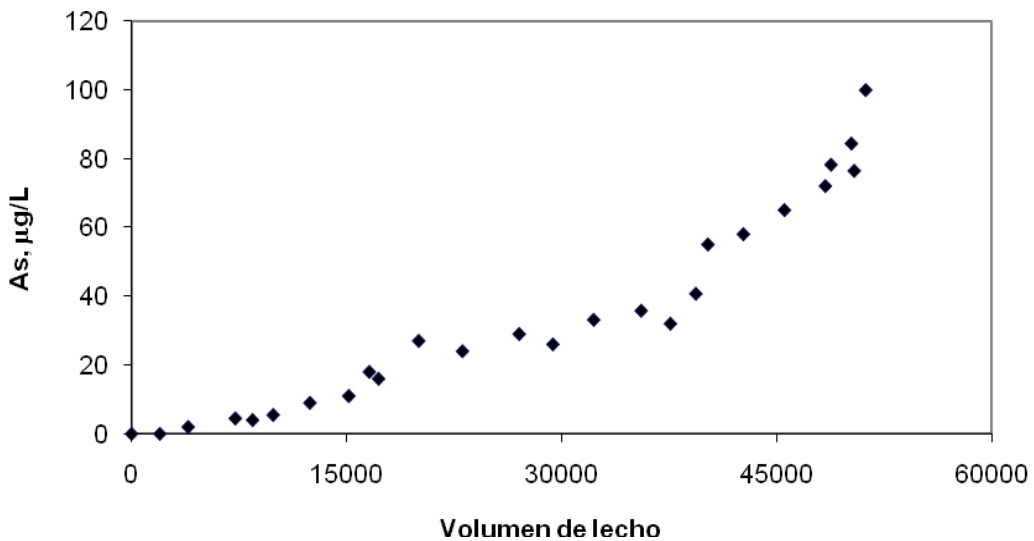


Figura 4. Historial de concentraciones de As en una columna de lecho fijo empacada con quitosano modificado con óxidos de Fe(III) usando agua sintética.

Por otra parte, los grupos amino del quitosano a pH 6.2 son predominantemente positivos y como resultado inmovilizan electrostáticamente a los oxianiones de As(V). Bajo condiciones ideales del proceso de sorción, el porcentaje de grupos amino cargados positivamente responde a las siguientes ecuaciones [28]:



$$K_a = \frac{[\text{QNH}_2][\text{H}^+]}{[\text{QNH}_3^+]} \quad (4)$$

$$[\text{QNH}_2]_T = [\text{QNH}_3^+] + [\text{QNH}_2] \quad (5)$$

De las ecuaciones 4 y 5, el porcentaje de grupos amino positivamente cargados puede obtenerse mediante la siguiente relación:

$$\frac{[\text{QNH}_3^+]}{[\text{QNH}_2]_T} = \frac{1}{1 + \frac{K_a}{[\text{H}^+]}} \quad (6)$$

donde $[\text{QNH}_2]$ representa el grupo amino neutro, $[\text{QNH}_3^+]$ es el grupo amino cargado positivamente, $[\text{QNH}_2]_T$ constituye el grupo amino total presente en el quitosano y K_a es la constante de disociación (M). La K_a ha sido reportada en el rango de $10^{-6.2}$ a $10^{-7.0}$ M [29], de manera que a pH = 6.2, aproximadamente el 70% de las esferas de quitosano sin óxidos de hierro, están cargadas positivamente y proporcionan un mecanismo adicional para remover arsénico desde las aguas contaminadas.

3.3 Columna de lecho fijo usando agua cruda del embalse del río Tuminguina

Para evaluar la capacidad de remoción arsénico del quitosano impregnado con OFH se utilizó agua cruda del embalse de la EMAAP-Q, ubicado en el río Tuminguina. La concentración de As_T del agua reservorio fue de 49 $\mu\text{g/L}$ y la del resto de componentes se indican en la Figura 5.

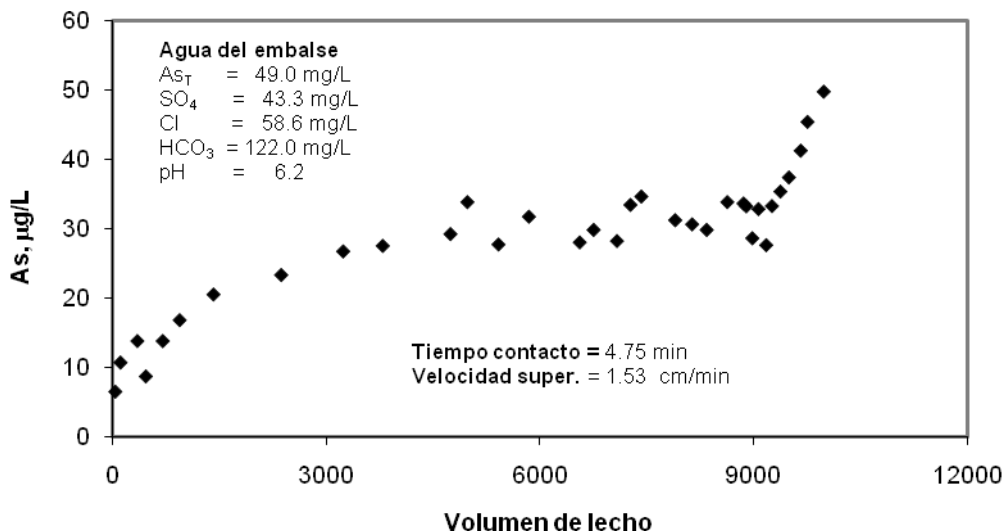


Figura 5. Historial de concentraciones de As en una columna de lecho fijo empacada con Q-OFH usando agua del embalse del río Tuminguina.

Antes del ensayo el agua natural fue ajustada a pH 6.0 y luego fue alimentada a la columna con una bomba peristáltica. Notar que la concentración de $10 \mu g As_T/L$, se alcanza luego de pasar 420 volúmenes de lecho y que la concentración del efluente de la columna es igual a la del influente ($49 \mu g/L As_T$) luego de pasar 8852 volúmenes de lecho. En este ensayo además, se determinó que la capacidad de remoción de As es igual a $179.7 \mu g As_T/g$ sorbente, valor que comparado con el valor del ensayo con agua sintética es de un orden de magnitud inferior. Este fenómeno puede ser atribuido a la competición de la materia orgánica natural (expresada como carbono orgánico total e igual a $49 mg/L$) por los sitios de sorción en los óxidos de Fe(III) y a la formación de complejos entre la materia orgánica natural y el As(III), favoreciendo la elusión temprana del arsénico en el efluente de la columna. Redman *et al.* (2002), reportan que la presencia de materia orgánica provoca un desplazamiento y retraso de las especies arsenicales de los sitios de sorción en sorbentes naturales, por la ocupación u obstrucción de una gran proporción de superficie reactiva, provocando de esta manera una disminución en la cantidad de sitios activos para capturar arsénico[30].

3.4 Primer ciclo de operación de la planta prototipo

Las esferas de quitosano impregnadas con OFH se emplearon como material sorbente. Durante este primer ciclo se pasó por el filtro agua cruda de la vertiente de la laguna de Papallacta a pH igual a 6.8. En la Figura 6 se presenta el perfil de la concentración de arsénico durante el primer ciclo de operación de la planta prototipo. Notar que luego de pasar 710 volúmenes de lecho de agua cruda (3550 L) se alcanza la concentración de $10 \mu g As_T/L$ y luego de más de 2000 volúmenes de lecho (12500 L) se llega a $50 \mu g/L$ de arsénico. El mecanismo de remoción de las especies arsenicales desde el agua cruda es similar al indicado en la sección 3.2. Comparando el número de volúmenes de agua sintética y agua natural tratados con las mismas esferas de Q-OFH, se nota que con agua sintética se alcanza valores muy superiores que con agua natural. Esto puede estar relacionado con

la calidad de la matriz de agua natural. Por ejemplo, el carbono orgánico total del agua de la vertiente es cercano a 50 mg/L y puede competir con el arsénico por los sitios de adsorción en la superficie de los óxidos de hierro. Genc *et al.* (2005) reportan que el efecto combinado de fosfatos, sulfatos, silicatos y bicarbonatos causa una reducción en la capacidad de remoción del arsénico de arenas recubiertas con bauxita activada usando aguas subterráneas [31]. Gu *et al.* (2005) igualmente reportan que los fosfatos y silicatos decrecen significativamente la remoción de arsénico por parte del carbón activado impregnado con óxidos de Fe(III) a pH < 8.5 [32].

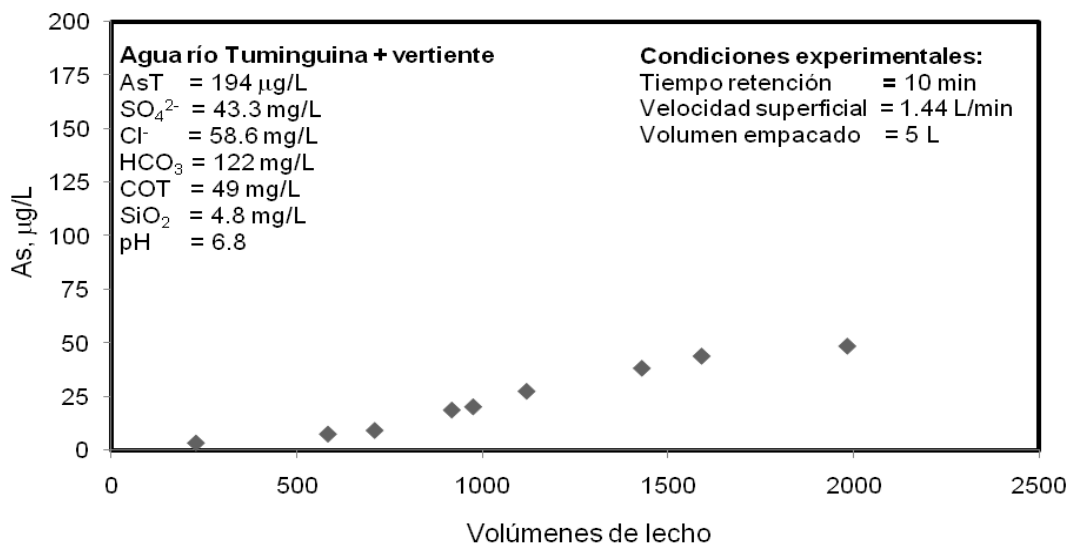


Figura 6. Concentración de As_T en el primer ciclo de operación en la planta prototipo usando agua del embalse de la EMAAP-Q. Muestras de agua tomadas en la salida del filtro empacado con Q-OFH.

3.5 Regeneración de las esferas de Q-OFH usadas en la planta piloto

Los materiales sorbentes son viables económicamente cuando éstos son usados durante varios ciclos de sorción y desorción sin que su capacidad sea alterada significativamente. En este sentido, las esferas de Q-OFH fueron sometidas a regeneración con una solución al 5% de NaOH y manteniendo una velocidad superficial de 0.30 cm/min. El perfil de arsénico durante la regeneración del filtro con Q-OFH se muestra en la Figura 7. Notar que con 10 volúmenes de lecho (50 litros de sosa cáustica) es posible recuperar el 50% de arsénico desde las esferas de Q-OFH. Es preciso manifestar sin embargo que en las pruebas con agua sintética (datos no indicados), la recuperación de las especies arsenicales usando la misma solución regenerante e igual número de volúmenes de lecho fue superior al 90%. Mecanicamente la elevada recuperación de arsénico ocurrida en este último ensayo, puede estar asociado con la fácil accesibilidad que tuvieron los iones hidroxilo (OH⁻) a los sitios de reacción de los óxidos de Fe(III), provocando que sus grupos adquieran carga negativa. Adicionalmente, a pH básico las especies arsenicales son también aniones y consecuentemente son repelidas por las cargas negativas de la fase sólida, lográndose una excelente desorción del arsénico.

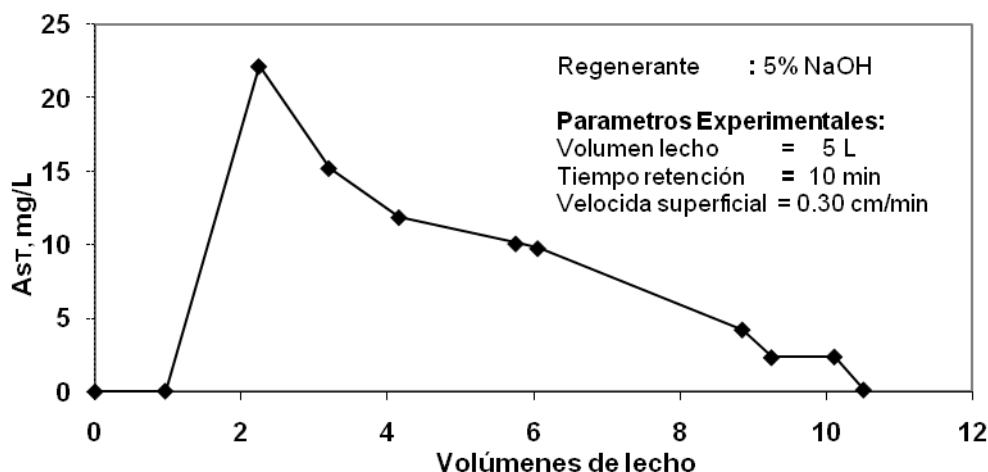
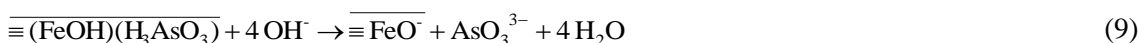
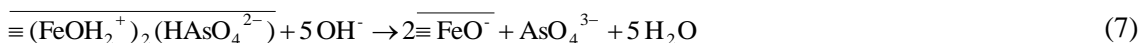


Figura 7. Perfil de concentración de As durante la regeneración del Q-OFH empacado en la planta piloto.

Estequiométricamente, la regeneración puede ser representada de la siguiente manera [27]:



Posterior a la regeneración, las esferas de Q-OFH fueron acondicionadas con 0.3 M de ácido clorhídrico para disminuir el pH. Se necesitaron solo ocho volúmenes de solución ácida para que el pH alcance 5.5. Notar que luego del acondicionamiento, las esferas de Q-OFH están listas para el siguiente ciclo de sorción y ningún ajuste posterior de pH es requerido. En la Figura 8 y Ec. 10, se resumen las reacciones químicas de la protonización de sitios de sorción de los óxidos de hierro [27]. Estudios previos con resinas poliméricas impregnadas con óxidos de hierro, reportan que los sorbentes fueron acondicionados, luego de la regeneración, con agua desmineralizada burbujeada con dióxido de carbono y que se necesitaron solamente ocho volúmenes de lecho hasta alcanzar un pH aproximadamente igual a 6.0 [33].

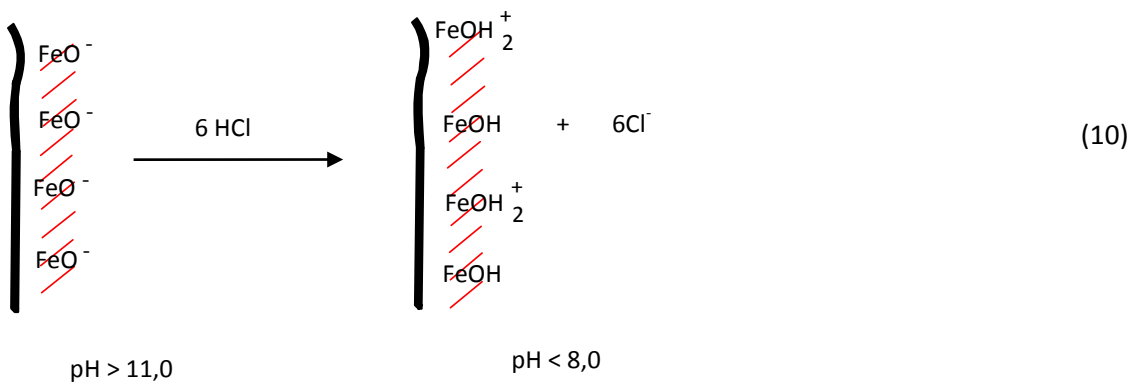


Figura 8. Procesos de acondicionamiento de las esferas de Q-OFH

4 CONCLUSIONES

- La impregnación con 38 mg Fe_T/g quitosano húmedo es bastante buena si se toma en consideración que a pH de la dosificación con los átomos de Fe(III) (pH = 1.6), los grupos amino del quitosano están cargados positivamente y repelen los cationes de Fe. Notar que la dispersión de los OHF en una mayor área superficial favorece el incremento en la reactividad del quitosano y consecuentemente mejora la remoción selectiva de las especies arsenicales.
- El quitosano impregnado con óxidos de Fe(III) presenta varias ventajas con respecto a otros materiales soporte emergentes: i) disponibilidad de la materia prima para su procesamiento, ii) fácil metodología de preparación, iii) buenas propiedades mecánicas e hidráulicas, iv) posibilidad de uso en varios ciclos de adsorción y desorción, v) no altera la calidad del agua porque no es tóxico, requerimiento indispensable para ser utilizado en tratamientos de aguas de bebida, vi) eficiente regeneración, requisito indispensable para que sea reusado y vii) biodegradación rápida.
- El mecanismo de retención ejercido por las esferas Q-OFH sobre las especies arsenicales, se fundamenta en la combinación de interacciones electrostáticas y ácido-base de Lewis. Los oxianiones arsenicales se ligan electrostáticamente con los grupos positivos de los óxidos de Fe(III) mientras que la interacción ácido-base de Lewis forma complejos de esfera interna entre el arsénico (donador de un par de electrones) y los OFH (aceptador de par de electrones).
- La presencia de otros iones competidores (sulfatos, fosfatos, silicatos y bicarbonatos) por los sitios de sorción disponibles en el sorbente híbrido reducen la remoción del As, este fenómeno fue muy evidente cuando se utilizaron las aguas naturales (agua de la vertiente de la laguna de Papallacta).
- El volumen de agua tratada en la planta piloto (12500 L) en su primer ciclo de operación es bastante halagador, considerando que la concentración de As en el agua fue superior a 190 µg/L. La eficiencia de tratamiento podría mejorarse si se modifica ligeramente el procedimiento de carga de los átomos de Fe(III) en las esferas de quitosano y si se controla la salida y posterior deterioro del Q-OFH.
- La regeneración del Q-OFH empacado en el filtro de la planta prototipo es moderada con el paso de solo 10 volúmenes de sosa cáustica. La dificultad de inmovilizar y almacenar las especies arsenicales disueltas en la sosa cáustica luego de la regeneración es el principal inconveniente que presentan las esferas de Q-OFH.
- El diseño de la planta prototipo suministra agua con bajos niveles de arsénico para una comunidad de 20 personas pues puede tratar hasta 12500 L de agua hasta que se alcanza una concentración 50 µg/L. Por su fácil construcción, la planta piloto se la puede replicar en otros sitios y proveer de agua segura. Los elementos principales de la planta son: i) filtro de 16 L que aloja el material sorbente, ii) bombas para suministro de agua contaminada, solución regenerante y solución de reacondicionamiento, iii) filtro de carbón activado para capturar la materia orgánica natural, iv) tanques de almacenamiento, y v) tuberías, válvulas y elementos de control. El filtro que aloja al material sorbente está provisto de dos baffles para incrementar el tiempo de contacto del agua con el material sorbente y permitir que el arsénico alcance los sitios reactivos disponibles en la red de poros del Q-OFH.

5 REFERENCIAS

1. Nahar K, Hanchett S. y Rezdi F., "Arsenic awareness in Bangladesh towns, The Water, Engineering and Development Center (WEDC), In 26th Conference on Water, Sanitation and Hygiene: Challenges of the Millennium, 234 - 236, Dahaka, Bangladesh, 2000.
2. Organización Mundial de la Salud. (1995) Guías para la calidad del agua potable. Vol. 1. 2ª edición. Ginebra. pp 37-43

3. Astolfi, E.A.N., Maccagno, A., García Fernández, J.C., Vaccaro, R. Stimola, R. Relation between arsenic in drinkingwater and skin cancer, *Biolog. Trace Elements Res.* 3, 133-143(1981).
4. Dhar R. Kr., Biswas B. Kr., Samanta G., Mandal B. Kr., Chakraborti D., Roy S., Jafar A., Islam A., Ara G., Kabir S., Khan A. W., Ahmed S. A., Hadi, S. A. Groundwater arsenic calamity in Bangladesh. *Curr. Sci.* 73, 48--59(1997).
5. Chakraborti D., Rahman M. M., Paul K., Chowdhury U. K., Sengupta M. K., Lodh D., Chanda C. R., Saha K. C., Mukherjee S. C. Arsenic calamity in the Indian subcontinent. What lessons have been learned? *Talanta.* 58, 3--22(2002).
6. Smith A. H., Goycolea M., Haque R., Biggs M. L. Marked increase in bladder and lung cancer mortality in a region of Northern Chile due to arsenic in drinking water. *Am. J. Epidemiol.* 147, 660--669(1998).
7. Das D., Chatterjee A., Samanta G., Mandal B., Chowdhury T. R., Samanta G., Chowdhury P. P., Chanda, C., Basu, G., Lodh D., Nandi S., Chakraborty T., Mandal S., Bhattacharya S. M., Chakraborti D. Arsenic contamination in groundwater in six districts of West Bengal, India: The biggest arsenic calamity in the world. *Analyst.* 119, 168N-170N (1994).
8. Cebrian M. E., Albores A., Garcia-Vargas G., Del Razo L. M., Ostrosky-Wegman P., en Arsenic in the environment. Part II: Human health and ecosystem effects, Nriagu, J. O., Ed. (John Wiley & Sons: NY, 1994), *Chronic arsenic poisoning in humans: The case of Mexico*, pp. 93-107.
9. Armenta M. A., Rodriguez R., Aguayo A., Ceniceros N., Villaseñor G., Cruz O. Arsenic contamination of groundwater at Zimapan, Mexico. *Hydrogeol. J.*, 5, 39--46(1997).
10. Brown, K. G.; Chen, C.-J. Significance of exposure assessment to analysis of cancer risk from inorganic arsenic in drinking water in Taiwan. *Risk Anal.* 15, 475--484(1995).
11. Berg M., Tran H. C., Nguyen T. C., Pham H. V., Schertenleib R., Giger W. Arsenic contamination of groundwater and drinking water in Vietnam: A human health threat. *Environ. Sci. Technol.* 35, 2621-626(2001).
12. Frederick P., Kenneth B., Chien-Jen C. Health implications of arsenic in drinking water, *Journal AWWA*, 86, 9, 52--63(1994).
13. Castro de Esparza, Ma. Luisa, "Arsénico en el agua de bebida de América Latina y su efecto en la Salud Pública", Cepis N°95, Diciembre 2004.
14. Cumbal, L.; Vallejo, P. & Rodriguez, B. "Arsenic in geothermal sources at the Northern-Center Andean Region of Ecuador: Concentrations and mechanisms of mobility" In Mining Pollution, Environment, and Health. 12-13 November (2007).
15. Laxen, D. P. H. Adsorption of lead, cadmium, copper, and nickel onto hydrous iron oxides under realistic conditions, *Heavy Met. Environ., Int. Conf.*, 4th, 2, 1082-5(1983).
16. Slavek, J. and Pickering, W. F. Extraction of metal ions sorbed on hydrous oxides of iron(III), *Water, Air, and Soil Pollution*, 28(1-2), 151-62(1986).
17. Music, S.; Ristic, M. Adsorption of zinc(II) on hydrous iron oxides, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 162, 2, 351-62(1992).
18. Pierce, M. L. and Moore, C. B. Adsorption of arsenite and arsenate on amorphous iron oxide, *Water Research*, 16, 1247-1253(1982).
19. Manning, B.A.; Fendorf, S.E.; and Goldberg, S. Surface structures and stability of arsenic(III) on goethite: spectroscopic evidence for inner-sphere complexes, *Environ. Sci. Technol.*, 32, 16, 2383-2388(1998).
20. Matheson, L. J.; Tratnyek, P. G. Reductive dehalogenation of chlorinated methanes by iron oxides, *Environ. Sci. Technol.*, 28, 2045-2053(1994).
21. Wang, C. G. and Zhang, W. Synthesizing nanoscale iron particles for rapid and complete dechlorination of TCE and PCBs, *Environ. Sci. Technol.*, 31, 7, 2154-2156(1997).
22. Cumbal, L. & SenGupta, A. K. Preparation and characterization of magnetically active dual-zone sorbent *Industrial Engineering and Chemistry Research*, 44, 3, 600-605(2005).
23. Benjamin, M. M., Sletten, R. S., Bailey, R. P., Bennett, T. Sorption and Filtration of Metals Using Iron-Oxide Coated Sand, *Water Research*, 30, 11, 2609--2620(1996).
24. Zouboulis, A. I. and Katsoyiannis, I. A. Arsenic removal using iron oxide loaded alginate beads, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 41, 6149-6155(2002)
25. Min, J. H. and Hering, J. G. Arsenate sorption by Fe(III)-doped alginate gels, *Water Research*, 32, 5, 544-1552(1998).
26. De la Torre, E.; Iordanov, P.; Muñoz, G. A. Desarrollo, Síntesis y caracterización de carbón activado con propiedades de intercambio iónico, *Rev. Ciencia*, 8, 1, 39--46(2005).
27. Cumbal, L. Polymer-supported hydrated Fe oxide (HFO) nanoparticles: characterization and environmental applications. *Ph. D. Thesis*, Lehigh University, Bethlehem, PA (2004).
28. Niu, C. H., Volesky, B., Cleiman, D. Biosorption of As(V) with acid-washed crab shells, *Water Research*, 41, 2473-2478(2007).
29. Roberts, G.A.F. Chitin Chemistry. Macmillan, London, UK, pp. 1--58 (1992b).
30. Redman, A., Macalady, D., Attmann, D. Natural organic matter affects arsenic speciation and sorption onto hematite, (Environmental Science Technology Publisher, 2002).
31. Genc, H., Bregnhøj, H., McConchie, D. Arsenate removal from water using sand-red mud columns, *Wat. Res.*, 39, 2944-2954(2005).

32. Gu, Z., Fang, J., Deng, B. Preparation and evaluation of GAC-based iron containing adsorbents for arsenic removal, *Environ. Sci. Technol.*, 39, 3833-3843(2005).
33. Cumbal, L., Greenleaf, J., Leun, D., SenGupta, A. Polymer supported inorganic nanoparticles: characterization and environmental applications, *Reactive & Functional Polymers*, 54, 167-180(2003).